

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin



**Charakterisierung des HCO_3^- Transportes
des isolierten Psalterepithels des Schafes**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Maike Beisele
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2008
Journal-Nr. 3236

Gefördert durch ein Promotionsstipendium des Landes Berlin

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Holger Martens
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Eberhard Schein
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

bicarbonates; omasum; sheep; pH; ion-transport; *in vitro*; animal models

Tag der Promotion: 16.07.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN-13: 978-3-86664-443-3

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008
D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mbv 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin - 030-45494866
verlag@menschundbuch.de - www.menschundbuch.de

Mali

Max & Bernhard & Mattes

Lotte & Theo

Inhalt

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1.	Anatomische und histologische Aspekte des Psalters.....	3
2.2.	Tierartsspezifische Unterschiede zwischen Schaf und Rind.....	4
2.3.	Allgemeines über den transepithelialen Transport.....	4
2.4.	Elektrolyttransport im Psalter	5
2.4.1.	Wassertransport.....	5
2.4.1.1.	Ammoniak.....	5
2.4.2.	Kationentransport	6
2.4.2.1.	Natrium	6
2.4.2.2.	Kalium.....	7
2.4.2.3.	Magnesium	7
2.4.2.4.	Calcium	8
2.4.3.	Anionentransport.....	8
2.4.3.1.	Kurzkettige flüchtige Fettsäuren	8
2.4.3.2.	Phosphat.....	9
2.4.3.3.	Bikarbonat	10
2.4.3.4.	Chlorid	11
2.4.4.	Molekularbiologie der Anionentransporter.....	12
2.4.5.	Passage von Futterpartikeln	15
2.4.6.	Zusammenfassung.....	15
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	18
3.1.	Versuchstiere	18
3.2.	Isolation und Präparation der Psalterschleimhaut.....	18
3.3.	Messmethode/-prinzip.....	19
3.3.1.	Ussing Kammer.....	19
3.3.2.	Elektrophysiologisches Messprinzip	21
3.3.3.	Open-circuit	21
3.3.4.	Short-circuit	22
3.3.5.	pH-Stat-Methode.....	22
3.3.6.	Berechnung der Transportraten	23
3.3.7.	Inkubation	23
3.4.	Chemikalien.....	24
3.4.1.	Inkubationslösungen.....	24
3.4.2.	Pharmaka.....	24
3.5.	Allgemeiner Versuchsaufbau.....	25
3.5.1.	Hemmstoffzugabe	26
3.5.2.	Variation der Elektrolytkonzentrationen	26

Inhaltsverzeichnis

3.5.3.	Gesättigte Fettsäuren	27
3.5.4.	Ammoniak.....	27
3.6.	Statistik.....	27
4.	ERGEBNISSE	29
4.1.	Zeitlicher Verlauf der Versuchparameter	29
4.1.1.	Die elektrophysiologischen Parameter	29
4.1.2.	Der Bikarbonattransport	31
4.2.	Epitheliale Transportmechanismen des Psalters: Ableitung der Versuchskonzepte ...	33
4.3.	Bestimmung der Transportraten von HCO_3^-	34
4.4.	Triebkräfte: Bedeutung von Chlorid	35
4.4.1.	Hydrochlorothiazid.....	35
4.4.2.	Aufhebung des Chloridgradienten.....	37
4.4.3.	Intrazelluläre pH Regulierung.....	37
4.4.3.1.	Amilorid	38
4.4.3.2.	Kurzkettige flüchtige Fettsäuren (SCFA)	38
4.4.3.3.	Ammoniak.....	41
4.5.	Die Rolle des Natriums	42
5.	DISKUSSION.....	47
5.1.	Der Bikarbonattransport am Psalter unter Standardbedingungen.....	47
5.2.	Die Hemmung des Bikarbonattransportes.....	47
5.2.1.	Die Hemmung durch Amilorid	47
5.2.2.	Die Hemmung durch HCTZ	48
5.3.	Der Einfluss von Elektrolytkonzentrationen	49
5.3.1.	Der Einfluss der mukosalen Erhöhung der Chloridkonzentration	49
5.3.2.	Die Bedeutung der mukosalen Natriumkonzentration	51
5.3.3.	Kurzkettige flüchtige Fettsäuren (SCFA).....	52
5.3.3.1.	Acetat	53
5.3.3.2.	Butyrat.....	54
5.3.4.	Der Einfluss von Ammoniak.....	54
5.4.	Anmerkungen zur Methode	55
5.5.	Schlussfolgerungen für ein Modell des omasalen HCO_3^- Transportes	57
6.	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	60
6.1.	Zusammenfassung.....	60
6.2.	Summary.....	61
7.	LITERATUR	63

8. ANHANG..... 75

Abbildungen

Abb. 1	Mechanismen des Na^+ gekoppelten Bikarbonattransports (Genfamilie SLC4).....	13
Abb. 2	Schematische Darstellung der Transportmechanismen des Psalterepithels.	16
Abb. 3	Ussing Kammer.....	20
Abb. 4	Darstellung einer Titration (ohne Manipulation).....	26
Abb. 5	Statistische Auswertung der Daten.....	28
Abb. 6	Die Gewebeleitfähigkeit (G_T) gemessen in $[\text{mS}/\text{cm}^2]$	29
Abb. 7	Der Kurzschlussstrom (I_{sc}) gemessen in $[\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}]$	30
Abb. 8	Die Potentialdifferenz (P_d) gemessen in $[\text{mV}]$	31
Abb. 9	Der Bikarbonattransport (J_{ms}) gemessen in $[\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}]$	32
Abb. 10	Schematische Darstellung der Transportmechanismen des Psalterepithels	34
Abb. 11	Der Bikarbonattransport im Versuchsansatz mit HCTZ	36
Abb. 12	Der Bikarbonattransport im Versuchsansatz mit $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Acetat	40
Abb. 13	Der Bikarbonattransport im Versuchsansatz mit $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Natrium	43
Abb. 14	Der Bikarbonattransport bei unterschiedlichen Konzentrationen von Natrium	46
Abb. 15	Schematische Darstellung der bisher nachgewiesenen Transportmechanismen ...	59

Abkürzungen und Definitionen

AE = Anionexchanger; Anionen-Austauscher

Ag = Agar

AgCl = Agarchlorid

bzw. = beziehungsweise

°C = Grad Celsius

CA = carbonic anhydrase; Karboanhydrase

Ca = Kalzium

ca. = circa

Cl = Chlorid

cm² = Quadratzentimeter

CO₂ = Kohlendioxid

d = Tag

DSMO = Dimethylsulfoxyd

g = Gramm

G_T = Leitfähigkeit

h = Stunde

H⁺ = Proton

HCO₃⁻ = Bikarbonat-Anion

H₂CO₃ = Kohlensäure

H₂O = Wasser

H₂SO₄ = Schwefelsäure

HCTZ = Hydrochlorothiazid

in vitro = Vorgänge, die außerhalb des lebenden Organismus stattfinden (lateinisch für im Glas)

in vivo = Prozesse, die im lebenden Organismus stattfinden (lateinisch für in dem Lebenden)

I_{sc} = Kurzschlussstrom

i = intrazellulär

J_{ms} = Flux von mukosal nach serosal

J_{net} = Netto-Flux

J_{sm} = Flux von serosal nach mukosal

K = Kalium

Ko = Kontrollepithelien

kg = Kilogramm

l = Liter

log = Logarithmus

ME = metabolisierbare Energie

Mg = Magnesium

μA = Mikroampère

μeq = Mikroäquivalent

μmol = Mikromol

min = Minute

MJ = Megajoule

ml = Milliliter

mM = millimolar

mmol = Millimol

ms = mukosal-serosal

mS = Millisiemens

mV = Millivolt

n = Epithelanzahl

N = Tieranzahl

Na = Natrium

NaCl = Natrium-Chlorid

NBC = Natrium Bikarbonat Kotransporter

NCBE = natriumgetriebener Chlorid Bikarbonat Austauscher

NH_3 = Ammoniak

NH_4^+ = Ammonium-Ion

NHE = Sodium-hydrogen-exchanger, Natrium-Protonen-Austauscher

NEL = Netto-Energie-Laktation

NaOH = Natronlauge

O_2 = Sauerstoff

p = Irrtumswahrscheinlichkeit

PD = Potentialdifferenz

PD_t = transepitheliale Potentialdifferenz

PEG = Polyethylenglycol

pH = potentia hydrogenii

pH_i = intrazelluläre potentia hydrogenii

pK-Wert = negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante K

post mortem = nach dem Tode

R_G = Gewebewiderstand

R_T = transmuraler Widerstand

s. = siehe

SCFA = short chain fatty acids; kurzkettige flüchtige Fettsäuren

HSCFA = protonierte Form der short chain fatty acids; kurzkettige flüchtige Fettsäuren

SLC = solute carrier (Transporter gelöster Stoffe)

sm = serosal-mukosal

u. a. = unter anderem

u. U. = unter Umständen

v. a. = vor allem

V = Versuchsepithelien

vH-ATPase = vakuoläre Protonen-ATPase

\bar{x} = arithmetisches Mittel

Zn = Zink

1. EINLEITUNG

Der Psalter ist der kleinste Vormagenabschnitt der Wiederkäuer. Er absorbiert Wasser und Elektrolyte (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , NH_4^+). Neue Untersuchungen der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass der Blättermagen über die *einzigartige* Fähigkeit verfügt, *gleichzeitig* HCO_3^- (eine Base) *und* protonierte kurzkettige Fettsäuren (protonierte short chain fatty acids = HSCFA) zu transportieren (siehe Abb. 2). Dieser *parallele Transport einer Base und Säure* erfordert effektive Mechanismen der Regulation des intrazellulären pH Wertes, pH_i , um den HCO_3^- Transport zu ermöglichen. Das heißt, dass Faktoren, die den pH_i beeinflussen, indirekt auch den Transport von HCO_3^- verändern müssten. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene potenziell den pH_i beeinflussende Faktoren verändert, um ihre Auswirkung auf den Bikarbonattransport zu beobachten. Dadurch sollte die vermutete Abhängigkeit des Transportes von einem konstanten pH_i verifiziert werden.

Durch den Na^+/H^+ Austauscher (NHE) in der luminalen Membran (NHE3) werden Protonen aus der Zelle in das Lumen transportiert. Dieser Mechanismus des Protonentransportes und somit der pH_i Regulierung ist wohlbekannt und gut dokumentiert (Ali, Shen et al., 2006). In der Arbeit wurde NHE3 durch den Einsatz eines selektiven Blockers (Amilorid) gehemmt, um so die vermutete Interaktion mit dem Bikarbonattransport zu überprüfen.

Bei der apikalen Aufnahme von HSCFA in die Zelle werden intrazellulär Protonen freigesetzt (Ali, Shen et al., 2006), die den pH_i verändern können. In entsprechenden Versuchsansätzen mit unterschiedlichen SCFA Konzentrationen in der luminalen Pufferlösung wurde der Effekt von SCFA auf den Bikarbonattransport bestimmt. Mit einem entsprechender Versuchsansatz wurde die mögliche Wirkung eine apikalen Aufnahme von Ammoniak (NH_3) auf den Bikarbonattransport geprüft (Krüzfeldt, 2002). Hier wurde ein Anstieg des pH_i durch intrazelluläre Protonierung von NH_3 zu NH_4^+ vermutet (Martens, Krüzfeldt et al., 2004).

Chlorid wird als Triebkraft des Bikarbonattransportes am Psalter angesehen (Tiling, 1997; Niebuhr, 2003; Wegeler, 2008). Es besteht einerseits ein transepithelialer Gradient ($m < s$). Andererseits wird ebenfalls ein transmembranärer Gradient (apikal) angenommen, der die Bikarbonataufnahme durch die apikale Membran energetisiert. Die Bedeutung dieser Chloridgradienten für den Bikarbonattransport sollte im Rahmen der Arbeit genauer untersucht werden.

Natrium ist an der pH_i Regulierung (Na^+/H^+ Austauscher) beteiligt und auch für den vermuteten transmembranären Chloridgradienten mitverantwortlich (Na^+/Cl^- Kotransporter) (Ali, 2005; Wegeler, 2008) und somit indirekt mit dem Transport von Bikarbonat verbunden.

Da die luminale Na^+ Konzentration in Abhängigkeit von der Fütterung jedoch stark schwankt, könnte eine Beeinflussung des Bikarbonattransportes bei verringerten Natriumkonzentrationen auftreten. Diese Hypothese und damit der Nachweis einer indirekten Kopplung des Na^+ Transportes (Na^+/H^+ Austauscher und Na^+/Cl^- Kotransport) an den Bikarbonattransport wurde durch die schrittweise luminale Verringerung der Na^+ Konzentration überprüft.

Alle Ansätze der vorliegenden Untersuchung wurden *in vitro* an isolierten Psalterepithelien, durchgeführt. Dabei wurde eine Kombination aus Ussing Kammer Technik und pH-Stat-Methode eingesetzt, um im Ergebnis den Einfluss der pH_i Regulierung und des Chlorids auf den Bikarbonattransport genauer zu definieren.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Anatomische und histologische Aspekte des Psalters

Der Blättermagen (Psalter) ist der dritte Abschnitt und die kleinste Magenabteilung des drüsenlosen Vormagensystems der Wiederkäuer (Favilli, 1937; Yamamoto, Kitamura et al., 1991a; Nickel, 1999). Er liegt zwischen Haube (Retikulum) und Labmagen (Drüsenmagen) im mittleren intrathorakalen Abschnitt der Bauchhöhle (Nickel, 1999). Seine kutane Schleimhaut bildet zahlreiche, unterschiedlich große, mondsichelförmige Schleimhautfalten, die als Psalterblätter (*Laminae omasi*) in das Innere des kugeligen, seitlich leicht abgeflachten Organs hervorragen. Die Psalterblätter führen zu einer erheblichen Oberflächenvergrößerung (Nickel, Schummer et al., 1999). Die Anzahl wird beim Schaf mit 53 (McSweeney, 1988) bzw. zwischen 72 und 80 (Towne and Nagaraja, 1990; Nickel, Schummer et al., 1999) angegeben, wodurch die gesamte Schleimhautoberfläche des im Verhältnis sehr kleinen Blättermagens ca. $\frac{1}{4}$ der Gesamtoberfläche der beiden anderen Vormägen beträgt (Engelhardt and Hauffe, 1975a).

Es werden vier Blättergrößen unterschieden (McSweeney, 1988), welche in der Reihenfolge 1-4-3-4-2-4-2-4-3-4-1 angeordnet sind (Lubis and O'Shea, 1978; Yamamoto, Kitamura et al., 1994). Ihre freien Ränder verlaufen parallel zu dem Psalterkanal. Die Blätter sind mit kleinen Papillen besetzt (Nickel, Schummer et al., 1999), die samt ihrer Hornkappen von oral (haubenwärts) nach aboral (labmagenwärts) abflachen (Scott, 1971). Die Psalterblätter der 1. –3. Ordnung haben drei dünne Muskelschichten, den kleinsten (4. Ordnung) fehlt die mittlere Schicht. Die mittlere entstammt dem Stratum circulare der *Tunica muscularis* der Psalterwand und erstreckt sich bis zum freien Rand des Blattes. Die ihr anliegenden dünnen Muskelblätter stellen die *Laminae muscularis mucosae* der beiden Schleimhautschichten dar und kreuzen mit ihren Fasern die der mittleren Muskelschicht (Trautmann, 1949; Yamamoto, Kitamura et al., 1991b).

Das Psalterepithel hat eine charakteristische Struktur. Es ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel. Die Zusammensetzung des Stratum corneum aus den Hornzellen des Typs A und B, das teilweise Fehlen eines echten Stratum granulosum an den Papillen (Verringerung der Epitheldicke) und die zur Oberfläche vertikal orientierten Parabasal-Intermediärzellen (Vergrößerung der basolateralen Membran) (Yamamoto, Kitamura et al., 1991b) weisen auf die regen epithelialen Transportprozesse hin. Das im interpapillären Bereich sehr dünne Epithel (50-98 μm im nicht verhornten und bis zu 234 μm im verhornten Bereich), wird von einem engmaschigen, subepithelialen Gefäßnetz durchzogen, welches die

Aufnahme und Abgabe von Substanzen ermöglicht (Favilli, 1937; Brownlee and Elliot, 1960; McSweeney, 1988; Yamamoto, Kitamura et al., 1991a; Yamamoto, Kitamura et al., 1994).

Die Mikroflora des Blättermagens entspricht, in reduzierter Anzahl, der des Pansens (Smith, 1984; Towne and Nagaraja, 1990).

2.2. Tierartspezifische Unterschiede zwischen Schaf und Rind

In der Beschreibung des Stofftransportes am Blättermagen werden überwiegend Ergebnisse, die an Schafen gewonnen wurden, aufgeführt, da zwischen Schaf und Rind nicht nur in der Morphologie Unterschiede bestehen (Tiling, 1997). Der Gewichtsanteil des Palters am Magengewicht bzw. Gesamtkörpergewicht beträgt beim Rind ca. 24 % bzw. 3,3 %, beim Schaf hingegen nur 9 % bzw. 0,2 % (Holtenius and Bjornhag, 1989; Van Soest, 1994). Die Blattanzahl ist beim Rind mehr als doppelt so hoch (149 ± 14) als beim Schaf (Towne and Nagaraja, 1990). Auch die relative Blattfläche (McSweeney, 1988) und die Resorptions- und Sekretionskapazität (Edrize and Smith, 1979) sind beim Rind größer als beim Schaf. Die Nettoresorption im Psalter von Wasser und gelösten Stoffen ist beim Rind ebenfalls höher (Oyaert and Bouckaert, 1961; Engelhardt and Hauffe, 1975a; Edrize and Smith, 1986a). Außerdem können die beiden Tierarten in selektive (Schaf) und nicht selektive (Rind) Gras- und Raufutterfresser unterteilt werden (Hofmann, 1982).

2.3. Allgemeines über den transepithelialen Transport

Es gibt zwei transepitheliale Transportarten für Substanzen: transzellulär und/oder parazellulär. Auf transzellulärem Weg werden Substanzen aktiv durch Pumpen, passiv mit Hilfe von Carriern oder Kanälen transportiert, die die Passage durch die apikale und basolaterale Membran ermöglichen. Ungeladene, fettlösliche Substanzen haben die Fähigkeit, die Zellmembran passiv aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften zu durchqueren, wie zum Beispiel protonierte kurzkettige Fettsäuren. Ihr Transport wird bestimmt durch den chemischen Gradienten. Die Widerstände der apikalen und basolateralen Membranen ergeben zusammen den zellulären Widerstand. Der parazelluläre Widerstand wird bestimmt durch die Qualität der tight junctions. Der Gesamtwiderstand des Epithels (R_T) ergibt sich aus dem zellulären und parazellulären Widerstand.

Abhängig von ihrem Widerstand kann man Epithelien in durchlässige ($R_T < 1000\Omega \cdot \text{cm}^2$) und undurchlässige ($R_T > 1000\Omega \cdot \text{cm}^2$) unterscheiden. Die Leitfähigkeit eines Epithels, G_T in $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$, ist $1/R$.

2.4. Elektrolyttransport im Psalter

2.4.1. Wassertransport

Alle Studien über den Wassertransport im Blättermagen des Schafes zeigen übereinstimmend, dass Wasser resorbiert wird (Ekman and Sperber, 1953; Engelhardt and Hauffe, 1975b; Edrison, Smith et al., 1986b). Die Resorption ist bei kleinen Wiederkäuern jedoch geringer als bei großen (Engelhardt and Hauffe, 1975b; Sklan and Hurwitz, 1985). Allerdings unterscheiden sich bei den Untersuchungen die Größenangaben der Transportraten. In *post mortem* Studien ermittelten Yang und Thomas (1965) Transportraten von 66-67 %, und in *in vivo* Studien wurde die Resorption bei Kälbern auf 50-60 % des Zuflusses geschätzt (Ekman and Sperber, 1953; Smith, 1984). Eine weitere Studie an jungen Stieren beschrieb jedoch eine wesentlich geringere Wasserresorption von ca. 15 % (Edrison and Smith, 1979).

Untersuchungen beim Schaf erfolgten vorwiegend *in vivo*. Hauffe und Engelhardt (1975) stellten eine positive Korrelation der Wasserresorption mit der Resorption von Natrium, kurzkettigen Fettsäuren und Kalium fest. Oyaert (1961) ergänzte diese Beobachtung mit der Erkenntnis, dass die Wasseraufnahme von der luminalen Osmolarität abhängt.

Der prozentuale Resorptionsanteil vom Flüssigkeitszufluss wird mit $13,3 \pm 6,8$ % beschrieben, ca. $29 \pm 22,6$ ml·h⁻¹ beim Schaf (Engelhardt and Hauffe, 1975b). Dieser Anteil bleibt auch bei einem höheren Zuflussvolumen konstant und wird erst bei stark erhöhtem Zufluss geringer.

2.4.1.1. Ammoniak

Über den Transport von Ammoniak am Blättermagen ist relativ wenig bekannt. Oyaert und Bouckaert (1961) beobachteten im Blättermagenausfluss eine Ammoniakkonzentration zwischen 4 und 15 mmol·l⁻¹, die etwa 40 % niedriger war als im Pansen. Eine Konzentrationsabnahme beschrieb auch McSweeney (1986), die jedoch nicht signifikant war. Engelhardt und Hauffe (1975b) berechneten eine Absorption von ca. 0,9 mmol·l⁻¹, unter Berücksichtigung des in das Blättermagenlumen diffundierenden Harnstoffes, aus dem mikrobiell Ammoniak gebildet wird. Krüzfeldt (2002) stellte in einer *in vitro* Studie fest, dass Ammoniak vermutlich überwiegend als NH₃ absorbiert wird.

2.4.2. Kationentransport

2.4.2.1. Natrium

Natrium wird dem Vormagensystem der Wiederkäuer in großen Mengen mit dem Speichel und in geringem Umfang dazu mit Futter zugeführt. Es ist dokumentiert, dass 50 % des Natriums (Speichel plus Futter) vor dem Duodenum bereits wieder absorbiert werden (Pfeffer, Thompson et al., 1970; Gäbel, Bestmann et al., 1991). Die zum Pansen vergleichsweise niedrige Natriumkonzentration im Blättermagen (Sklan and Hurwitz, 1985) unterstützt die Annahme, dass Natrium absorbiert wird. Durch energiereiche Fütterung kann der Natriumtransport erhöht werden (Engelhardt and Hauffe, 1975a). Des Weiteren steigern erhöhte Durchflussraten die absolute Natriumabsorption, senken dafür jedoch die relative (Pfeffer, Thompson et al., 1970; Edriss and Smith, 1979).

Die Größe des Na^+ Transportes verglichen mit der Gewebeleitfähigkeit weist auf einen überwiegend transzellulären Passageweg hin (Martens, 1998). Der transepitheliale elektrochemische Gradient für Natrium erfordert einen aktiven Transport, dem zwei Mechanismen zugrunde liegen: elektrogen und elektroneutral (Martens and Gäbel, 1988; Schultheiss and Martens, 1999).

In vitro Untersuchungen unter Kurzschlussstrombedingungen zeigten hohe unidirektionale Natriumtransportraten, die für einen aktiven Mechanismus sprachen (Harrison, 1971). Unter natriumfreien Bedingungen ist der Kurzschlussstrom aufgehoben worden, was darauf hinwies, dass dieser am Blättermagenepithel vom Natriumtransport abhängt. Da der Natriumtransport jedoch deutlich größer als der Kurzschlussstrom war, verlief ein Großteil des Transportes elektroneutral, vermutlich über einen Na^+/H^+ Austauscher vermittelt.

Na^+/H^+ Austauscher sind amiloridsensitiv. Die Natriumtransportrate wurde auch durch 1 mM Amilorid um 31 % (J_{ms}), bzw. 41 % (J_{sm}) gehemmt, was die Annahme eines Na^+/H^+ Austauschers bestätigte. Der Natrium-Nettotransport (unter Amiloridhemmung) war jedoch noch größer als der Kurzschlussstrom, und Amilorid hatte keinen Effekt auf den Netto-Natriumtransport (J_{ms} und J_{sm} in gleichem Maße reduziert), was einen weiteren elektroneutralen Natriumtransporter vermuten ließ (Martens and Gäbel, 1988; Ali, 2005).

Die Zugabe von Bumetanid (ein Hemmstoff des $2 \text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ Kotransporters) hatte keine signifikante Wirkung, womit ein $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ Kotransport unwahrscheinlich war. Ionenersatzexperimente unterstützten jedoch die Vermutung von Wechselwirkungen zwischen Natrium und Chlorid (Ali, 2005). Unter chloridfreien Bedingungen war $J_{\text{ms}}^{\text{Na}}$ signifikant reduziert (58 %). Bei Bikarbonatfreiheit wurde sowohl der Natriumflux als auch der Chloridflux auf ca. 75 %, bzw. 73 % reduziert. Der Nettoflux und der Kurzschlussstrom

waren nicht verändert. Durch Entzug von Bikarbonat und Chlorid kam es zu einer stärkeren Reduzierung und zum Abfall des Natriumnettotransportes, wobei dieser stets größer als der Kurzschlussstrom war (Martens and Gäbel, 1988). Die Ionenersatzexperimente führten zu der Vermutung eines Na^+/Cl^- Kotransporters in der apikalen Membran, der durch 1 mM Hydrochlorothiazid (HCTZ) gehemmt wurde (Ali, 2005).

Unabhängig vom Autor oder der Methode wurde für Na^+ immer eine Nettoabsorption festgestellt. Die Natriumabsorption wird somit zu einem ermöglicht durch einen elektrogenen amiloridinsensitiven, Ca^{2+} sensitiven Transport (Schultheiss, 1995; Schultheiss and Martens, 1999), der den Kurzschlussstrom bedingt. Zum anderen gibt es elektroneutralen Transport, der durch einen Na^+/H^+ Austauscher und den Na^+/Cl^- Kotransporter vermittelt wird.

2.4.2.2. Kalium

Der Kaliumtransport am Blättermagen wird allgemein als gering beschrieben. In *in vivo* Studien wurde übereinstimmend eine Absorption festgestellt, die erst bei höheren Kaliumkonzentrationen im Futter auftrat (Greene, Webb et al., 1983). Die Absorptionsrate war jedoch geringer als die von Natrium (Oyaert and Bouckaert, 1961), wie auch von Engelhardt und Hauffe (1975a) mit 10 % des Zuflusses ($0,8 \text{ mmol}\cdot\text{h}^{-1}$) bestätigt wurde. *Post mortem* waren die Ergebnisse kontrovers: Es wurde kein Nettotransport (Pfeffer, Bertzbach et al., 1966) und keine Nettoabsorption (Sklan and Hurwitz, 1985) gefunden.

Unter *in vitro* Bedingungen (Kurzschlussstrom) wurde an operativ entnommenen Blättermagenepithelien eine geringe Nettosekretion gezeigt, allerdings nur im Rahmen einer kleinen Anzahl von Versuchen (Harrison, Keynes et al., 1970; Harrison, 1971).

2.4.2.3. Magnesium

Die Ergebnisse zum Magnesiumtransport am Blättermagen variieren ebenfalls. Während Sklan and Hurwitz (1985) eine Nettoabsorption feststellten, fand Pfeffer (1966) eine höhere Magnesiumkonzentration im Blättermagen als im Pansen.

In vivo Untersuchungen zeigten präduodenale Absorption, die fälschlicherweise zuerst dem Blättermagen zugeordnet wurde (Ben-Ghedalia, Tagari et al., 1975). Nach selektiven Magnesiuminfusionen an Magen- und Darmabschnitten konnte beim Schaf der Pansen als Hauptabsorptionsorgan beschrieben werden (Tomas and Potter, 1976; Fitt, Hutton et al., 1979; Martens and Rayssiguier, 1980; Martens and Kasebieter, 1983). Eine Absorption von

Magnesium aus dem Psalter bei Kälbern ist nachgewiesen worden (Edrison and Smith, 1986a). Die Bedeutung für den Magnesiumhaushalt ist jedoch nicht definiert.

2.4.2.4. Calcium

Die Calciumkonzentration im Blättermagen wurde um 50 % höher beziffert als im Pansen (Pfeffer, Bertzbach et al., 1966), was jedoch auf die Phasentrennung zurückzuführen war.

Bei *in vivo* Untersuchungen wurden sowohl eine präduodenale Nettoabsorption (Grace, Ulyatt et al., 1974) als auch eine Nettosekretion gefunden (Pfeffer, Thompson et al., 1970; Ben-Ghedalia, Tagari et al., 1975; Greene, Webb et al., 1983). An isolierten Blättermagenepithelien konnte eine Permeabilität für Calcium in beide Richtungen und eine kleine, aber signifikante Nettoabsorption von Calcium festgestellt werden (Dubberke, 1988; Holler, Breves et al., 1988). Sklan und Hurwitz (1985) stellten jedoch keinen Nettotransport fest.

Es wird eine Abhängigkeit der Nettobewegungen von dem Konzentrationsgradienten des Calciums angenommen. Die Absorption wird als möglich, aber im Vergleich zum Pansen vernachlässigbar angesehen (Dubberke, 1988; Schröder, Vössing et al., 1999).

2.4.3. Anionentransport

2.4.3.1. Kurzkettige flüchtige Fettsäuren

Das Vormagensystem der Wiederkäuer bietet ideale Fermentationsbedingungen. Die Wiederkäuer sind energetisch abhängig von den mikrobiell gebildeten flüchtigen, kurzkettigen Fettsäuren (SCFA). Sie decken ca. 70-80 % ihres Energiebedarfs durch SCFA (Siciliano-Jones and Murphy, 1989; Bergman, 1990). Der Pansen wird als Fermentationsstätte und somit als SCFA Produktionsort angesehen. Es wurde aber bei verschiedenen Studien im Blättermagen eine pansengleiche Protozoen- und Bakterienzusammensetzung festgestellt, wenn auch in geringerer Anzahl (Engelhardt and Hauffe, 1975b; Smith, 1984; McSweeney, 1986). Es kann also angenommen werden, dass eine geringe Menge SCFA (ca. 2-4 %) im Blättermagen gebildet wird (Giesecke and Engelhardt, 1975; Smith, 1984), die Holtenius und Björnhag (1989) für vernachlässigbar halten.

Mehrere *in vivo* und *in vitro* Studien wie Spülungen des Retikulumens, intraruminale SCFA Infusionen oder Blutkonzentrationsbestimmung wurden durchgeführt (Gäbel, Aschenbach et al., 2002). Badawy (1958) erwähnte bereits eine *post mortale* SCFA Absorption im

Blättermagen. Nach Murray (1962) werden 87,5 % der im Pansen gebildeten SCFA auch dort absorbiert, die Hälfte der restlichen 12,5 % im Blättermagen. Dies wurde von Smith (1984) und Engelhardt und Hauffe (1975a) bestätigt. Die Zahlen wurden jedoch mit dem Hinweis auf die blättermageneigene SCFA Produktion auf 85 % Absorption im Pansen und 10 % im Blättermagen korrigiert. Es scheint keine klaren tierartlichen Unterschiede in der Absorption von SCFA zu geben. Bei Jungbullen wird ebenfalls die Hälfte des Zuflusses (SCFA) absorbiert (Edrison and Smith, 1979).

Aufgrund der *in vitro* Ergebnisse von Ali (2005) wird angenommen, dass die SCFA per Diffusion und wahrscheinlich überwiegend in der protonierten Form transportiert werden. In dieser Studie wurde gezeigt, dass dieser SCFA Transport teilweise amiloridsensitiv ist, was darauf schließen lässt, dass es zu Wechselwirkungen zwischen dem Transport von SCFA und dem des elektroneutralen Na^+/H^+ Austauschers kommt.

2.4.3.2. Phosphat

In vivo Versuche haben zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt. Einerseits ergaben sich Hinweise auf eine Nettosekretion (Grace, Ulyatt et al., 1974; Ben-Ghedalia, Tagari et al., 1975; Grace, 1981). Andererseits wurde eine Absorption beobachtet, die jedoch stets gering war (Wright, 1955; Engelhardt and Hauffe, 1975a; Engelhardt and Hauffe, 1975b; Care, 1994). *Post mortem* Untersuchungen zeigten keine Veränderungen des Phosphorgehaltes bezogen auf die jeweilig genutzten Marker zwischen Pansen und Blättermagen (Pfeffer, Bertzbach et al., 1966; Sklan and Hurwitz, 1985). In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass der Transport von Phosphationen im Blättermagen in beide Richtungen möglich ist (Dubberke, 1988; Holler, Breves et al., 1988). Der Transport schien sich aus einem potentialabhängigen Anteil und einem elektroneutralen, potentialunabhängigen Anteil zusammensetzen. Es gab offenbar eine para- und eine transzelluläre Komponente. Obwohl die Phosphorabsorption der Wiederkäuer hauptsächlich im Dünndarm stattfindet (Breves, 1991) und die Ergebnisse der Untersuchungen widersprüchlich waren, geht man von einer potenziell passiven Absorption (Diffusion) im Blättermagen aus.

2.4.3.3. Bikarbonat

Ekman und Sperber (1953) untersuchten den Bikarbonat- und Chloridgehalt im Blättermagen von frisch geschlachteten Kühen. Sie stellten fest, dass die Bikarbonatkonzentration kontinuierlich von oral nach aboral abnahm. Diese Abnahme wurde in verschiedenen *in vivo* Studien bestätigt (Oyaert and Bouckaert, 1961; Pfeffer, Bertzbach et al., 1966; Edrize and Smith, 1979; Edrize and Smith, 1986a (Jungbullen)).

Der CO₂ und HCO₃⁻ Gehalt am Blättermagenausgang (24 mmol·h⁻¹) war durchschnittlich halb so hoch wie im Pansen und lässt daher eine Absorption vermuten (Oyaert and Bouckaert, 1961; Engelhardt and Hauffe, 1975b). Bikarbonat wird mit 50 % des Zuflusses (3,9 mmol·h⁻¹) wie auch die SCFA sehr effektiv absorbiert (Engelhardt and Hauffe, 1975b). So wird die Pufferkapazität gesenkt und eine Ansäuerung im Labmagen erleichtert (Oyaert and Bouckaert, 1961; Engelhardt and Hauffe, 1975b).

Gleichzeitig mit dem Abfall der Bikarbonatkonzentration wurde proportional ein Anstieg des Chloridgehaltes beobachtet. Es wurde angenommen, dass diese zwei Ionen abhängig voneinander transportiert werden, und zwar als Chloridsekretion und Bikarbonatabsorption (Ekman and Sperber, 1953; Oyaert and Bouckaert, 1961; Engelhardt and Hauffe, 1975b).

In vitro Untersuchungen zum Bikarbonattransport gibt es bisher nur vereinzelt. Bikarbonat ist ein Ion, das sich in wässriger Lösung in einem Gleichgewicht mit CO₂ befindet:



Formel 1: Umsetzung von CO₂ + H₂O mit Hilfe der Karboanhydrase-Reaktion

Der Hauptteil der Erkenntnisse über den Bikarbonattransport stammt aus *in vitro* Experimenten, in denen durch Ionenersatz der Transportmechanismus von Bikarbonat indirekt analysiert wurde. Schultheiss (1995; 1999) beschreibt, dass Chlorid und Bikarbonat sich gegenseitig beeinflussen und von dem elektroneutralen Natriumtransport abhängig sind.

Tiling (1997) stellte einen erhöhten Chloridtransport in Richtung der bikarbonathaltigen Seite fest, wenn auf dieser Seite Chlorid durch Bikarbonat ersetzt wurde. Diese Beobachtung war bei einem Ersatz des Chlorids durch SCFA (flüchtige kurzkettige Fettsäuren) und Glukonat nicht wiederholbar, d.h. dass der Ersatz von Chlorid funktionell nur mit Bikarbonat möglich war. Aufgrund dieser Befunde wurde ein Anionenaustauscher für Chlorid und Bikarbonat in der apikalen und basolateralen Membran als wahrscheinlich angenommen. Die Ionen wurden entsprechend den transepithelialen Gradienten transportiert. Dieser angenommene

Mechanismus bietet auch eine Erklärung für die Widersprüchlichkeit zwischen *in vivo* (Cl⁻ Sekretion) und *in vitro* (Cl⁻ Absorption) Versuchen.

Mittels der Kombination von pH-Stat-Methode und Ussing Kammer Technik konnte dann erstmals die Bikarbonatabsorption indirekt durch die serosale pH Anhebung gemessen und bestätigt werden (Niebuhr, 2003). Der durch Bikarbonat verursachte serosale pH Anstieg wurde gemessen und mit Schwefelsäure gegentitriert. Die Säuremenge konnte direkt proportional in die transportierte Bikarbonatmenge umgerechnet werden. Weiterhin wurde bestätigt, dass der Bikarbonattransport chloridabhängig und vermutlich transzellulär ist. Eine luminale Osmolaritätserhöhung, die den parazellulären Passageweg erhöht, hatte keine Auswirkung (Niebuhr, 2003).

2.4.3.4. Chlorid

Im Blättermagen wurden bei Schafen und Rindern nach der Schlachtung die Ingesta analysiert und eine signifikante Zunahme von Chlorid im Verhältnis zum Marker PEG (Polyethylenglycol) festgestellt. Es findet also eine Nettosekretion von Chlorid statt (Pfeffer, Bertzbach et al., 1966), durch die die luminale Konzentration steigt. Engelhardt und Hauffe (1975a) beobachteten diese Nettosekretion dann auch *in vivo*.

Die Höhe der Konzentrationszunahme variiert beim Schaf zwischen 70 und 78 % (Pfeffer, Bertzbach et al., 1966). Es wurden aber auch geringere, nicht signifikante Zunahmen (Sklan and Hurwitz, 1985) beschrieben. Die Chloridkonzentration erreichte allerdings nie die Plasmachloridkonzentration (Ekman and Sperber, 1953).

Beim Rind wurde von proximal nach distal ein kontinuierlicher Anstieg der Chloridkonzentration bis auf das Vierfache der Konzentration im Pansen gemessen, während gleichzeitig die Bikarbonatkonzentration abnahm (Ekman and Sperber, 1953). Auch *in vivo* Untersuchungen am Psalter von Jungbullen zeigten eine beträchtliche Sekretion, in etwa das Doppelte des Zuflusses (Edriss and Smith, 1979). Im Blättermagenausfluss (im Mittel 47 mmol) des Schafes wurde *in vivo* ebenfalls ein Anstieg auf das Doppelte bis Vierfache der Chloridkonzentration der Pansenflüssigkeit (16 mmol) festgestellt (Oyaert and Bouckaert, 1961).

In vitro fanden die Autoren mehrheitlich eine Nettoabsorption, die jedoch konzentrationsabhängig nur bei unphysiologisch hohen Konzentrationen von Chlorid auftrat (Harrison, 1971; Martens and Gäbel, 1988; Höfelmeier, 1991). Unter physiologischen Verhältnissen (Cl⁻ Konzentration serosal > mukosal), wie in den Untersuchungen von Tilling (1997), wurde auch *in vitro* eine Chloridsekretion beobachtet.

Die vorliegenden Ergebnisse über die Cl^- Sekretion und die Bikarbonatabsorption lassen die Schlussfolgerung zu, dass der Transport dieser beiden Anionen gekoppelt ist und mit Hilfe von Anionenaustauschern ermöglicht wird. Zu den infrage kommenden möglichen Transportproteinen dieser Anionen liegen aufgrund von Untersuchungen an Modellepithelien bzw. Zellkulturen umfangreiche Erkenntnisse vor. Eine kurze Zusammenfassung dieser Transportproteine erleichtert die mögliche Zuordnung der Transportmechanismen für Chlorid und Bikarbonat des Blättermagens.

2.4.4. Molekularbiologie der Anionentransporter

Bikarbonattransporter sind funktionell in drei Gruppen zu unterteilen (McMurtrie, Cleary et al., 2004), gehören jedoch nur 2 Genfamilien an (Alper, Darman et al., 2002):

- 1) die Na^+ getriebenen Anionenaustauscher (NBC, NDCBE), Genfamilie SLC4
- 2) die Na^+ unabhängigen $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ Austauscher (AE), Genfamilie SLC4
- 3) Anionenaustauscher der Genfamilie SLC26

Die **Na^+ getriebenen Anionenaustauscher** gehören zur Genfamilie SLC4, bestehend aus dem $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Kotransporter und dem Na^+ getriebenen Cl^-/Basen Austauscher, zu dem der Na^+ getriebene $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher (NDCBE) zählt (Romero, Fulton et al., 2004). Die $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Kotransporter (NBC) transportieren Natrium und Bikarbonat elektroneutral (NBC3), bzw. elektrogen (NBC1, NBC4) (siehe Abb. 1). NBCs sind im Herzen, der Skelettmuskulatur und Teilen des Intestinaltraktes zu finden. Der Na^+ getriebene Cl^-/Base Austauscher ist elektroneutral. Es werden verschiedene Mechanismen des Austauschers beschrieben: Natrium und Bikarbonat, Natrium und Carbonat oder Natriumcarbonat werden gegen Chlorid ausgetauscht. Am Psalter scheint die Richtung des Austausches von Bikarbonat und Chlorid gradientenabhängig zu sein und somit das Vorliegen eines Anionenaustauschers wahrscheinlich. Außerdem wurde durch den Einsatz von Hydrochlorothiazid (HCTZ) ein Na^+/Cl^- Kotransporter am Psalter nachgewiesen (Ali, 2005). So ist die beobachtete Abhängigkeit des Bikarbonattransportes vom elektroneutralen Natriumtransport (Schultheiss, 1995; Schultheiss and Martens, 1999) vermutlich durch die Wechselwirkungen des Bikarbonattransporters mit dem NHE und dem Na^+/Cl^- Kotransporter zu erklären. Ein Na^+ gekoppelter Bikarbonat ist daher für den Psalter als unwahrscheinlich anzusehen.

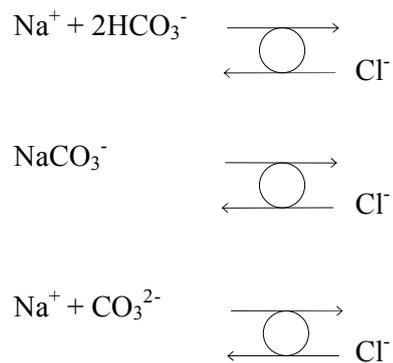


Abb. 1 Mechanismen der NDCBE (Na^+ gekoppelter Bikarbonattransport; Genfamilie SLC4)

Zu den Natrium unabhängigen **$\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ Austauschern (AE)**, die ebenfalls zur Genfamilie SLC4 zählen, gehören drei Isoformen (AE1, AE2, AE3). Die AEs tauschen elektroneutral über die Zellmembran Bikarbonat und Chlorid im Verhältnis 1:1 aus. Der AE1 kommt in Erythrozyten und der Niere, der AE3 im Gehirn, dem Herzen, der Netzhaut und erregbaren Geweben vor. Beide Austauscher sind daher mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht am Psalter zu finden. Der AE2 hingegen ist basolateral in fast allen Epithelien zu finden, und die mRNA wurde auch im Psalterepithel nachgewiesen (Wegeler, 2008). Der AE4 gehört zwar phylogenetisch zu den AEs, ist jedoch genetisch den NBCs ähnlicher und wird deshalb zu dieser Familie gezählt (Tsuganezawa, Kobayashi et al., 2001).

Alle drei Isoformen der AEs haben eine ähnliche Struktur mit drei abgrenzbaren Bereichen. 1) Einen Bereich im Zytosol mit Aminoende, der für Protein-Protein Interaktion mit Zytosolproteinen, metabolischen Enzymen und Zytosolskelettelementen zuständig ist (Low, 1986). 2) Einem Membranbereich mit Karboxylende (COOH), bestehend aus 12 transmembranären Segmenten (Popov, Tam et al., 1997), der verantwortlich für den Anionenaustausch ist (Grinstein, Ship et al., 1978). 3) Das Karboxylende des Zytosolschwanzes kann aufgrund seiner unabhängigen Faltung und Funktion als dritter Bereich angesehen werden. Es hat eine Bindungsstelle für die Karboanhydrase II (CAII) (Vince and Reithmeier, 1998; Vince and Reithmeier, 2000). Diese stellt die Basis für das Bikarbonattransportmetabolon dar, einen Membranproteinkomplex.

Die dritte Gruppe sind die **Anionenaustauscher der Genfamilie SLC26**. Sie besteht aus 11 Genen (Everett and Green, 1999), welche Cl^- , SO_4^{2-} , OH^- , HCO_3^- , Oxalat- und Formiatanionen mit unterschiedlicher Präferenz transportieren (Soleimani, Greeley et al., 2001). Nur für SLC26A3 (DRA = Down Regulated Adenoma), SLC26A4 (Pendrin),

SLC26A6 (PAT-1) und SLC26A7 wurde ein Cl/Base (HCO_3^- oder OH^-) Austausch beschrieben. Pendrin kommt in der Schilddrüse, dem Innenohr und der Niere vor. PAT-1 ist weit verbreitet und liegt in einer Vielzahl von Geweben vor. DRA ist im Intestinaltrakt, den Schweißdrüsen, dem Pankreas und der Prostata zu finden. Alle HCO_3^- Transportproteine, außer DRA, haben am Karboxylende eine Bindungsstelle für die CA. DRA benötigt die CA jedoch ebenfalls in physischer Nähe um seine volle Transportkapazität zu nutzen (McMurtrie, Cleary et al., 2004). CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) wird als Bindungsglied zwischen DRA und CA vermutet (Sterling, Reithmeier et al., 2001; Sterling and Casey, 2002). Aufgrund der Lokalisation im Intestinaltrakt (Darm) wurde das Vorkommen von DRA auch im Psalterepithel angenommen. CFTR und DRA wurden beide am Psalter des Schafes von Wegeler molekularbiologisch nachgewiesen (2008). Aufgrund der allgemeinen Transportfunktion können diese vier Transporter (DRA, PAT, Pendrin und SLC26A7) zur Superfamilie der Bikarbonattransporter (Anionenaustauscher) gezählt werden.

Bedeutung der Karboanhydrase (CA): An HEK293 Zellen wurde gezeigt, dass sich die CAII an das zytoplasmatische Kohlenstoffende des AE1 bindet (Sterling, Reithmeier et al., 2001). In weiteren Studien wurde beobachtet, dass auch AE2 und AE3 die säurehaltige Region am Karboxylende haben, die sie befähigt, sich an CAII zu binden (Vince and Reithmeier, 2000). Dieses CA Bindungsmotiv wurde bei allen Bikarbonattransportern nachgewiesen, außer bei SLC26A3 (DRA). Nachdem die säurehaltige Bindungsstelle der AEs festgestellt worden war, schien es logisch, dass die CA eine entsprechende basische Region aufweist, die an AE bindet (Vince, Carlsson et al., 2000). Die Verbindungsstelle der AEs scheint von einer hochkonservativen Region um Leucin abhängig zu sein. Durch Mutation wurde der Verlust der Aminosäure herbeigeführt, und ohne diese AS war der Transporter unfähig, die CA zu binden. Bei der Karboanhydrase scheint die entscheidende Region in den ersten 17 Aminosäuren (AS) des Stickstoffendes lokalisiert zu sein und durch elektrostatische Interaktion mit Histidin- oder Lysin-Resten zu funktionieren (Vince, Carlsson et al., 2000; Reithmeier, 2001). Es entsteht ein so genanntes Transportmetabolon.

Durch die CA wird HCO_3^- zu H_2O und CO_2 umgesetzt und so der transmembranäre Gradient maximiert, wie z.B. durch die CAII intrazellulär (McMurtrie, Cleary et al., 2004), bzw. auf der extrazellulären Seite der Membran HCO_3^- produziert und so der Gradient vergrößert, wie durch die CAIV (Dahl, Jiang et al., 2003). Die CAIV ist extrazellulär lokalisiert und bindet am vierten extrazellulären Looping einer konservierten Region der Bikarbonattransporter (Alvarez, Loiselle et al., 2003). Experimente identifizierten die CAIV als extrazelluläre

Komponente des Transportmetabolons. Die CA kann als essentielle Untereinheit für SLC4AE vermittelten $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ Austausch gesehen werden (Romero, Fulton et al., 2004).

Die bisher vorliegenden Daten unterstützen die Annahme von Anionenaustauschern in der apikalen und basolateralen Membran des Psalterepithels (s. Abb. 2). Der Nachweis von DRA und AE2 bestätigen diese Annahme ebenfalls, wenn auch die Lokalisation der festgestellten Anionenaustauscher (apikale oder basolaterale Membran) nicht bekannt ist. Ein Na^+ gekoppelter Anionentransporter erscheint unwahrscheinlich und die mögliche Koppelung mit der CA ist nicht definiert.

2.4.5. Passage von Futterpartikeln

In den ersten Studien der Physiologie des Blättermagens wurde vermutet, dass es zur Zerkleinerung und Retention von Futterpartikeln durch die Reibung zwischen den Blättern kommen würde (Mangold, 1950). Poppi (1980) stellte jedoch fest, dass die Partikel beim Verlassen des Blättermagens nur geringfügig kleiner waren als beim Austritt aus dem Pansen. Untersuchungen über die Verweildauer von Futterpartikeln im Blättermagen ergaben, dass Pansen- und Blättermagenfüllung positiv korrelieren (Weston and Cantle, 1984) und kleinere Partikel den Blättermagen schneller passieren als große (Engelhardt and Hauffe, 1975a; Weston and Cantle, 1984).

2.4.6. Zusammenfassung

Der dritte Abschnitt des Vormagensystems der Wiederkäuer ist der Blättermagen. Durch die Auffaltung seiner Schleimhautoberfläche und seinen anatomisch–histologischen Aufbau bietet er eine große Absorptionskapazität. Eine Absorptionsfunktion wurde übereinstimmend für Wasser, Fettsäuren, Bikarbonat, Ammoniak, Phosphat, Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium festgestellt. Für Chlorid ergibt sich eine Nettosekretion.

Die für die eigenen Untersuchungen wichtigen Transportmechanismen sind in der Abbildung 2 schematisch zusammengefasst worden.

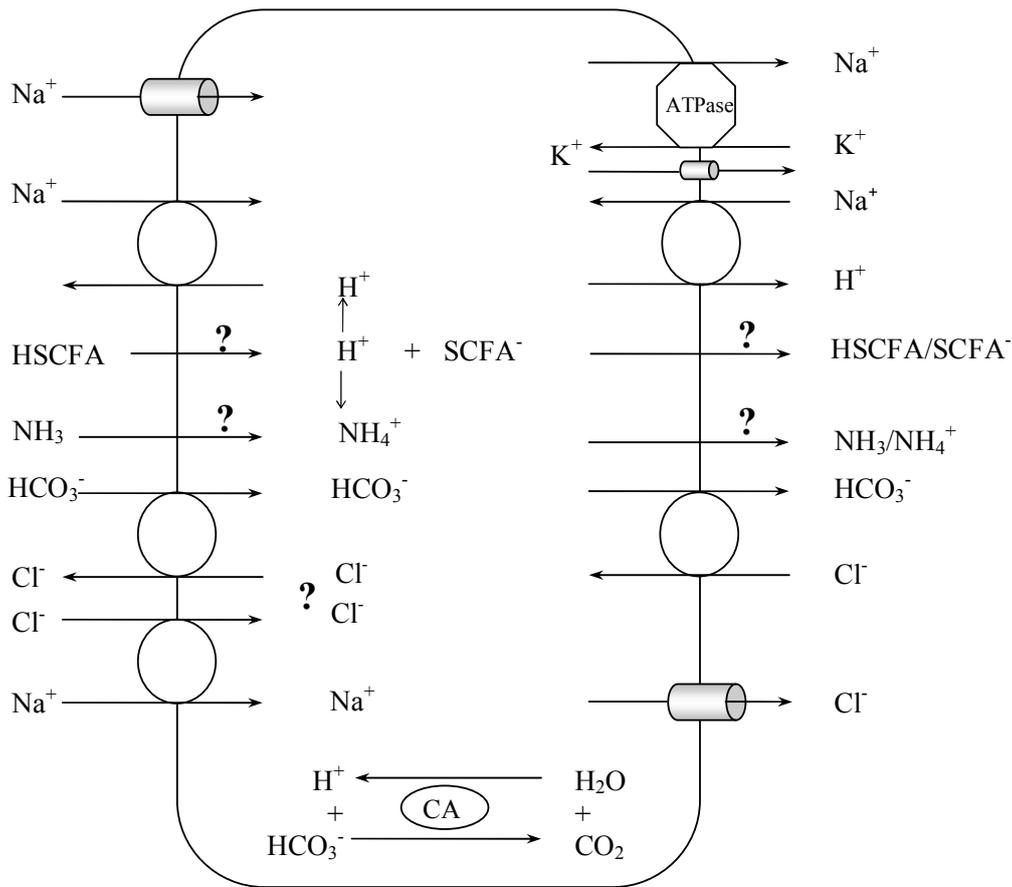


Abb. 2 Schematische Darstellung bisher nachgewiesener bzw. vermuteter Transportmechanismen des Psalterepithels sowie deren mögliche Interaktionen. Carrierproteine sind kreisförmig, Kanäle sind zylinderförmig und die Na^+/K^+ ATPase ist als Sechseck dargestellt. Das Oval stellt das Enzym Karboanhydrase dar.

Die Abb. 2 fasst die bisher charakterisierten Transportmechanismen für Na^+ , Cl^- , Bikarbonat, SCFA und NH_3 zusammen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die verschiedenen Zellschichten in einem Transportkompartiment vereinfacht dargestellt. Bikarbonat wird apikal im Austausch gegen Cl^- mit Hilfe eines Anionenaustauschers aufgenommen und bedingt daher eine Chloridsekretion, wie sie immer *in vivo* beobachtet wird (siehe Literatur). Chlorid wird als Triebkraft der Bikarbonataufnahme angesehen. Die Passage von Bikarbonat durch die basolaterale Membran erfolgt ebenfalls durch einen Anionenaustauscher (Cl^- Aufnahme und HCO_3^- Abgabe). Die ungestörte Diffusion von Bikarbonat durch die verschiedenen Zellschichten des Psalterepithels von apikal nach basolateral setzt voraus, dass der pH_i im Zytosol weitgehend konstant gehalten wird. Eine molekulare Zuordnung der apikalen und

basolateralen Anionenaustauscher ist trotz des Nachweises der mRNA von DRA und AE2 (Wegeler, 2008) zurzeit nicht möglich.

Die Transportprozesse von HSCFA und NH_3 sowie der Na^+/H^+ Austauscher haben potenziell Einfluss auf den intrazellulären pH (pH_i) und damit indirekt wahrscheinlich auch den Transport von Bikarbonat. Es war daher die Absicht der vorliegenden Untersuchungen diese möglichen Interaktionen aufzuzeigen.

Die Bedeutung des Chlorids für den Bikarbonattransport ergibt sich einerseits aufgrund der Tatsache, dass die angenommenen Anionenaustauscher dieses Anion transportieren, und andererseits als mögliche Triebkraft für den passiv erfolgenden Anionenaustausch, der indirekt durch den Na^+/Cl^- Kotransport bzw. durch die transepithelialen Cl^- Gradienten beeinflusst wird. Der Nachweise dieser möglichen Bedeutung für den Bikarbonattransport war auch Gegenstand dieser Untersuchungen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Versuchstiere

Die verwendeten Gewebe wurden von institutseigenen Tieren (von verschiedenem Gewicht, Alter und Geschlecht) und Tieren unterschiedlicher Herkunft gewonnen. Diese wurden nach Aufstallung 4 Wochen unter kontrollierten Bedingungen am Institut für Veterinär Physiologie gehalten und gefüttert.

Die Tiere erhielten Heu ad libitum (1,5 kg/Tier und Tag). Heu wurde zweimal täglich nachgelegt, so dass eine gleichmäßige Futteraufnahme möglich war. Alle Tiere hatten permanenten Zugang zu frischem Trinkwasser und Salzlecksteinen.

3.2. Isolation und Präparation der Psalterschleimhaut

Die Präparation und Inkubation der Psalterschleimhaut wurde detailliert beschrieben (Aalkjaer, Frische et al., 2004). Die Tiere wurden in einem nahe gelegenen Schlachthof nach Betäubung durch Entbluten getötet. Im direkten Anschluss wurde die Bauchhöhle eröffnet, die Vormägen entnommen und der vorverlagerte Blättermagen mit einer gebogenen Schere abgetrennt. Entlang der Psalterrinne wurde der Blättermagen eröffnet und die größeren Blätter wandnah abgeschnitten. Die Psalterblätter wurden durch eine Spülung mit kalter Transportpufferlösung (s. Anhang, Kapitel 8) von Futterpartikeln grob gereinigt und anschließend mit körperwarmer Transportpufferlösung gespült, bis die Lösung klar blieb. Die serosale Seite der Blätter wurde freigelegt durch stumpfe Trennung der Doppelschicht, beginnend am proximalen Teil (zum Ostium reticulomasicum ausgerichtet).

Das isolierte Epithel wurde in körperwarmer Pufferlösung (s. Transportpuffer im Anhang, Kapitel 8) inkubiert und mit 90 % O₂ und 10 % CO₂ begast. So konnte der physiologische pH von 7,4 stabil und die Vitalität des Gewebes erhalten werden.

Von der Schlachtung bis zum Einspannen des Epithels in die Ussing Kammer vergingen durchschnittlich 40 min.

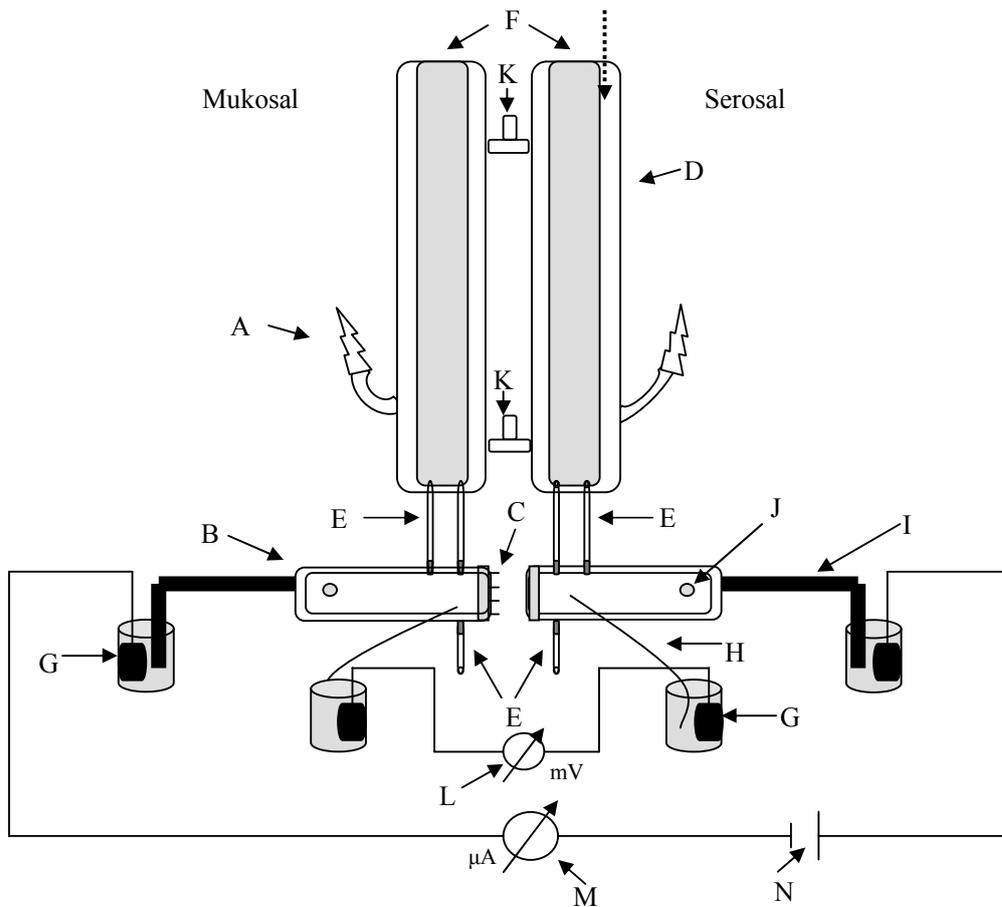
3.3. Messmethode/-prinzip

Für die Untersuchungen wurde die pH-Stat-Methode mit der Ussing Kammer Technik kombiniert.

3.3.1. Ussing Kammer

Für die durchgeführten Versuche wurde das klassische Prinzip der Ussing Kammer modifiziert. Dies war notwendig, da das elektroneutral transportierte Molekül HCO_3^- die Eigenschaft hat, in einem Gleichgewicht mit dem flüchtigen CO_2 zu stehen. Dieser Umstand ließ die sonst angewandte Untersuchung von Transportraten mittels Isotopentechnik nicht zu. Üblicherweise sind in der Ussing Kammer (Ussing and Zerahn, 1951; Stevens, 1964; Ferreira, Harrison et al., 1966) die Ionenzusammensetzungen der Inkubationslösung auf beiden Seiten des Epithels gleich. Von diesem Prinzip wurde in den durchgeführten Versuchen abgewichen. Das vorrangige Ziel des gewählten Versuchsansatzes war, den HCO_3^- Transport unter den *in vivo* gegebenen Ionengradienten zu bestimmen. Die Ussing Kammer Bedingungen (Kurzschluss) sind daher nur zur Kontrolle der Vitalität durch Bestimmung des elektrischen Gradienten und der klassischen elektrophysiologischen Parameter wie Kurzschlussstrom (I_{sc}) und Gewebeleitfähigkeit (G_T) eingesetzt worden.

Weiterhin wurde auf der serosalen Seite des Epithels eine ungepufferte Lösung vorgelegt, um den Anforderungen der pH-Stat-Methode gerecht zu werden. So ist die mukosale Seite des Epithels in der Ussing Kammer mit 16 ml HCO_3^- haltiger, gepufferter Lösung gefüllt und mit Carbogen begast (10 % CO_2 und 90 % O_2). Die serosale Seite enthält 16 ml einer ungepufferten, HCO_3^- freien Lösung und wird mit reinem Sauerstoff begast (100 % O_2).



Legende:

- A = Gasfritten
- B = Plexiglas-Kammer zum Einspannen des Epithels
- C = Nadeln zum Halten des Epithels sowie zum Zusammenbauen der Kammern
- D = Doppelwandiges Röhrensystem für den Puffer; der äußere Mantel dient dem Beheizen
- E = Gummischläuche
- F = Öffnungen zum Einfüllen von Puffer und Lösungen
- G = Elektrodenbehälter mit KCl
- H = Vordere Ag/AgCl-Brücke; Potentialelektrode
- I = Hintere Ag/AgCl-Brücken; Stromelektrode
- J = Bohrung zum Eindrehen der hinteren Brücken; für die vorderen Brücken sind kleinere Bohrlöcher vorhanden
- K = Anschluß an Wasserbad
- L = Potentiometer
- M = Amperemeter
- N = Stromzufuhr
- > pH Messung und Titration

Abb. 3 Ussing Kammer

3.3.2. Elektrophysiologisches Messprinzip

Zur Messung der elektrischen Parameter dienen zwei gewebe-nahe Kalium-Chlorid-Brücken (ca. 3 mm Abstand zum Gewebe). Diese erfassen die transepitheliale Potentialdifferenz. Über zwei gewebeferne Agar-Brücken (ca. 2 cm Abstand zum Gewebe) wird externer Strom eingespeist. Die Brücken sind jeweils über Ag-AgCl-Elektroden mit der Microclamp verbunden. Potentialdifferenz (PD_T , mV) und Stromstärke (I , $\mu A \cdot cm^{-2}$) werden über eine computergesteuerte Strom- und Spannungsklemmeinrichtung koordiniert und aufgezeichnet (AC Microclamp und PC-Programm WinClamp, Fa. für Datensysteme, Aachen und Messstand CVC6, Datenaufnahmeprogramm Analogon, Dr. Sorgenfrei, Berlin).

Vor dem Einspannen der Epithelien in die Kammern werden bei jedem Versuch das Elektrodeneigenpotential und der Flüssigkeitswiderstand der Pufferlösungen gemessen und gespeichert. Spätere Messungen im Laufe des Versuches werden automatisch um diese Werte korrigiert.

Die Spannungsklemmeinrichtung erlaubt zwei Bedingungen unter denen die elektrophysiologischen Parameter gemessen werden können, open-circuit und short-circuit. Alle durchgeführten Versuche wurden unter short-circuit-Bedingungen durchgeführt.

3.3.3. Open-circuit

Die Potentialdifferenz (PD_T) wird direkt gemessen und nicht beeinflusst. Die Leitfähigkeit (G_T) und der Strom (I_{sc}) werden berechnet. Hierzu werden in regelmäßigen Abständen Stromimpulse (ΔI) von 100 μA Stärke und 1 sek Dauer mittels der gewebefernen Agarbrücken über das Gewebe geschickt. Aus den resultierenden kurzzeitigen Änderungen der PD (ΔPD_T) kann dann nach dem Ohmschen Gesetz der transmurale Widerstand (R_T) bzw. die Gewebeleitfähigkeit (entspricht dem reziproken Wert des Widerstandes) berechnet werden.

$$R_T = \Delta PD_T / \Delta I$$

$$G_T = I / R_T$$

Formel 2: Transmuraler Widerstand (R_T) und Gewebeleitfähigkeit (G_T)

Der Gewebestrom ergibt sich wiederum aus dem Ohmschen Gesetz, indem PD_T (vor dem Stromimpuls) durch den errechneten Widerstand geteilt wird.

3.3.4. Short-circuit

Unter Kurzschlussbedingungen wird das durch elektrogenen Ionentransport verursachte transepitheliale Potential durch Einspeisung eines entsprechend großen Stroms auf 0 mV abgeglichen. Dieser externe Strom ist also ein Maß für die Summe der elektrogenen Ionentransporte (I_{sc} , Kurzschlussstrom). Die G_T wird wie unter 3.3.3. berechnet. Durch die Verwendung gleichartig zusammengesetzter Pufferlösungen auf den beiden Seiten des Epithels und „Kurzschluss“ des Gewebes auf die Potentialdifferenz von 0 mV wird der elektrochemische Gradient als Triebkraft für Ionentransporte durch das Gewebe ausgeschaltet.

3.3.5. pH-Stat-Methode

Die Kombination dieser Methode mit der Ussing Kammer wird unter 3.5 beschrieben. Durch sie ist es möglich, den HCO_3^- Transport, der nicht durch die klassische Messung radioaktiv markierter Ionen messbar ist, direkt zu bestimmen. Die für die Messung radioaktiver Isotope notwendige feste, definierte Bezugsgröße ist bei HCO_3^- nicht gegeben. Dieses ist immer im Gleichgewicht mit CO_2 zwischen gelöster und gasförmiger Phase.



Formel 3: Karboanhydrase Reaktion im Zytosol des Epithels

Ursprünglich wurde die pH-Stat-Messung zur Bestimmung von Pufferkapazitäten von diversen Proben (Bodenproben, Blut, Abfallproben, o.ä.) eingesetzt.

Das Prinzip der pH-Stat-Methode ist die kontinuierliche Messung des pH Wertes mit angeschlossener, vollautomatischer Titration. In den durchgeführten Untersuchungen wurde das ungepufferte System (serosale Seite) durch Zugabe von Säure auf dem vorher eingestellten pH von 7,4 gehalten.

Die Titration wurde mit 0,01 molarer H_2SO_4 durchgeführt. Ansonsten entsprach der Titrationpuffer in seiner Elektrolytzusammensetzung dem Puffer der serosalen Seite (ohne HCO_3^-), um die Konzentrationen der Ionen oder die Osmolarität durch die Zugabe nicht zu verändern.

3.3.6. Berechnung der Transportraten

Bei der Berechnung der HCO_3^- Transportraten wird vorausgesetzt, dass es im ungepufferten System durch den Transport von HCO_3^- zu einer Alkalisierung kommt. Dieser pH Anstieg wird über eine übliche pH Elektrode gemessen und eine entsprechende Menge Säure zutitriert. Der pH Wert wird dabei wieder als Kontrolle genutzt und so in einem definierten Bereich gehalten (Titrationsbereich). Grundlage dabei ist die Henderson–Hasselbach–Gleichung:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log (c[\text{Base}] / c[\text{Säure}])$$

Formel 4: Henderson-Hasselbach-Gleichung
 $c[]$ = Konzentration des in Klammern angegebenen Stoffes

In den durchgeführten Versuchen fungiert das HCO_3^- als Base und das CO_2 als Säure. Die zugegebene Menge Schwefelsäure ist demnach bei einem eingestellten pH Wert von 7,4 zu der transportierten Menge HCO_3^- direkt proportional.

Die pH Wert Messung erfolgt kontinuierlich und wird jede Minute in Kombination mit der zugegebenen Menge an Säure automatisch aufgezeichnet. So kann für jede Minute eine Transportrate errechnet werden. Für die Übersichtlichkeit und damit mögliche, vorhergehende überproportional hohe Transportraten oder Fehler nicht die nächsten Messungen verfälschen, wird die zutitrierte Säuremenge in bestimmten Intervallen auf Null gesetzt. Von den definierten Zeiträumen wird ein Mittelwert gebildet und der Standardfehler bestimmt (s. Tab. 1). Diese Mittelwerte von den in Tab. 1 angegebenen Zeiträumen werden im folgenden Fluxperioden genannt.

3.3.7. Inkubation

Ussing (Ussing, 1949) führte eine Inkubationstechnik ein, die es erlaubte *in vitro* Messungen mit isoliertem Epithel durchzuführen. Diese Technik wurde später von Stevens (Stevens, 1964) und Ferreira et. al. (Ferreira, Harrison et al., 1966) modifiziert.

Das Epithel wurde zwischen zwei Hälften einer Plexiglaskammer eingespannt, um es so von beiden Seiten (luminal = apikal = mukosal = Magenseite und Blutseite = basolateral = serosal) zu umspülen. Um an den Rändern der Auflageflächen keine Schäden (edge damage) zu verursachen, wurde jeweils ein Silikonring zwischen Plexiglas und Gewebe eingelegt. Die so entstandene Querschnittsfläche umfasste $3,41 \text{ cm}^2$. In einer doppelwandigen Glassäule (Fa.

Landgraf, Hannover) befanden sich pro Gewebeseite 16 ml Inkubationslösung, die von 38°C warmem Wasser umspült wurden. Die Verbindung zwischen Glassäule und Plexiglaskammer erfolgte über Gummischläuche. Die Pufferzirkulation wurde durch ein Gasliftsystem aufrechterhalten (s. Abb. 3). Über die Säulen erfolgte die Zugabe von Pharmaka. Die Zusammensetzung der verwendeten Inkubationslösungen und Art der Gase sind dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 8).

3.4. Chemikalien

3.4.1. Inkubationslösungen

Die Inkubationslösungen wurden mit Chemikalien der Firmen Carl Roth® und Merck® 1 - 2 Tage vor Durchführung des Versuches hergestellt. Mit einem Osmomaten 030-D® der Firma Gonotec® (Gefrierpunktserniedrigung) wurde die Osmolarität überprüft und ggf. auf 300 mmol·l⁻¹ mit Mannit eingestellt. Die Pufferlösungen wurden in Portionen von 250 ml bei -18°C eingefroren und am Tag des Versuches die benötigte Menge aufgetaut.

Kurz vor dem Versuch wurde die ungepufferte Lösung bei 37°C und Begasung mit reinem Sauerstoff (O₂) auf einen pH Wert von 7,4 mittels 0,1 molarer Natronlauge (NaOH) eingestellt. Durch die Zusammensetzung der gepufferten, HCO₃⁻ haltigen Lösung stellt sich bei Carbogenbegasung ein pH Wert von 7,4 ein, der stichprobenartig überprüft wurde. Die Zusammensetzungen der einzelnen Elektrolytlösungen werden im Anhang (Kapitel 8) aufgeführt.

3.4.2. Pharmaka

Die Substanz HCTZ (Hydrochlorothiazid) der Firma Sigma® wurde direkt in DMSO (Dimethylsulfoxyd) gelöst und der mukosalen Pufferlösung zugesetzt. Um einen Effekt durch das Lösungsmittel oder die Volumenveränderung ausschließen zu können, wurde in die Kontrollgruppe die gleiche Menge reines DMSO zugegeben. Die Zugabe erfolgte am Ende der ersten Fluxperiode. Die Substanz Amilorid wurde in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt und ebenfalls in DMSO gelöst.

3.5. Allgemeiner Versuchsaufbau

Nach dem Einspannen werden die Epithelien unter Standardbedingungen (Pufferzusammensetzung siehe Kapitel 8) 10-20 min inkubiert. Ziel der anfänglichen Inkubation war die Äquilibration der Ussing Kammer Bedingungen. Nach 10 min wurde das Epithel kurzgeschlossen (short-circuit) und vor dem Start der Titratoren erneut ein Äquilibrationszeitraum von 10 min abgewartet. Die Titratoren wurden 2 - 3 min nach dem Einbau der pH Meter gestartet und die Messung des HCO_3^- Transportes begann.

Nach jeder Veränderung der Versuchsbedingungen (Hemmstoffzugabe, Pufferwechsel o.ä.) wurden 30 min Äquilibrationszeit bei der Berechnung der Transportraten berücksichtigt. So ergab sich die zeitliche Einteilung der Versuchszeit und -auswertung.

Versuchszeitraum	Bezeichnung	Begründung
0. - 30. Minute	Vorlauf 1	Zeit vom Beginn der Messung bis zum Erreichen des Steady State, meist überproportional hohe Transportraten. Bei der Auswertung nicht berücksichtigt.
31. - 90. Minute	Flux 1	Erste Messperiode, alle Epithelien unter Standardbedingungen inkubiert. Die Messwerte (1 Messwert/Minute) werden gemittelt.
90. Minute	Manipulation	Je nach Versuchsansatz: Zugabe eines Hemmstoffes bzw. Pufferwechsel
91. - 120. Minute	Vorlauf 2	Zeit zwischen Manipulation und erneuter Einstellung des Steady State. Wird nicht berücksichtigt in der Auswertung. Meist Abfall der Transportraten der Versuchsepithelien.
121. - 180. Minute	Flux 2	Zweite Messperiode. Die Messwerte (1 Messwert/Minute) werden gemittelt.
181. - 240. Minute	Flux 3	Dritte Messperiode. Die Messwerte (1 Messwert/Minute) werden gemittelt.

Tab. 1 Schematische Darstellung der zeitlichen Einteilung der Versuche. Dieser zeitliche Ablauf wurde bei allen Versuchsansätzen eingehalten.

Die Abb. 4 zeigt eine Darstellung von Rohdaten (Titrator: Titroline Alpha, Firma Schott®), graphisch kumulativ dargestellt. Zu erkennen ist der pH Wert (horizontal), der eine gewisse Streuung aufweist, und die zutitrierte Schwefelsäurezugabe (linear steigend). Diese erfolgte nahezu gleichmäßig und nahm linear zu mit der Zeit. Daraus lässt sich ein sehr gleichmäßiger und stabiler Transport von HCO_3^- über einen Zeitraum von bis zu 5 Stunden ableiten.

Pro Versuchstag standen 6 Ussing Kammern mit dazugehörigen Titratoren zur Verfügung, so dass pro Tier maximal 6 Epithelien untersucht und ausgewertet werden konnten.

Ein pH Wert von 7,4 wurde serosal vorgegeben. Der HCO_3^- Transport verursacht eine Alkalisierung der serosalen Inkubationslösung. Durch die Zugabe der Säure wird der Anstieg des pH-Wertes kompensiert. Die Schwankungen des pH Wertes ergeben sich durch das ungepufferte System der serosalen Seite, bleiben jedoch in einem Bereich von $7,4 \pm 0,2$.

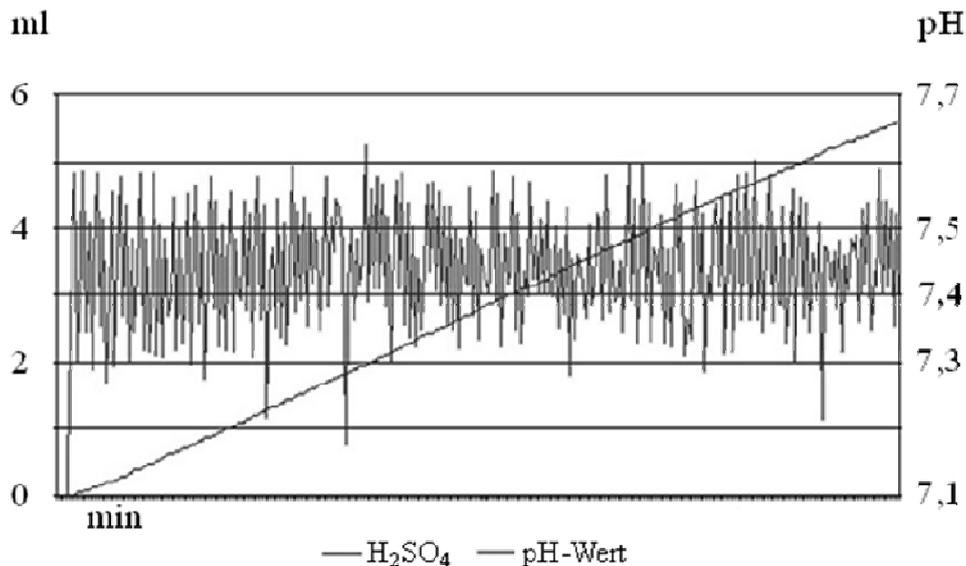


Abb. 4 Darstellung einer Titration (ohne Manipulation) über einen Zeitraum von 5 Stunden. Die horizontal verlaufende Linie stellt den schwankenden pH-Wert (rechte Y-Achse) und die linear ansteigende Linie die zutitrierte Schwefelsäure (0,01 molare H_2SO_4 , linke Y-Achse) dar.

3.5.1. Hemmstoffzugabe

Bei den Versuchsansätzen mit Zugabe eines Hemmstoffs (HCTZ, o.ä.) wurden durchschnittlich 4 Tiere mit je 6 Epithelien untersucht. Nach der ersten Fluxperiode wurde in mindestens 3 Ussing Kammern der Hemmstoff zugesetzt (Versuchsgruppe), während die anderen den Kontrollbedingungen (Kontrollgruppe) über alle 3 Fluxperioden ohne Veränderungen ausgesetzt waren. So ließen sich die Effekte in der Behandlungsgruppe (Hemmstoffzugabe), der Faktor Tier und zufällige Effekte voneinander unterscheiden und bewerten.

3.5.2. Variation der Elektrolytkonzentrationen

Bei diesen Versuchsansätzen wurden die Ionengradienten verändert und deren Auswirkungen auf den Bikarbonattransport geprüft.

Jede Verschiebung der Gradienten wurde mit durchschnittlich 4 Tieren und je 6 Epithelien untersucht. Die Aufteilung in Kontroll- und Versuchsgruppe erfolgte wie unter 3.7..

In den Ussing Kammern der Versuchsgruppe wurde nach der 1. Fluxperiode die Pufferlösung gewechselt. In denen der Kontrollgruppe wurde zum selben Zeitpunkt ein Wechsel simuliert, indem nach dem Ablassen die Säule erneut mit der Standardlösung (Pufferzusammensetzung s. Kapitel 8) befüllt wurde. So konnte ein Effekt des Wechselsvorganges auf den Bikarbonattransport ausgeschlossen werden. Die statistische Auswertung erfolgte wie bei den Versuchen mit einer Hemmstoffzugabe.

3.5.3. Gesättigte Fettsäuren

Bei diesem Versuchsansatz wurde der Einfluss der mukosalen Zugabe von kurzkettigen Fettsäuren (Acetat und Butyrat) in verschiedenen Konzentrationen auf den Bikarbonattransport im Blättermagen untersucht. Die Aufteilung in Kontroll- und Versuchsgruppe erfolgte wie unter 3.7., ebenso wie der standardisierte Ablauf des Pufferwechsels und die statistische Auswertung.

3.5.4. Ammoniak

Bei diesem Versuchsansatz wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen Ammoniumchlorid den Pufferlösungen der Versuchsgruppe zugegeben und der Effekt auf den Bikarbonattransport beobachtet. Durch serosale Mannitzugabe wurde die mukosale Erhöhung der Osmolalität durch die Zugabe von Ammoniumchlorid in der Versuchsgruppe ausgeglichen. Durch serosale und mukosale Mannitzugabe in der Kontrollgruppe wurde ein Einfluss der erhöhten Osmolalität auf den Bikarbonattransport ausgeschlossen. Die Aufteilung in Kontroll- und Versuchsgruppe erfolgte wie unter 3.7., ebenso die statistische Auswertung.

3.6. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistik Programms SPSS 12.0. Die Schafe, deren Epithelien gleichartig behandelt wurden, werden in Versuchsgruppen zusammengefasst.

Je Tier gibt es Kontrollepithelien (unbehandelt) und Versuchsepithelien (behandelt). Aus den Transportraten der Epithelien für das Zeitintervall b [121-180 min] und c [181-240 min] wird

der Mittelwert gebildet und die Differenz zu der Transportrate des Zeitintervalls a [31-90min] berechnet.

Die Differenzen der Kontroll- (Ko), bzw. der Versuchsepithelien (V) werden je Tier gemittelt. So ergibt sich für jedes Tier ein Paar (Ko/V).

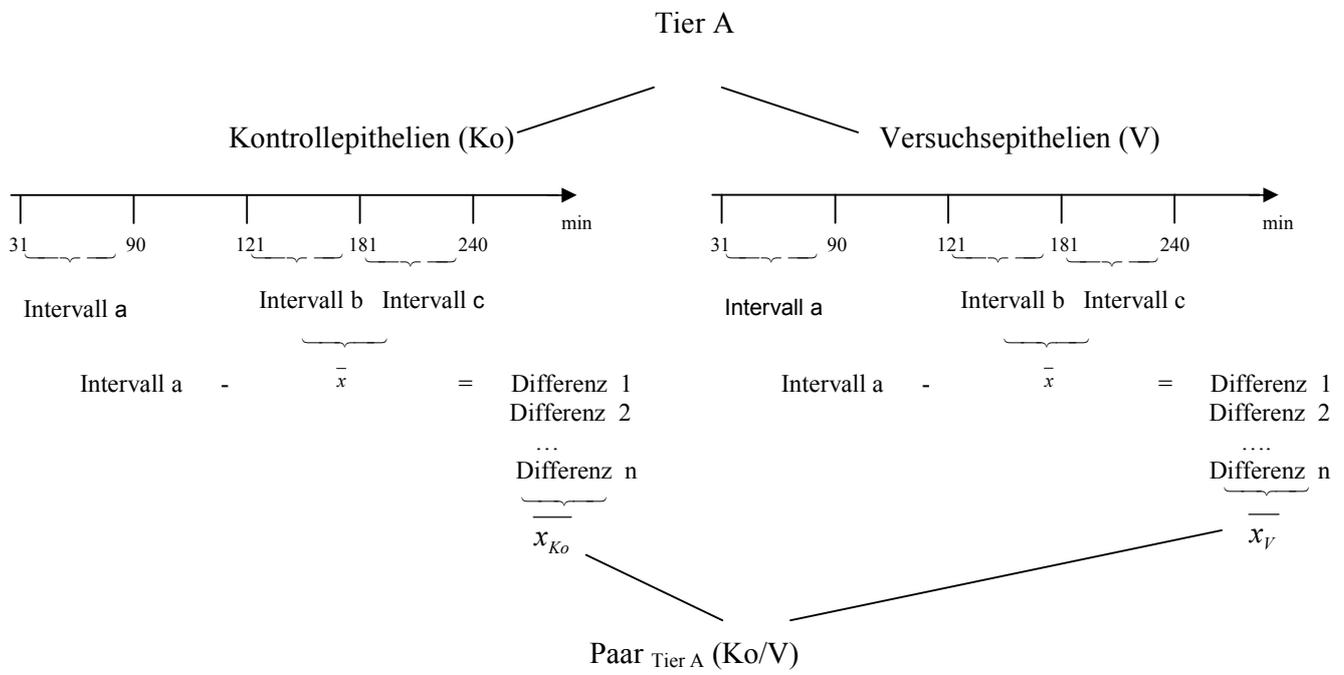


Abb. 5 Die Daten werden paarig dargestellt. Da es sich um zwei verbundene Stichproben handelt, werden sie unter Verwendung des Wilcoxon Tests ausgewertet.

Bezeichnung	Irrtumswahrscheinlichkeit	Markierung
nicht signifikant	$p > 0,05$	
signifikant	$p \leq 0,05$	*
hochsignifikant	$p \leq 0,01$	**

Tab. 2 Definition des Begriffes der Signifikanz

4. ERGEBNISSE

4.1. Zeitlicher Verlauf der Versuchsparameter

4.1.1. Die elektrophysiologischen Parameter

Zur Veranschaulichung des zeitlichen Verlaufs der elektrophysiologischen Parameter für die eingespannten Psalterepithelien werden die Gewebeleitfähigkeit (G_T), der Kurzschlussstrom (I_{sc}) und die Potentialdifferenz (P_d) dargestellt.

- Die Gewebeleitfähigkeit (Abb. 6) sank in den ersten 20 min ab, blieb dann jedoch über den restlichen Zeitraum relativ stabil (ca. $1,5 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$).
- Der Kurzschlussstrom (Abb. 7) stieg über die Zeit weitgehend konstant (bis auf ca. $37 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) an.
- Die Potentialdifferenz (Abb. 8) stieg in der ersten halben Stunde an (ca. 24 mV) und fiel anschließend bis zum Ende der Versuche geringfügig ab (auf ca. 20 mV).

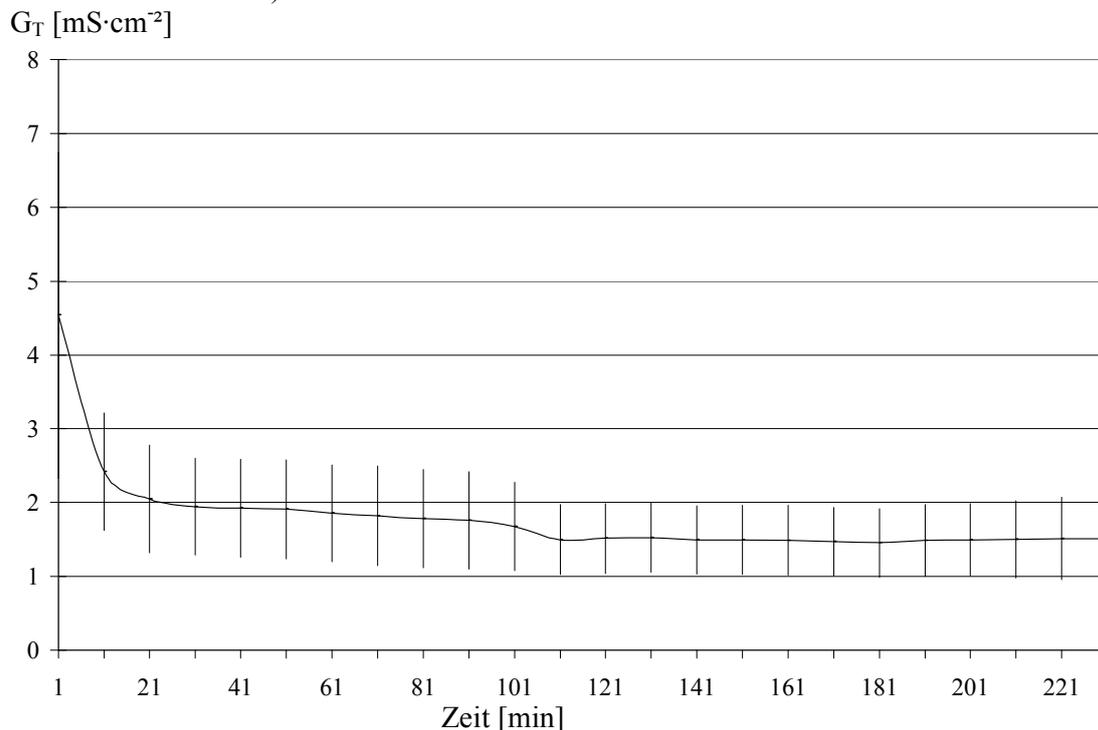


Abb. 6 Verlauf der Gewebeleitfähigkeit (G_T) gemessen in $[\text{mS}/\text{cm}^2]$ während der Versuchszeit. G_T , in 10 min Abschnitten ($N/n = 5/5$). Dargestellt wird der Mittelwert \pm der Standardabweichung. Die Inkubationslösung enthielt $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{HCO}_3^-$.

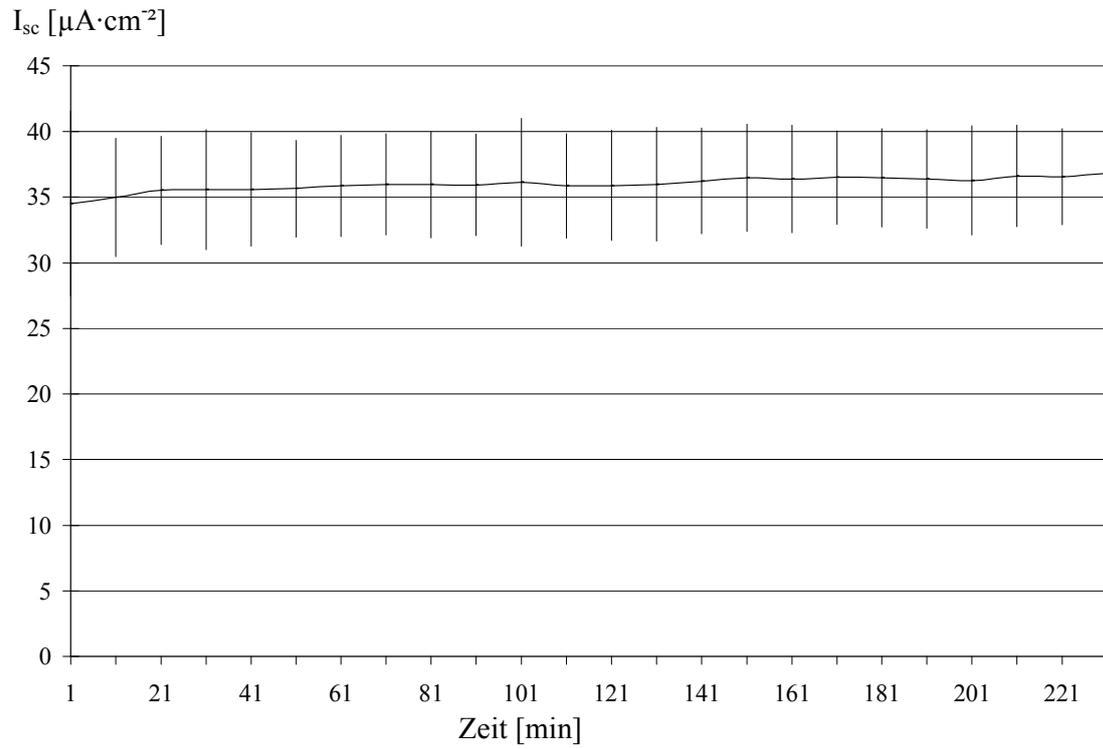


Abb. 7 Der Kurzschlussstrom (I_{sc}) gemessen in $[\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}]$. I_{sc} in 10 min Abschnitten ($N/n = 5/5$). Dargestellt ist der Mittelwert \pm der Standardabweichung. Die Inkubationslösung enthielt $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$.

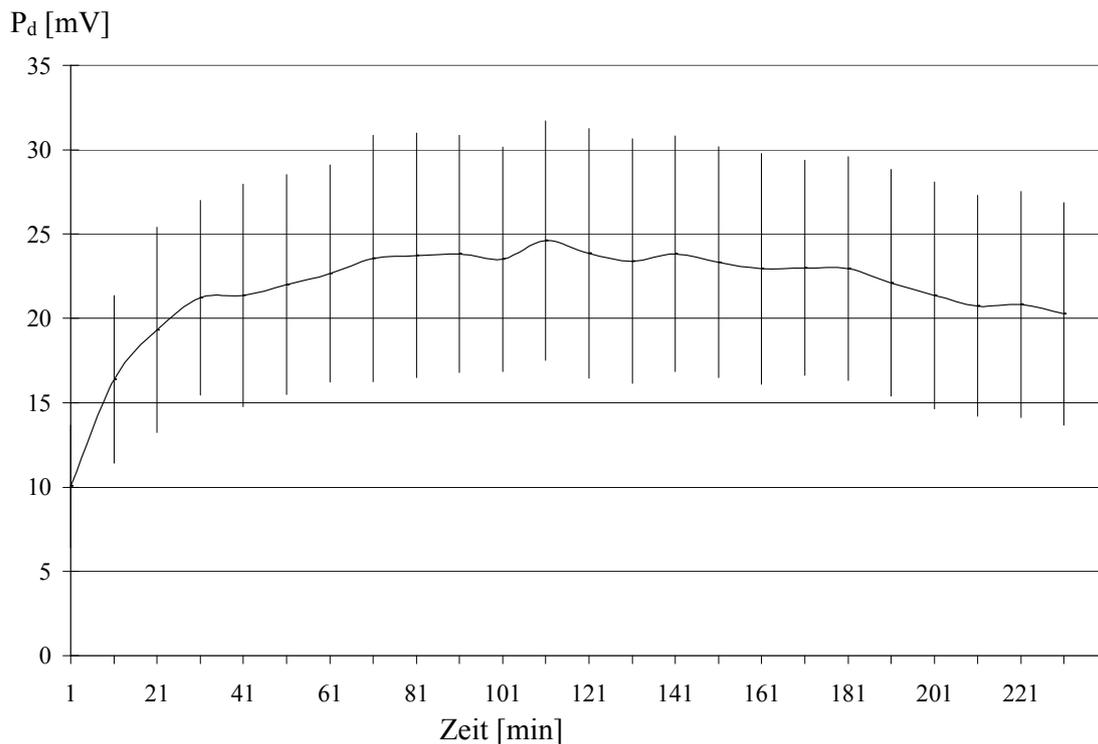


Abb. 8 Die Potentialdifferenz (Pd) gemessen in [mV]. Pd in 10 min Abschnitten (N/n = 5/5). Dargestellt ist der Mittelwert \pm der Standardabweichung. Die Inkubationslösung enthielt $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$.

Der zeitliche Verlauf der elektrophysiologischen Parameter Kurzschlussstrom, Gewebeleitfähigkeit und Potentialdifferenz erfolgte unter zehnpromiger Carbogenbegasung und bei einer Inkubation mit $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ (mukosal) (N/n = 5/5). Da sich diese Parameter in allen Versuchsansätzen relativ konstant bzw. den Elektrolytverschiebungen folgerichtig verhielten, wird im Weiteren auf die gesonderte Darstellung verzichtet.

4.1.2. Der Bikarbonattransport

Die Transportraten der verschiedenen Transportmechanismen im Vormagensystem der Wiederkäuer unterliegen *in vitro* – soweit bekannt – alle einem zeitlichen Abfall (Martens and Gäbel, 1988). Diese zeitliche Veränderung trifft auch für den Transport von HCO_3^- zu (Abb. 9). Ferner zeigte die Auswertung der Versuche, dass die Transportraten zwischen den einzelnen Tieren stark variierten.

In Abb. 9 ist der Bikarbonattransport (J_{ms}) von mukosal nach serosal dargestellt. Es zeigte sich, dass am Ende der Äquilibrierungsperiode (30. Minute) der HCO_3^- Transport $5\text{--}7 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ betrug und dann während der restlichen Versuchszeit nur geringfügig abfiel.

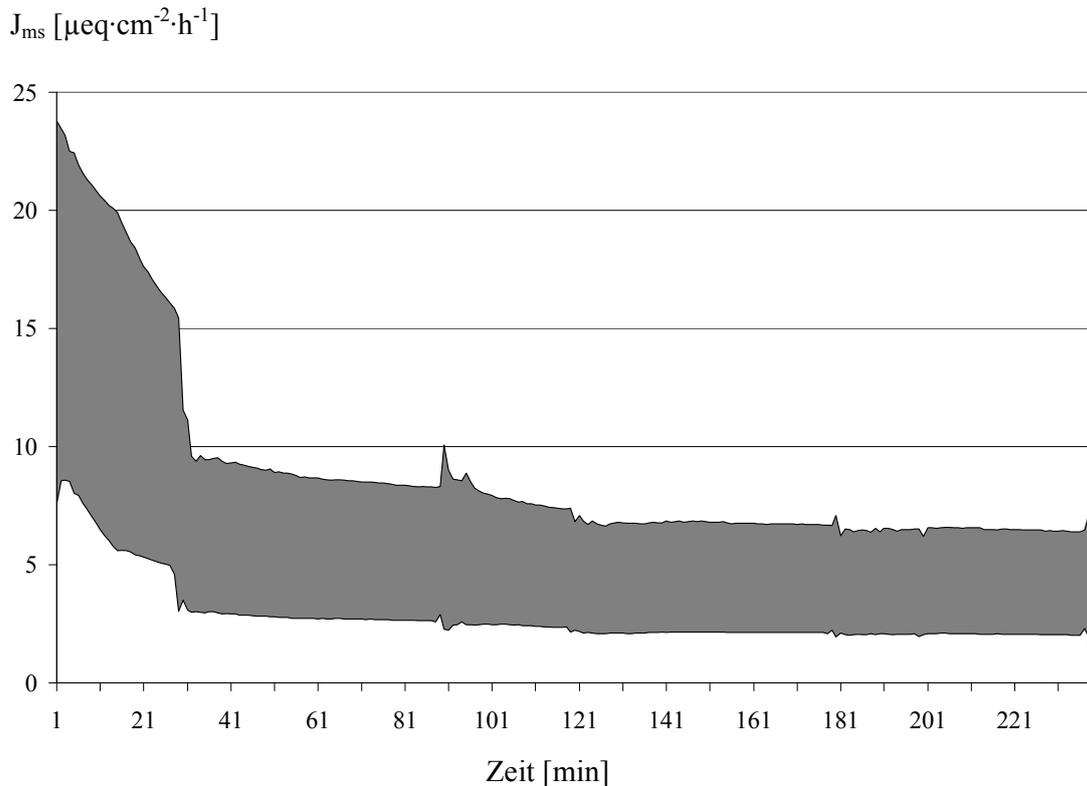


Abb. 9 Der Bikarbonattransport (J_{ms}) gemessen in $[\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}]$. Der grau eingefärbte Bereich stellt die Standardabweichung vom Mittelwert der Transportraten über verschiedene Epithelien und Tiere hinweg dar. Die Inkubationslösung enthielt $50\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}\text{ HCO}_3^-$ ($N/n=7/10$).

Die unterschiedlich hohen Transportraten der einzelnen Tiere werden statistisch in der Auswertung nicht berücksichtigt, denn es wird für die Auswertung nicht der eigentliche Messwert, sondern die Veränderung zum Ausgangswert herangezogen, womit das Basisniveau des einzelnen Tieres eliminiert wird. D.h. für jedes Epithel wurde zuerst der Mittelwert aus Flux 2 (121.-180. min) und Flux 3 (181.-240. min) gebildet und anschließend die Differenz zwischen dem gebildeten Mittelwert und Flux 1 (31.-90. min) (s. Kapitel 3.7.) berechnet. Die Werte der einzelnen Epithelien jedes Tieres werden zusammengefasst. Jede Gruppe (Kontroll- und Versuchsgruppe) hat einen Differenzwert $(\text{Flux 1} - (\text{Flux 2} + \text{Flux 3})/2)$. So werden die individuellen Schwankungen zwischen den Tieren, der zeitliche Abfall der Transportraten und die Abhängigkeit der Epithelien zum Tier in die Auswertung integriert.

Die so errechneten Differenzen werden im Folgenden tabellarisch dargestellt und verglichen. Wenn die vorgenommene Behandlung den Bikarbonattransport beeinflusste, verursachte sie immer einen Abfall der Transportraten. Daraus folgt, dass sich ein großer Effekt in einem

hohen Wert in dem Tabellenfeld der Versuchsgruppe (große Differenz vor versus nach der Behandlung) widerspiegelt.

4.2. Epitheliale Transportmechanismen des Psalters: Ableitung der Versuchskonzepte

Die folgende Abbildung zeigt ein vereinfachtes Bild des Psalterepithels. Die wesentlichen durch vorhergehende Studien identifizierten oder vermuteten Transportmechanismen (Tiling, 1997; Niebuhr, 2003; Ali, 2005; Wegeler, 2008) und biochemischen Reaktionen werden an der apikalen und basolateralen Membran sowie im Zytosol dargestellt. Die untersuchten Arbeitshypothesen basieren auf diesem Zellmodell inklusive der dargestellten Prozesse.

Bikarbonat wird apikal im Austausch gegen Cl^- mit Hilfe eines Anionenaustauschers aufgenommen und bedingt daher eine Chloridsekretion (siehe Literaturübersicht). Die Passage von Bikarbonat durch die basolaterale Membran erfolgt ebenfalls durch einen Anionenaustauscher (Cl^- Aufnahme und HCO_3^- Abgabe). Die ungestörte Diffusion von Bikarbonat durch die verschiedenen Zellschichten des Psalterepithels setzt voraus, dass der pH_i im Zytosol konstant gehalten wird.

Diese Modellvorstellung für den Bikarbonattransport, die aufgrund bisheriger Versuche als gesichert angesehen werden können, soll durch weitere experimentelle Ansätze verifiziert werden. Hierbei handelt es sich um Versuchsansätze, die u.a. eine Veränderung des pH_i verursachen (Hemmung des Na^+/H^+ Austauschers, Transport von SCFA in der undissoziierten Form, Transport von Ammoniak als NH_3) oder um Manipulationen der Chloridkonzentration zur Beeinflussung der passiv treibenden Kräfte des apikalen Anionenaustauschers.

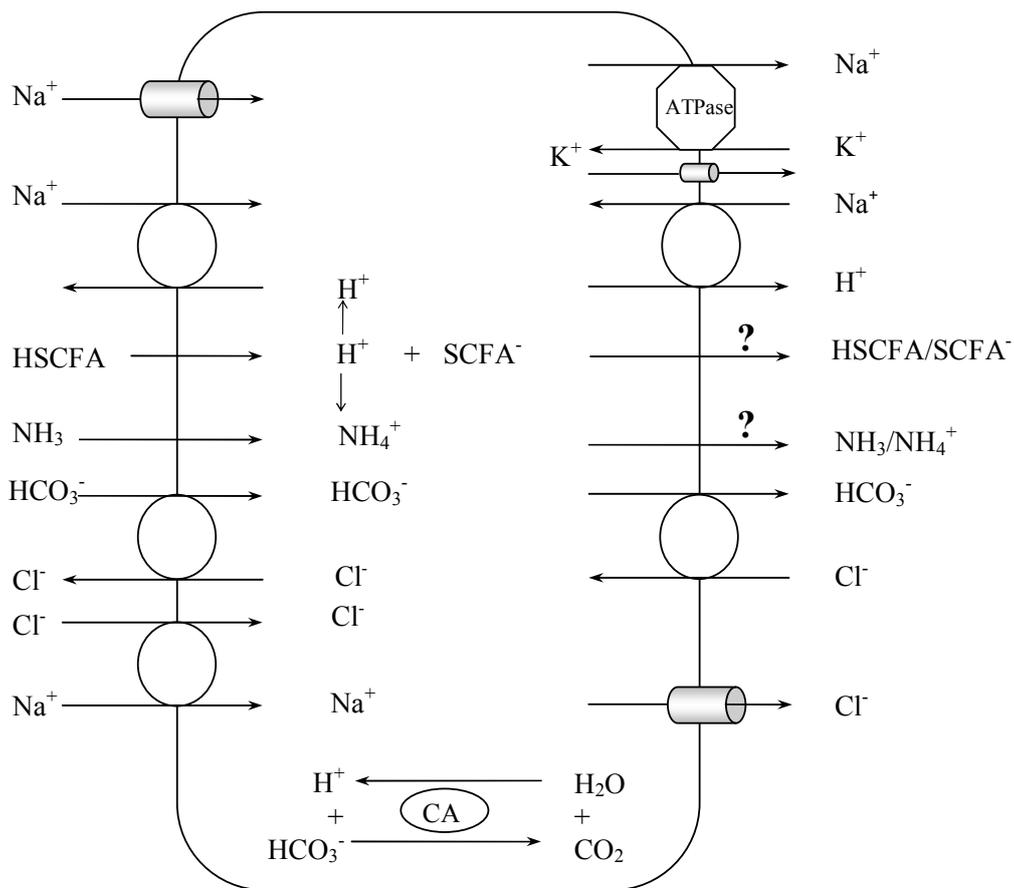


Abb. 10 Schematische Darstellung bisher nachgewiesener bzw. vermuteter Transportmechanismen des Psalterepithels sowie deren mögliche Interaktionen. Carrierproteine sind kreisförmig, Kanäle sind zylinderförmig und die Na⁺/K⁺ATPase ist als Sechseck dargestellt. Das Oval stellt das Enzym Karboanhydrase dar.

4.3. Bestimmung der Transportraten von HCO₃⁻

Der Aufbau und die Durchführung der Ussing Kammer Versuche waren bei allen Versuchsansätzen gleich. Die Elektrolytkonzentration bzw. zugesetzte Hemmstoffe waren die einzigen Veränderlichen. So konnte der Einfluss anderer Faktoren auf die Transportraten des Bikarbonats ausgeschlossen werden. Bestimmt wurden die Transportraten (Fluxe) über drei Perioden, und zwar von der 31. bis 90. min (Flux 1; dieser Vorlauf war für alle Epithelien gleich), der 121. bis 180. min (Flux 2) und von der 181. bis 240. min (Flux 3; s. Kapitel 3.7.).

4.4. Triebkräfte: Bedeutung von Chlorid

Apikal wird Bikarbonat im Austausch gegen Chlorid durch einen Anionenaustauschers aufgenommen. Dieser Austausch erfolgt passiv und basiert auf den chemischen Gradienten als Triebkraft für beide Anionen. Durch die Erhöhung der mukosalen Cl^- Konzentration (= Aufhebung des transepithelialen Chloridgradienten) und die Hemmung des Na^+/Cl^- Kotransporters (HCTZ), der apikal Chlorid aufnimmt, wird die Bedeutung der mukosalen Cl^- Konzentration und die intrazelluläre Verfügbarkeit von Cl^- für den zu untersuchenden Anionenaustausch geprüft.

4.4.1. Hydrochlorothiazid

Hydrochlorothiazid (HCTZ) ist ein spezifischer Hemmstoff für den Na^+/Cl^- Kotransporter. Durch diesen Mechanismus kann die Zelle elektroneutral Natrium und Chlorid aufnehmen. Ali (2005) wies diesen Kotransporter durch Ionenersatzexperimente und den Einsatz von HCTZ in der apikalen Membran des Psalterepithels nach. Offen blieb jedoch, welchen Einfluss dieser Kotransporter auf den Bikarbonattransport hat. Mit diesem Versuchsansatz sollte die Vermutung bestätigt werden, dass durch den Na^+/Cl^- Kotransporter im mehrschichtigen Epithel subluminal die Chloridkonzentration erhöht und damit der Austausch von Bikarbonat (Influx) und von Cl^- (Efflux; s. Abb. 11) erleichtert wird. Durch die Hemmung des Kotransporters mit HCTZ müsste – bei Verifizierung der Hypothese – der Bikarbonattransport reduziert werden.

Es wurden 3 Fluxperioden gemessen. Am Ende der ersten Fluxperiode wurde der Versuchsgruppe 1 mM HCTZ zugesetzt. Dem mukosalen Puffer der Epithelien der Kontrollgruppe wurde nur das Lösungsmittel DMSO zugegeben. Nach der Zugabe reduzierte sich der Bikarbonattransport in der Versuchsgruppe signifikant ($p = 0,018$) gegenüber dem der Kontrollgruppe.

Flux (Differenz)	Kontrolle $J_{\text{ms}} \text{HCO}_3^-$	Versuch (HCTZ) $J_{\text{ms}} \text{HCO}_3^-$	Anzahl der Schafe / Gewebe	
			Kontrolle	Versuch
$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	1,85	4,94**	7/7	7/9

Tab. 3 Einfluss von 1 mM HCTZ in der mukosalen Inkubationslösung auf ($J_{\text{ms}} \text{HCO}_3^-$ [$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$]). Differenzen der Kontroll- und Versuchsgruppe zwischen Flux 1 und dem Mittelwert aus Flux 2 und 3, sowie die Anzahl der Epithelien und Schafe je Gruppe. (** hoch signifikant, $p = 0,018$)

Nach Zugabe von HCTZ sank der Transport von $6,45 \pm 1,50 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ auf $1,52 \pm 1,07 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ (Differenz = 4,94). In der Kontrollgruppe reduzierte er sich dagegen nur geringfügig von $6,51 \pm 1,46 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ auf $4,66 \pm 1,41 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ (Differenz = 1,85) infolge der zeitabhängigen Abnahme der Transportraten.

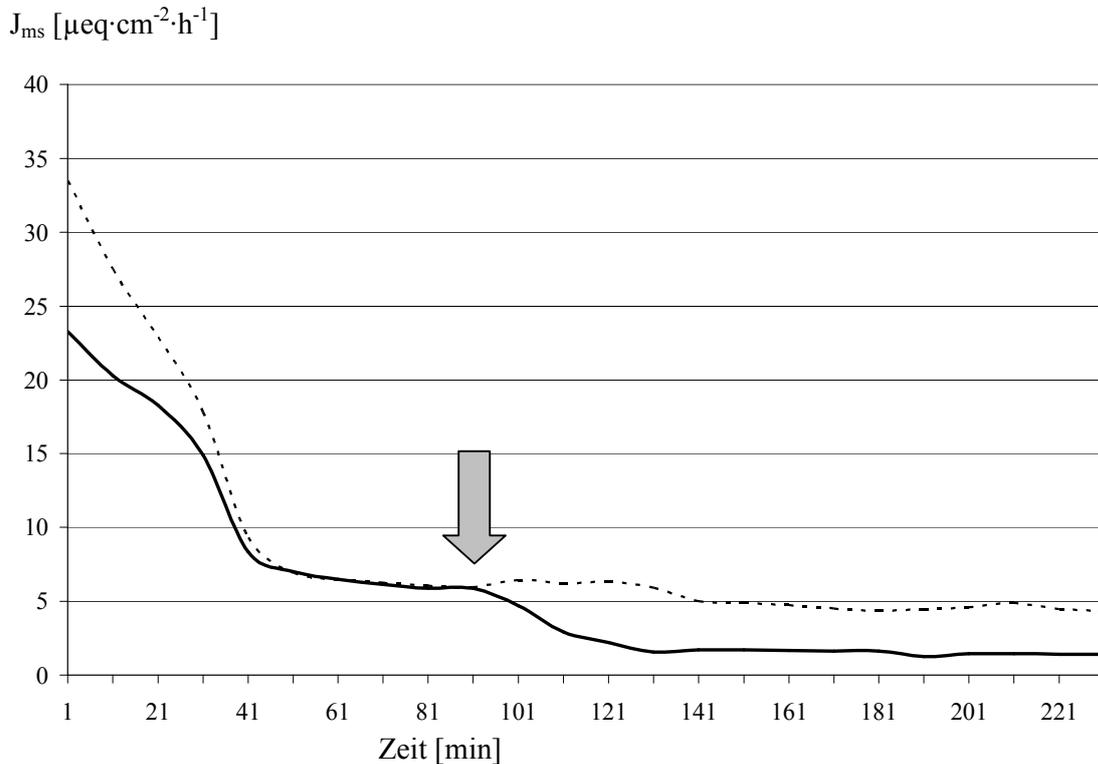


Abb. 11 Der Bikarbonattransport dargestellt über 240 min im Versuchsansatz mit HCTZ. Die gestrichelte Linie stellt die Kontroll-, die durchgängige Linie die Versuchsgruppe dar und der Pfeil den Zeitpunkt der Zugabe des HCTZ. Nach der 90. Minute wurde 1 mM HCTZ bei der Versuchsgruppe mukosal zugegeben. (N = 7/7, n= 7/9 Kontrolle/Versuch, \bar{x})

Der Abb. 11 kann entnommen werden, dass nach Zugabe des Hemmstoffes (91. min) der Transport dramatisch sank. Nach der 120. Minute lag der Bikarbonattransport nur noch bei durchschnittlich $2,03 \pm 0,93 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Der Transport fiel dann bis zur 240. Minute weiter auf $1,52 \pm 1,07 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ab (durchschnittliche Differenz zu Flux 1 = 4,94). Hingegen kam es in der Kontrollgruppe nur zu dem normalen zeitlichen Abfall (s. Kapitel 4.1.2., Abb. 9). Nach den ersten 30 min sank der Transport langsam und kontinuierlich von $6,51 \pm 1,47 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ auf $4,66 \pm 1,41 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ (Differenz = 1,85).

4.4.2. Aufhebung des Chloridgradienten

Aufgrund früherer Versuche wurde vermutet, dass der transepitheliale Chloridgradient von serosal nach mukosal als Triebkraft für den Bikarbonattransport (Absorption) und die Chloridsekretion dient (Tiling, 1997; Niebuhr, 2003). Bei einem passiven Anionenaustauscher ($\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$) müssten die transepithelialen chemischen Gradienten die Transportraten beeinflussen. Aus diesem Grunde wurde der Cl^- Gradient ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ serosal und $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mukosal), der etwa den Gradienten *in vivo* entspricht, nach der Vorperiode aufgehoben und auf beiden Seiten des Epithels die gleiche Cl^- Konzentration von $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ vorgegeben.

Flux (Differenz)	Kontrolle	Versuch (ohne Chloridgradienten)	Anzahl der Schafe / Gewebe	
	$J_{\text{ms}} \text{HCO}_3^-$	$J_{\text{ms}} \text{HCO}_3^-$	Kontrolle	Versuch
$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	2,09	3,05	6/7	6/8

Tab. 4 Einfluss auf $J_{\text{ms}} \text{HCO}_3^-$ [$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$] durch den Ausgleich des Chloridgradienten (mukosal = serosal). Differenzen der Kontroll- und Versuchsgruppe zwischen Flux 1 und dem Mittelwert aus Flux 2 und 3, sowie die Anzahl der Epithelien und Schafe je Gruppe.

Nach Ausgleich des Chloridgradienten zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe (von $6,71 \pm 2,74 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ auf $4,61 \pm 1,49 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ (Differenz = 2,1) vermindert) nur eine geringe und nicht signifikante Reduzierung ($p = 0,6$) der Bikarbonattransportrate von $6,70 \pm 4,06 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ auf $3,65 \pm 1,77 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ (Differenz = 3,05) in der Versuchsgruppe. Das impliziert, dass die transepithelialen Cl^- Gradienten für den HCO_3^- Transport offensichtlich nicht von großer Bedeutung sind.

4.4.3. Intrazelluläre pH Regulierung

Die Diffusion von Bikarbonat von der mukosalen zur serosalen Seite des Psalterepithels ist abhängig von einer engen Regulierung des pH_i . Der Effekt einer pH_i Verschiebung auf den Bikarbonattransport soll durch Änderung der Versuchsbedingungen näher untersucht werden. Durch die Hemmung des Na^+/H^+ Austauschers (Amilorid) und die Aufnahme von HSCFA (protonierte Form kurzkettiger, flüchtiger Fettsäuren) steigt die H^+ Konzentration intrazellulär und der pH_i sinkt. NH_3 (Ammoniak) dagegen bindet intrazellulär Protonen und der pH_i steigt. Dieser mögliche Einfluss von Anstieg oder Abfall des pH_i auf den HCO_3^- wurde untersucht.

4.4.3.1. Amilorid

Amilorid ist ein spezifischer Hemmstoff des Na^+/H^+ Austauschers. Hinweise auf dessen Existenz in der apikalen Membran und somit den Natriumtransport ergaben bereits Versuche von Martens (1991). Durch die Hemmung des Austauschers fehlt der Zelle ein möglicher Mechanismus, um mukosal Protonen abzugeben und so zur Regulation des intrazellulären pH Wertes (pH_i) beizutragen.

Der Effekt des Hemmstoffes Amilorid wurde an Epithelien von vier Tieren geprüft. Die Epithelien sind unter Standardbedingungen inkubiert worden (bei 37°C , begast mit 10 % Carbogen und $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ mukosal). Es wurden drei Fluxperioden bestimmt. Am Ende des ersten Fluxes wurde Amilorid in der Konzentration von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dem Puffer auf der mukosalen Seite zugesetzt.

Flux (Differenz)	Kontrolle $J_{\text{ms}} \text{ HCO}_3^-$	Versuch (Amilorid) $J_{\text{ms}} \text{ HCO}_3^-$	Anzahl der Schafe / Gewebe	
			Kontrolle	Versuch
$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	2,03	1,90	4/6	4/9

Tab. 5 Einfluss von 1 mM Amilorid in der mukosalen Inkubationslösung auf $J_{\text{ms}} \text{ HCO}_3^-$ [$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$], Differenzen der Kontroll- und Versuchsgruppe zwischen Flux 1 und dem Mittelwert aus Flux 2 und 3 sowie die Anzahl der Epithelien und Schafe je Gruppe.

Der Bikarbonattransport der Versuchsgruppe (Differenz = $1,90 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) wurde durch die Zugabe von 1 mM Amilorid mukosal im Vergleich zur Kontrollgruppe (Differenz = $2,03 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) nicht signifikant reduziert ($p = 0,715$). Im Gegenteil, der Abfall der Transportrate war in der Kontrollgruppe sogar etwas größer.

4.4.3.2. Kurzkettige flüchtige Fettsäuren (SCFA)

Acetat

SCFA werden im Psalter absorbiert. Da die SCFA in der undissoziierten Form (HSFA) aufgenommen werden und den Na^+/H^+ Austauscher stimulieren (Ali, Shen et al., 2006), ist anzunehmen, dass sie den pH_i beeinflussen können und damit u.U. auch den Transport von HCO_3^- verändern. Aufgrund dieser Hypothese wurde der Einfluss von Acetat (mukosal) untersucht.

Die Epithelien wurden unter Standardbedingungen inkubiert. Nach der ersten Fluxperiode wurde der Puffer aller mukosalen Kammern gewechselt. Jedoch wurde nur der Puffer der Versuchsgruppen gegen den fettsäurehaltigen Puffer ausgetauscht. Die Kammern der Kontrollgruppen wurden erneut mit dem Standardpuffer befüllt, um einen Effekt auf den Bikarbonattransport durch den Pufferwechsel ausschließen zu können.

Bei einer Konzentration von 25 mmol·l⁻¹ Acetat mukosal zeigte sich eine geringe Abnahme der Transportrate der Versuchsgruppe um 2,88 µeq·cm⁻²·h⁻¹ (Kontrollgruppe um 2,03 µeq·cm⁻²·h⁻¹). Diese Verringerung war allerdings nicht signifikant (p = 0,593).

Durch die hohe Konzentration von 100 mmol·l⁻¹ Acetat verringerte sich die Bikarbonattransportrate signifikant (p = 0,043). Der Transport fiel in der Versuchsgruppe von 8,43 ± 2,349 µeq·cm⁻²·h⁻¹ auf 3,42 ± 1,77 µeq·cm⁻²·h⁻¹ ab, d.h. um 5,01µeq·cm⁻²·h⁻¹. Bei der Kontrollgruppe sank dieser hingegen nur von 10,03 ± 1,79 µeq·cm⁻²·h⁻¹ auf 8,19 ± 3,08 µeq·cm⁻²·h⁻¹. Dies entspricht einer Abnahme um 1,83 µeq·cm⁻²·h⁻¹, die in der Größenordnung wiederum der üblichen zeitabhängigen Verringerung entspricht.

Flux (Differenzen)	Kontrolle J _{ms} HCO ₃ ⁻	Versuch (Acetatzugabe)		Anzahl der Schafe / Gewebe	
		J _{ms} HCO ₃ ⁻		Kontrolle	Versuch
µeq·cm ⁻² ·h ⁻¹	2,03	25 mmol·l ⁻¹	2,88	3/4	3/4
µeq·cm ⁻² ·h ⁻¹	1,84	100 mmol·l ⁻¹	5,01*	3/5	3/4

Tab. 1: Einfluss von Fettsäuren (Acetat) in unterschiedlichen (mukosalen) Konzentrationen auf den Bikarbonattransport J_{ms} HCO₃⁻ [µeq·cm⁻²·h⁻¹], Differenzen der Kontroll- und Versuchsgruppe zwischen Flux 1 und dem Mittelwert aus Flux 2 und 3, sowie die Anzahl der Epithelien und Schafe je Gruppe. * markiert signifikante Ergebnisse (p = 0,043).

Die signifikante Reduzierung der Transportrate der Versuchsgruppe (durchgängige Linie) in Vergleich zur Kontrollgruppe (gestrichelte Linie) ist der Abb. 12 zu entnehmen. Die Kontrollgruppe zeigt den üblichen Verlauf mit einem zeitlich bedingten Abfall des Transportes. Dagegen sank die Rate in der Versuchsgruppe erheblich und signifikant ab der 92. Minute auf 3,42 ± 1,77 µeq·cm⁻²·h⁻¹ ab (p = 0,043).

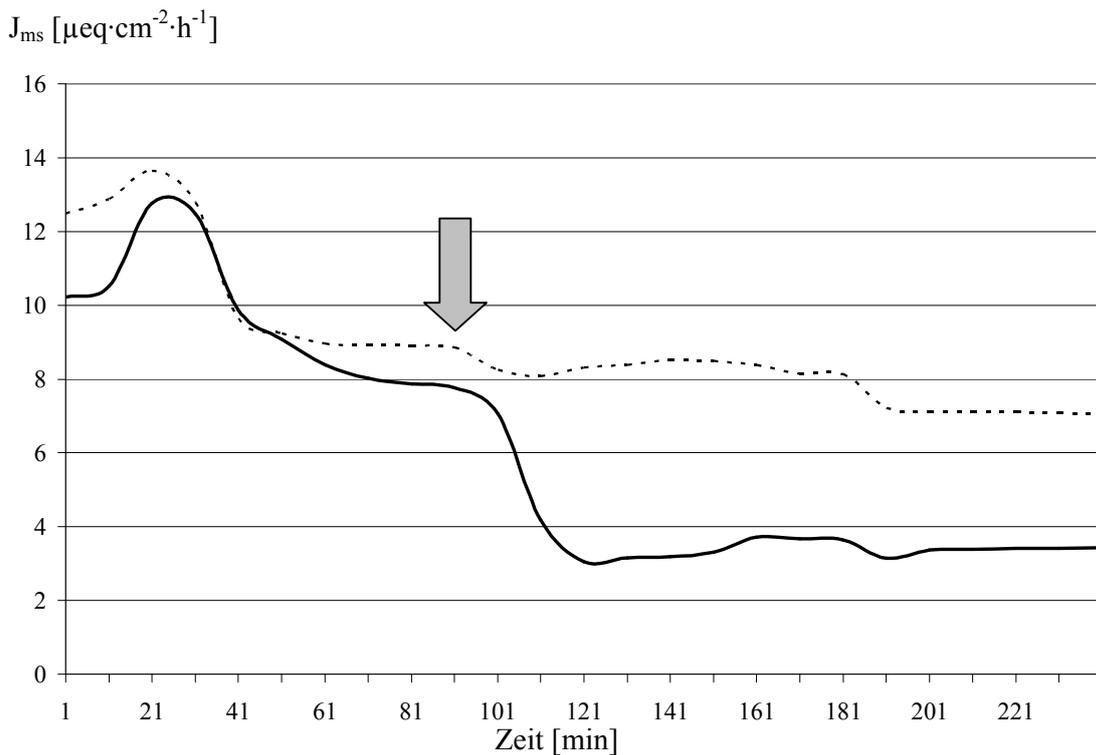


Abb. 12 Der Bikarbonattransport dargestellt über 240 min. Die gestrichelte Linie stellt die Kontroll-, die durchgängige Linie die Versuchsgruppe und der Pfeil den Zeitpunkt des Pufferwechsels (mukosale Erhöhung auf $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Acetat) dar. In der Versuchsgruppe wurde nach der 90. Minute der mukosale Puffer (keine SCFA) durch eine Pufferlösung mit $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Acetat ersetzt. (N = 3/3, n= 5/4 Kontrolle/Versuch, \bar{x})

Butyrat

Der mögliche Effekt einer weiteren SCFA, Butyrat, wurde ebenfalls geprüft. Der Versuchsansatz wurde an 2 Tieren unter Standardbedingungen durchgeführt.

Nach Flux 1 wurde der Puffer der Kontrollgruppe erneuert und zeitgleich der Puffer der Versuchsgruppe gegen den Versuchspuffer ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Butyrat) ausgetauscht. Die Konzentration von $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Butyrat in der Versuchsgruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Effekt auf den Bikarbonattransport ($p = 0,655$). Die Werte der Kontrollgruppe fielen mit einer Reduktion um $2,75 \text{ µeq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ sogar stärker als die der Versuchsgruppe ($1,59 \text{ µeq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$).

Flux (Differenzen)	Kontrolle $J_{ms} \text{HCO}_3^-$	Versuch (Butyratzugabe) $J_{ms} \text{HCO}_3^-$		Anzahl der Schafe / Gewebe	
				Kontrolle	Versuch
$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	2,75	25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	1,59	2/3	2/4

Tab. 6 Einfluss von Butyrat ($25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) in der Inkubationslösung auf den Bikarbonattransport $J_{ms} \text{HCO}_3^-$ [$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$], Differenzen der Kontroll- und Versuchsgruppe zwischen Flux 1 und dem Mittelwert aus Flux 2 und 3, sowie die Anzahl der Epithelien und Schafe je Gruppe.

4.4.3.3. Ammoniak

Vorhergehende Versuche führten zu der Schlussfolgerung, dass Ammoniak (NH_3) durch Diffusion in die Zelle gelangt, dort ein Proton aufnimmt und folglich den pH_i verändert. Diese Veränderung könnte wiederum den Bikarbonattransport beeinflussen.

Es wurde Ammoniumchlorid in zwei Konzentrationen ($5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mukosal) eingesetzt. Alle Epithelien sind bis zum Ende der ersten Fluxperiode (90. min) unter Standardbedingungen inkubiert worden. Nach Abschluss von Flux 1 wurde der mukosalen Seite des Systems Ammoniumchlorid zugesetzt. Um die veränderte Osmolarität der mukosalen Seite auszugleichen, wurde die gleiche Konzentration Mannitol der serosalen Seite hinzugefügt. Der Kontrollgruppe wurde Mannitol in entsprechender Konzentration auf beiden Seiten zugegeben. Um einen Einfluss der Osmolarität gänzlich ausschließen zu können, wurde in dem Versuchsansatz mit $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ammoniumchlorid dem mukosalen Puffer zusätzlich $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mannitol hinzugefügt. Auf diese Weise wurde am Ende des Flux 1 in allen Kammern auf beiden Seiten die Osmolarität um $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ heraufgesetzt.

Flux (Differenzen)	Kontrolle $J_{ms} \text{HCO}_3^-$	Versuch (Ammoniumchloridzugabe) $J_{ms} \text{HCO}_3^-$		Anzahl der Schafe / Gewebe	
				Kontrolle	Versuch
$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	1,41	5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	2,85	2/4	2/4
$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	1,87	15 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$	2,88	3/6	3/6

Tab. 7 Einfluss von Ammoniak auf den Bikarbonattransport. Die Differenzen der Transportraten ($J_{ms} \text{HCO}_3^-$ [$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$]) der Kontroll- und Versuchsgruppe zwischen Flux 1 und dem Mittelwert aus Flux 2 und 3, sowie die Anzahl der Epithelien und Schafe je Gruppe.

Es konnte weder bei einer Konzentration von $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($p = 0,18$) noch von $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ($p = 0,109$) Ammoniumchlorid ein signifikanter Einfluss auf die transportierte

Bikarbonatmenge festgestellt werden. Nach dem Zusatz von 5 mmol·l⁻¹ wurde die Transportrate um 2,85 µeq·cm⁻²·h⁻¹ gesenkt. Die Werte der Kontrollgruppe hingegen fielen ohne Ammoniumeinfluss in der gleichen Zeit um 1,41 µeq·cm⁻²·h⁻¹. Eine Konzentration von 15 mmol·l⁻¹ Ammoniumchlorid führte zu einem größeren Unterschied zwischen der Abnahme von Versuchs- (Differenz = 2,88 µeq·cm⁻²·h⁻¹) und Kontrollgruppe (Differenz = 1,87 µeq·cm⁻²·h⁻¹), aber wiederum nicht zu einem signifikanten Unterschied.

In Tab. 6 sind die **Differenzen von Flux 1 und (nur) Flux 3** für die Ammoniumchloridkonzentrationen 5 und 15 mmol·l⁻¹ aufgeführt. Die Differenzen von Flux 1 und Flux 3 der Versuchs- und Kontrollgruppe für 5 mmol·l⁻¹ so wie bei 15 mmol·l⁻¹ weichen stärker voneinander ab. Die Werte lassen einen Trend erkennen, der aber aufgrund der Stichprobenanzahl statistisch nicht objektiviert werden kann.

Flux (Differenzen)	Kontrolle J _{ms} HCO ₃ ⁻	Versuch (Ammoniumchloridzugabe)		Anzahl der Schafe / Gewebe	
		J _{ms} HCO ₃ ⁻		Kontrolle	Versuch
µeq·cm ⁻² ·h ⁻¹	1,918	5 mmol·l ⁻¹	3,597	2/4	2/4
µeq·cm ⁻² ·h ⁻¹	1,475	15 mmol·l ⁻¹	4,701	3/6	3/6

Tab. 8 Einfluss von Ammoniumchlorid auf den Bikarbonattransport. Die Differenzen der Transportraten (J_{ms} HCO₃⁻ [µeq·cm⁻²·h⁻¹]) der Kontroll- und Versuchsgruppe zwischen Flux 1 und Flux 3, sowie die Anzahl der Epithelien und Schafe je Gruppe.

4.5. Die Rolle des Natriums

Es ist anzunehmen, dass der Natriumtransport indirekt mit dem Transport von HCO₃⁻ gekoppelt ist, wie die Versuche mit Amilorid (nicht signifikant) und HCTZ (hoch signifikant) gezeigt haben. Aus diesem Wissen ergab sich die Frage, welche Natriumkonzentration mukosal vorhanden sein muss, um die Funktion der beiden Transporter (Na⁺/H⁺ und Na⁺/Cl⁻ Kotransport), die beide nur durch die Ionengradienten (primär mukosales Na⁺), energetisiert werden, aufrecht zu erhalten und somit den Bikarbonattransport zu gewährleisten. Wie groß kann die Abweichung (Abnahme) der Natriumkonzentration luminal sein, die zu einer Reduktion des Bikarbonattransportes führt? Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurde die mukosale Natriumkonzentration reduziert. Das Natrium wurde durch Kalium ersetzt, um die Osmolarität konstant auf 300 mmol·l⁻¹ zu halten und um die physiologisch reziproke Veränderung dieser Kationen *in vivo* zu simulieren. Die Natrium- und Kaliumkonzentration auf der mukosalen Seite ergaben in der Summe stets 150 mmol·l⁻¹.

Alle Epithelien wurden unter Standardbedingungen mit mukosal $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ und $145 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Na}^+$ inkubiert. Nach der ersten Fluxperiode (31.-90. min) wurde bei allen Kammern der Puffer mukosal gewechselt. Die Säulen der Epithelien der Versuchsgruppen wurden mit dem entsprechenden Versuchspuffer (100, 80, 65, 50, 30, 20 und $5,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Na}^+$) aufgefüllt. Bei der Kontrollgruppe wurde lediglich der Standardpuffer gewechselt, um einen Einfluss des Ablassens und Neubefüllens auf den Bikarbonattransport ausschließen zu können.

Im ersten Schritt wurde Natrium mukosal von $145 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ reduziert. Bei dieser Konzentration wurde eine signifikante Verringerung ($p = 0,043$) des Bikarbonattransportes der Versuchsgruppe (Differenz = $3,52 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Differenz = $1,78 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) gemessen. Der Bikarbonattransport sank von $5,03 \pm 1,72 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ auf $1,51 \pm 1,57 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Die Kontrollgruppe transportierte im Flux 1 (31.-90. min) $5,93 \pm 2,18 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ und in der zweiten Versuchshälfte $4,15 \pm 1,89 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ (übliche zeitabhängige Abnahme).

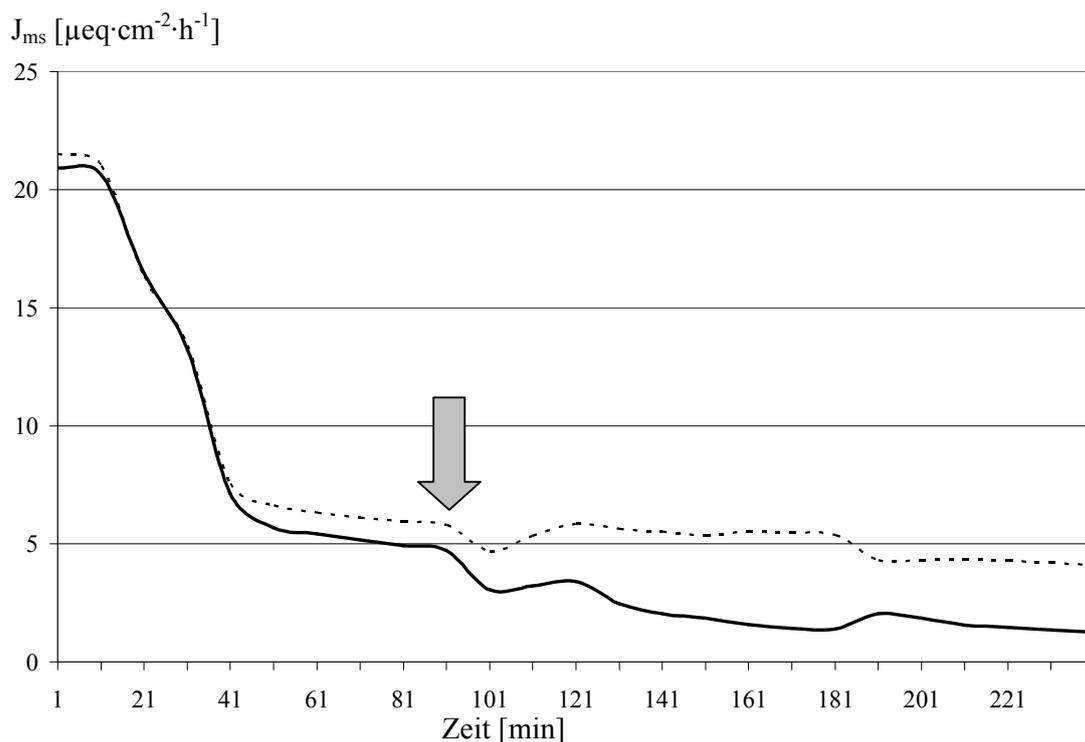


Abb. 13 Der Bikarbonattransport dargestellt über 240 min. Nach der 90. Minute wurde in der Versuchsgruppe die Natriumkonzentration von $145 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ gesenkt. Die gestrichelte Linie stellt die Kontroll-, die durchgängige Linie die Versuchsgruppe und der Pfeil den Zeitpunkt des Pufferwechsels (mukosale Reduktion auf $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Na}^+$) dar. (N = 6/6, n = 7/8, Kontrolle/Versuch, \bar{x})

In Abb. 13 wird deutlich, dass der Bikarbonattransport der Versuchsgruppe (durchgängige Linie) ab der 90. Minute einbricht. Zwar sinkt dieser schon vorher ab, jedoch nicht vergleichbar stark. Während die Kontrollgruppe (gestrichelt) langsam und kontinuierlich absinkt, fällt die Kurve der Versuchsgruppe gegenüber dem anfänglichen Transportniveau (31.-90. min) signifikant.

In weiteren Versuchen wurde geprüft, welche Verringerung der mukosalen Natriumkonzentration zu einer Abnahme des Bikarbonattransportes führt. Die Natriumkonzentration wurde in kleinen Schritten $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ angenähert ($100, 80, 65, 57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Bei $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Natrium war der Bikarbonattransport unbeeinflusst. Er sank von $6,48 \pm 1,82 \text{ } \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ auf $4,36 \pm 1,41 \text{ } \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ (Differenz = $2,12 \text{ } \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$), vergleichbar mit der zeitlich bedingten Abnahme der Transportrate der Kontrollgruppe (Differenz = $2,49 \text{ } \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$).

Flux (Differenz)	Kontrolle $J_{\text{ms}} \text{HCO}_3^-$	Versuch (Na^+ Konzentrationsveränderungen)		Anzahl der Schafe / Gewebe	
		$J_{\text{ms}} \text{HCO}_3^-$		Kontrolle	Versuch
$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	2,49	$100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{Na}$	2,12	2/3	2/4
$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	1,55	$80 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{Na}$	1,67	2/2	2/2
$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	1,32	$65 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{Na}$	2,57	2/4	2/3
$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	2,60	$57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{Na}$	3,92	2/4	2/5
$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	1,78	$50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{Na}$	3,52*	4/9	4/9

Tab. 9 Einfluss der mukosalen Natriumkonzentration in der Inkubationslösung auf $J_{\text{ms}} \text{HCO}_3^-$ [$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$], Differenzen der Kontroll- und Versuchsgruppe zwischen Flux 1 und dem Mittelwert aus Flux 2 und 3, sowie die Anzahl der Epithelien und Schafe je Gruppe (* signifikant, $p < 0,05$). Jeder Versuchsansatz (jede Natriumkonzentration) wurde an einem anderen Tier durchgeführt.

Auch die weitere Reduzierung der Natriumkonzentration ($80 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{Na}^+$ und $70 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{K}^+$) verursachte keinen Unterschied zwischen der Kontroll- und Versuchsgruppe. Im Vergleich zu Flux 1 sank der Transport in der Kontrollgruppe um $1,55 \text{ } \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Bei der Versuchsgruppe sah man entsprechend eine Abnahme von $1,67 \text{ } \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Auch die weitere Verringerung der Natriumkonzentration (65 und $57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) beeinflusste den Bikarbonattransport nicht signifikant. Es kam zu einer Reduktion um $2,57$, bzw. $3,92 \text{ } \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, wohingegen der Transport in den Kontrollgruppen um $1,32$ und $2,60 \text{ } \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ abnahm.

Zu bestätigen blieb der beobachtete Abfall des Bikarbonattransportes ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{Na}^+$) für niedrigere Natriumkonzentrationen. Die weitere Verringerung der Natriumkonzentration auf

30 mmol·l⁻¹ zeigte eine größere Abnahme des Bikarbonattransportes in der Versuchsgruppe. Der in der Versuchsgruppe gemessene Transport reduzierte sich um 3,02 µeq·cm⁻²·h⁻¹ und nahm in der Kontrollgruppe nur um 1,01 µeq·cm⁻²·h⁻¹ ab. Diese Abnahme war jedoch nicht signifikant (p = 0,109).

Ebenso hat sich nach der Reduktion auf 20 mmol·l⁻¹ (p = 0,109) und 5,7 mmol·l⁻¹ (p= 1,38) der Transport nicht signifikant verringert. Mit 2,42 µeq·cm⁻²·h⁻¹ in der Versuchs- und 1,44 µeq·cm⁻²·h⁻¹ in der Kontrollgruppe war die Reduktion insgesamt gering. Auch ein Rückgang der Transportrate um 3,26 µeq·cm⁻²·h⁻¹ nach dem Wechsel der Natriumkonzentration auf 5,7 mmol·l⁻¹ war im Gegensatz zu 2,25 µeq·cm⁻²·h⁻¹ in der Kontrollgruppe nicht signifikant (s. Tab. 10). Das insignifikante Ergebnis der Reduzierung der mukosalen Natriumkonzentration (< 50 mmol·l⁻¹) war unerwartet. Eine detaillierte Betrachtung dieses Ergebnisses findet sich im Diskussionsteil dieser Arbeit.

Versuchsansatz	Kontrolle J _{ms} HCO ₃ ⁻	Versuch (Na ⁺ Konzentrationsveränderungen)		Anzahl der Schafe / Gewebe	
		J _{ms} HCO ₃ ⁻		Kontrolle	Versuch
µeq·cm ⁻² ·h ⁻¹	1,01	30 mmol·l ⁻¹ Na	3,02	3/6	3/5
µeq·cm ⁻² ·h ⁻¹	1,44	20 mmol·l ⁻¹ Na	2,42	3/7	3/7
µeq·cm ⁻² ·h ⁻¹	2,25	5,7 mmol·l ⁻¹ Na	3,26	5/9	5/12

Tab. 10 Einfluss der Natriumkonzentration (< 50 mmol·l⁻¹ Na) in der Inkubationslösung auf J_{ms} HCO₃⁻ [µeq·cm⁻²·h⁻¹], Differenzen der Kontroll- und Versuchsgruppe zwischen Flux 1 und dem Mittelwert aus Flux 2 und 3, sowie die Anzahl der Epithelien und Schafe je Gruppe.

In der Abb. 14 ist die Höhe der Transportraten mit verschiedenen Natriumkonzentrationen dargestellt. Bei der Betrachtung muss beachtet werden, dass die Werte aus Untersuchungen mit verschiedenen Tieren entstanden sind, deren Transportraten individuell hoch waren. Das Diagramm lässt deshalb keinen direkten Vergleich der Transportraten untereinander zu. Es wird gezeigt, dass der Transport bei einer Reduktion der Natriumkonzentration auf 50 mmol·l⁻¹ übermäßig abfiel. Auch wenn die Kontrollepithelien durchschnittlich weniger transportierten als bei anderer Konzentrationen, so war dieser Abfall deutlich.

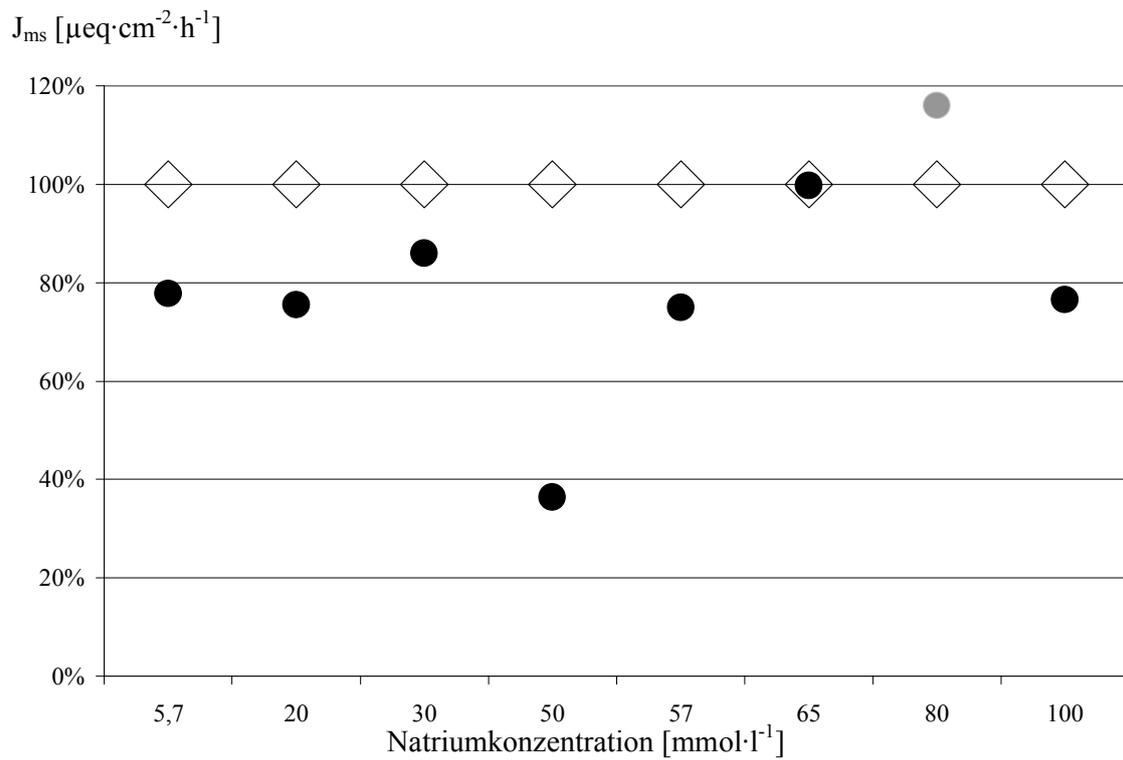


Abb. 14 Bikarbonattransport J_{ms} [$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$] bei unterschiedlichen Konzentrationen von Natrium. Die Werte der Versuchsgruppen sind als schwarze Kreise, die der Kontrollgruppen als Rauten dargestellt. Der graue Kreis repräsentiert die Werte von lediglich zwei Epithelien und ist als Ausreißer zu vernachlässigen.

5. DISKUSSION

5.1. Der Bikarbonattransport am Psalter unter Standardbedingungen

Die Absorption von Bikarbonat im Psalter kann aufgrund von frühen *in vivo* (in der Regel *post mortem* Untersuchungen) und einigen *in vitro* Versuchen als gesichert angesehen werden (Ekman and Sperber, 1953; Tiling, 1997; Schultheiss and Martens, 1999; Ali, 2005; Wegeler, 2008). Die vorliegenden Untersuchungen verfolgten daher die Absicht, den Transport von Bikarbonat unter Standardbedingungen (pH-Stat-Methode in Kombination mit der Ussing Kammer Technik) *in vitro* weiter zu charakterisieren (Niebuhr, 2003; Wegeler, 2008).

5.2. Die Hemmung des Bikarbonattransportes

5.2.1. Die Hemmung durch Amilorid

Amilorid ist ein Hemmstoff für den Na^+/H^+ Austauscher (NHE), der apikal im Psalterepithel lokalisiert ist (Martens and Gäbel, 1988). Es handelt sich um den Subtypen NHE3, wie neuere Untersuchungen gezeigt haben (Dölle, 2008). Die Zugabe von Amilorid in den vorliegenden Untersuchungen erfolgte mit der Absicht, eine mögliche gegenseitige Beeinflussung bzw. Abhängigkeit des Na^+/H^+ und $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ Austauschers aufzuzeigen.

Im Pansen- oder Netzmagenepithel werden Natrium und Chlorid absorbiert. Im Psalter hingegen wurde eine Natrium-Absorption, *in vivo* eine Chlorid-Sekretion (Pfeffer, Bertzbach et al., 1966; Engelhardt und Hauffe, 1975b) und *in vitro* eine Absorption beobachtet (Martens and Gäbel, 1988; Tiling, 1997). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde angenommen, dass der Transport von Natrium und Chlorid nicht wie in anderen Epithelien eng gekoppelt ist. Diese Annahme beruhte u.a. auch auf der Feststellung, dass der Chloridtransport *in vitro* nicht durch Amilorid beeinflusst wurde (Tiling, 1997).

Hypothese des Versuchsansatzes mit Amilorid war die bekannte Tatsache, dass dieses Diuretikum den Na^+/H^+ Austauscher hemmt und damit subapikal einen Abfall des pH_i verursacht. Das mit Hilfe des Anionenaustauschers durch die luminale Membran aufgenommene HCO_3^- dürfte somit teilweise mit dem nicht über den NHE rezirkulierten Protonen reagieren und somit die Karboanhydrasereaktion vermehrt in die Richtung der Kohlensäure ablaufen (Zerfall von Bikarbonat) (Knickelbein, Aronson et al., 1985; Martens, Gäbel et al., 1991). Nach der Zugabe von Amilorid sank der Bikarbonattransport ab, jedoch nicht signifikant. Es muss jedoch betont werden, dass die Aktivität des NHE in einer

Pufferlösung ohne SCFA gering ist und somit auch die Effekte der Hemmung des NHE auf den pH_i und damit auf den HCO_3^- Transport moderat ausfallen. Die Bedeutung dieser Arbeitshypothese – pH_i und HCO_3^- Transport – wird ersichtlich, wenn der Transport von SCFA groß ist (siehe unten).

Ferner ist in Betracht zu ziehen, dass das Psalterepithel sicherlich über weitere Mechanismen der Regulation des pH_i verfügt, die jedoch nicht bekannt sind. In Analogie zu Befunden am Pansenepithel ist anzunehmen, dass ein Na^+/H^+ Austauscher basolateral vorhanden sein könnte (Müller, Aschenbach et al., 2000). Ferner kann ein MCT 1 (Monokarboxylat Transporter) vorliegen (Müller, Aschenbach et al., 2000; Kirat, Masuoka et al., 2006). Die vH^+ -ATPase (vakuoläre Protonen ATPase) wurde im Pansenepithel nachgewiesen (Etschmann, Heipertz et al., 2006; Heipertz, 2007), so dass ein weiterer und nahe liegender Mechanismus zur Abgabe der Protonen am Psalter vorhanden sein könnte. Da bisher keiner dieser Mechanismen für das Psalterepithel objektiviert werden konnte, kann nur auf eine mögliche Beteiligung dieser Transporter ohne verbindliche Schlussfolgerungen verwiesen werden.

5.2.2. Die Hemmung durch HCTZ

Der Na^+/Cl^- Kotransporter wurde von Ali im Psalterepithel nachgewiesen (2005). Wegeler vermutete, dass durch diesen Transporter die luminale Chloridkonzentration geregelt wird, indem bei zu hohen luminalen Chloridkonzentrationen Chlorid aus dem Lumen aufgenommen werden kann (2008). Die Bedeutung dieses Kotransporters für den HCO_3^- Transport blieb offen. Durch die Zugabe von HCTZ sollte der Kotransporter gehemmt (Mertz and Schettler, 1959; Stokes, 1988) und somit getestet werden, ob ein Einfluss auf den Bikarbonattransport besteht.

Nach der Zugabe des Hemmstoffes sank der Transport von HCO_3^- erheblich und signifikant ab. Mit diesem Ergebnis wurde eine Wechselwirkung zwischen dem Kotransporter und dem $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ Austauscher nachgewiesen. Der positive Effekt des Na^+/Cl^- Kotransportes auf den HCO_3^- Transport ist sehr wahrscheinlich auf 2 Wirkungen zurückzuführen. A) Die luminale Aufnahme von Cl^- mit dem Na^+/Cl^- Kotransporter stellt sicher, dass subluminale für den $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ Transport (Cl^- Sekretion in das Lumen und HCO_3^- Aufnahme) immer genügend Cl^- Ionen zur Verfügung stehen und der Gradient von Cl^- für den passiven Anionenaustausch günstiger ausfällt. Die intrazelluläre Cl^- Konzentration im Psalterepithel ist nicht bekannt. Es ist aber anzunehmen, dass sie wahrscheinlich geringer als im Lumen ist. Der Cl^- Transport (Sekretion) aus der Zelle muss dann „bergauf“ erfolgen. Dieser Transport wird natürlich

erleichtert, wenn dieser Gradient durch den Na^+/Cl^- Kotransport und die luminale Cl^- Aufnahme in gewissen Grenzen gehalten wird. B) Für die NHE 1-3 ist nachgewiesen worden, dass sie für die übliche physiologische Aktivität intrazellulär Cl^- benötigen (Aharonovitz, Kapus et al., 2001). Durch den Einsatz von HCTZ und der Hemmung des Na^+/Cl^- Kotransportes wird somit nicht nur der Cl^- Gradient über der apikalen Membran geringer ausfallen – mit den erläuterten negativen Auswirkungen auf den passiven und von Ionengradienten getriebenen Anionenaustauscher – sondern es wird auch die Aktivität des NHE negativ beeinflusst. Es überrascht daher nicht, dass der negative Effekt von HCTZ so groß ausfällt.

Diese Beobachtung erfordert eine Korrektur der früheren Annahme, dass der transepitheliale Gradient der beteiligten Anionen entscheidend für diesen Transportvorgang sei (Tiling, 1997; Niebuhr, 2003).

Der Transport von HCO_3^- wird durch HCTZ zwar signifikant und erheblich reduziert, allerdings nie ganz eingestellt. Der verbleibende Transport von durchschnittlich $1,5 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ war konstant in allen Versuchen zu beobachten. Durch die Zugabe des Hemmstoffes wird die endogene Bikarbonatproduktion nicht beeinflusst. Es ist vorstellbar, dass es sich bei dem nach der HCTZ Zugabe gemessenen Transport um endogen produziertes Bikarbonat handelt, welches basolateral abgegeben wird.

Diese Annahme trifft in der Tat zu. Wegeler (2008) hat nach der Zugabe von $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Ethoxyzolid beobachtet, dass sich der HCO_3^- Transport des Psalterepithels in der Größenordnung von etwa $2 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ verringert. Es ist daher anzunehmen, dass der mit der pH-Stat-Methode gemessene $J_{\text{ms}} \text{HCO}_3^-$ Transport auch den Anteil HCO_3^- erfasst, der durch die intrazelluläre Bildung von HCO_3^- aus H_2O und CO_2 mit Hilfe der Karboanhydrase entsteht. Daher beinhalten unter den gegebenen Versuchsbedingungen die üblichen Fluxraten von HCO_3^- in der Größenordnung von $6 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ etwa 25 % endogene Bildung.

5.3. Der Einfluss von Elektrolytkonzentrationen

5.3.1. Der Einfluss der mukosalen Erhöhung der Chloridkonzentration

In vivo Versuche zeigten stets eine Bikarbonataufnahme und Chloridsekretion (Ekman and Sperber, 1953; Pfeffer, Bertzbach et al., 1966; Harrison, Keynes et al., 1970; Harrison, 1971; Engelhardt and Hauffe, 1975a; Sklan and Hurwitz, 1985). *In vitro* ergab sich dagegen eine Resorption von Cl^- (Harrison, 1971; Martens and Gäbel, 1988). Tiling (1997) erbrachte den Nachweis, dass der Cl^- Transport von den vorliegenden Gradienten abhängt. Unter

unphysiologisch hohen Chloridkonzentrationen (mukosal) beobachtete sie eine Cl^- Resorption am Psalter. Die Anhebung der mukosalen Chloridkonzentration auf $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, eine unphysiologisch hohe Konzentration, verursachte *in vitro* keine signifikanten Veränderungen des HCO_3^- Transportes (Wegeler, 2008). Dieses Versuchsergebnis, das mit dem zunächst angenommenen Modell der transepithelialen Anionengradienten als Triebkraft für den Anionentransport nicht zu vereinbaren war, wurde in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt und wird jetzt aufgrund der Versuche mit dem Hemmstoff des Na^+/Cl^- Kotransportes, HCTZ, verständlich. Die apikale Aufnahme von Cl^- trägt offensichtlich ganz maßgeblich dazu bei, dass der Cl^- Gradient über der apikalen Membran nicht wesentlich durch die luminalen Cl^- Konzentration verändert wird. Diese Ergebnisse bestätigen die aufgestellte Vermutung über die Funktion des Na^+/Cl^- Kotransporters. Der Kotransporter dient dem Aufbau bzw. zur Aufrechterhaltung eines transmembranären Chloridgradienten.

Die physiologische Bedeutung ergibt sich durch die erläuterte günstige Wirkung auf den Cl^- Gradienten. Generell ist die Cl^- Konzentration in der Vormagenflüssigkeit gering ($15\text{-}20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Die *in vivo* stattfindende Cl^- Sekretion im Austausch für die HCO_3^- Aufnahme würde diesen Mechanismus des Anionenaustauschs durch die Erhöhung der luminalen Cl^- Konzentration in der Effektivität herabsetzen. Das sezernierte Cl^- wird mit Hilfe des Na^+/Cl^- Kotransportes „recycelt“, so dass dem Kotransport eine weitere Funktion neben der Sicherstellung des Cl^- Gradienten zukommt. Durch die Wiederaufnahme des Cl^- via Na^+/Cl^- Kotransport wird eine Erhöhung der luminalen Cl^- Konzentration in Grenzen gehalten. Es muss jedoch betont werden, dass die Stöchiometrie der beiden Transportsysteme (Anionenaustausch einerseits und Na^+/Cl^- Kotransport andererseits) nicht bekannt ist. Da *in vivo* eine Nettosekretion von Cl^- erfolgt, ist die Transportrate des Anionenaustauschers größer als die Kapazität des Na^+/Cl^- Kotransporters.

Die relative Unabhängigkeit des HCO_3^- Transportes von der luminalen Cl^- Konzentration könnte auch noch in einem anderen Zusammenhang von physiologischer Bedeutung sein. Da ein Schließmuskel zwischen Labmagen und Blättermagen nicht vorhanden ist, könnte ein Reflux von Labmageninhalt zu einer Erhöhung der Cl^- Konzentration im Blättermageninhalt führen. Dieser Konzentrationsanstieg von Cl^- , sollte er vorkommen, kann als bedeutungslos für die HCO_3^- Resorption angesehen werden.

5.3.2. Die Bedeutung der mukosalen Natriumkonzentration

Durch den Konzentrationsunterschied von Na^+ zwischen Lumen und Epithel (Lumen > Zelle) besteht ein Gradient für die Natriumaufnahme. Gleichzeitig ist das Zellinnere negativ geladen (Martens, Gäbel et al., 1990), was einen Kationeneinstrom zusätzlich begünstigt.

Das Blutplasma enthält Natrium in einer Konzentration von $139\text{-}145 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Martens, Gäbel et al., 1990). Außerdem ist die Blutseite sowohl gegenüber dem Lumen als auch gegenüber dem Zellinneren positiv geladen, ebenso wie im Rumen (Dobson, 1959; Martens and Blume, 1987). Aus der Zelle (basolateral) muss Natrium also gegen einen chemischen und einen elektrischen Gradienten mit Hilfe der Na^+/K^+ ATPase heraustransportiert werden.

Die luminale Na^+ Konzentration ist relevant für den Bikarbonattransport durch die indirekte Koppelung mit zwei Na^+ Transportsystemen (Na^+/H^+ Austauscher, Na^+/Cl^- Kotransporter). Durch die Reduzierung der mukosalen Natriumkonzentration sollte einerseits die Bedeutung von Natrium für das Transportsystem erneut bestätigt werden (Amilorid, HCTZ). Andererseits sollte die niedrigste Konzentration festgestellt werden, bei der das Epithel die Transportprozesse – hier besonders die von Bikarbonat – aufrechterhalten kann.

Der Bikarbonattransport des Psalters zeigte sich sehr stabil gegenüber Schwankungen der Natriumkonzentration. Die Absenkungen von $145 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf 100 und $80 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, bis hin zu $65 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, verursachten keinen signifikanten Unterschied des Bikarbonattransportes. Umso deutlicher war der Abfall des Bikarbonattransportes bei $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Natrium in der Pufferlösung. Die Konzentration, bei der das System den Bikarbonattransport nicht mehr aufrecht zu halten vermag ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Na}^+$), scheint damit gefunden. Der Bikarbonattransport ist von der Na^+ Konzentration abhängig. Wahrscheinlich ergibt sich diese Beeinträchtigung des Bikarbonattransportes durch die indirekte Wechselwirkung dieses Transportsystems mit dem NHE und Na^+/Cl^- Kotransport.

Durch die niedrige Konzentration an Natrium fehlte der Austauschpartner der intrazellulären Protonen, wodurch ein Abfall des pH_i mit möglichen Konsequenzen für den HCO_3^- Transport verursacht werden kann, da die Protonen mit dem Bikarbonat reagieren können. Ferner ist es möglich, dass der Na^+/Cl^- Transport reduziert wird und somit subluminal Cl^- weder für den Anionenaustausch noch für die Aktivierung des NHE zur Verfügung steht (Aharonovitz, Kapus et al., 2001).

Die Ergebnisse der nachfolgenden weiteren Herabsetzung der Natriumkonzentration waren jedoch überraschend. Es erfolgte keine weitere Reduzierung, sondern es wurde im Gegenteil ein Transport in der ursprünglichen Höhe gemessen.

Für diese Beobachtung gibt es bislang keine befriedigende Erklärung. Eine Hypothese ist, dass Natrium im Kotransport mit Chlorid bzw. an dem NHE durch ein anderes Ion ersetzt wurde. Da Natrium gegen Kalium ausgetauscht wurde, könnte Kalium seinen Platz eingenommen haben (K^+/Cl^- Kotransport, bzw. K^+/H^+ Austauscher). Kalium hat die gleiche Ladung wie Natrium und könnte Na^+ bei den infrage kommenden Transportmechanismen zumindest theoretisch ersetzen. Der augenblickliche Wissensstand lässt jedoch diese Erklärung nur als mögliche (spekulative) Hypothese zu und ist nicht sehr wahrscheinlich, weil für K^+ bei der Nutzung der angenommenen Transporter (NHE oder Na^+/Cl^- Kotransport) die passiv treibenden Ionengradienten nicht oder unzureichend vorhanden sind.

Aufgrund dieser Unsicherheiten lassen sich im Hinblick auf mögliche Wechselwirkungen zwischen dem Na^+ Transportsystemen und dem HCO_3^- Transport nur folgende und vorläufige Aussagen treffen:

Es gibt diese Wechselwirkungen. Die Befunde mit den Blockern der Na^+ Transportmechanismen und der Herabsetzung der luminalen Na^+ Konzentration ($50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) unterstützen diese Annahme.

Die mögliche Ersatzfunktion von Kalium ist sehr spekulativ. Sie könnte geprüft werden, indem der Ersatz von Natrium nicht durch Kalium sondern z.B. durch das organische Kation NMDG (N-Methyl-D-Glucamin) erfolgt.

Es ist ferner möglich und wahrscheinlich, dass unter diesen Versuchsbedingungen weitere intrazelluläre Mechanismen der pH_i Regulation aktiviert werden, so dass der Ausfall des NHE kompensiert wird.

5.3.3. Kurzkettige flüchtige Fettsäuren (SCFA)

Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) diffundieren undissoziiert (fettlöslich und so membrangängig) durch die luminal Membran in die Epithelzelle (Ali, 2005; Ali, Shen et al., 2006). Durch die Aufnahme von protonierten SCFA wird der pH_i gesenkt. Die Aktivität des Na^+/H^+ Austauscher durch HSCFA Transport (protonierte short chain fatty acids – FS) wird gesteigert (Gäbel, Bestmann et al., 1991; Diernaes, Sehested et al., 1994; Ali, Shen et al., 2006) und die Protonen werden zurück ins Lumen transportiert.

Ziel dieses Versuchsansatzes war es daher, den Einfluss von SCFA und daher einer vermehrten Protonenaufnahme auf den Bikarbonattransport zu untersuchen. Hierzu wurden luminal unterschiedliche Konzentrationen von Acetat eingesetzt.

5.3.3.1. Acetat

Nach der Zugabe von $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Acetat wurde der Bikarbonattransport nicht signifikant reduziert. Die Differenz zwischen Flux 1 (Standardbedingungen) und Flux 2 und 3 war in der Versuchsgruppe etwas größer als in der Kontrollgruppe. Das Epithel war offensichtlich in der Lage, die gestiegene Protonenlast zu kompensieren.

Bei der Verwendung einer hohen Konzentration von $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Acetat fiel der Bikarbonattransport um ca. $5 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ (Differenz zwischen Flux 1 und dem Mittel aus Flux 2 und 3). Diese Verringerung war signifikant (s. Abb. 12).

Das Ergebnis unterstützt die vorgeschlagene Arbeitshypothese. Durch die hohe Acetatkonzentration gelangten in großem Umfang Protonen in das Epithel. Es ist anzunehmen, dass der pH_i stark gesunken ist, Bikarbonat intrazellulär als Puffer genutzt wurde und deshalb serosal nicht messbar war. Eine weitere mögliche Annahme ist, dass die These eines serosal vorhandenen Protonentransporters (NHE, vH^+ -ATPase (Heipertz, 2007), MCT1 (Kirat, Masuoka et al., 2006)) zutrifft (s. Kapitel 4.4.3.1.). Bikarbonat könnte weiterhin transportiert worden sein, würde jedoch durch serosal abgegebene Protonen maskiert (s. Kapitel 4.4.3.1.) (Müller, Aschenbach et al., 2000). Diese Erklärung erscheint jedoch unwahrscheinlich, weil sie bedeuten würde, dass die luminal mit dem Acetat aufgenommenen Protonen durch das gesamte mehrschichtige Epithel diffundieren können, ohne durch weitere Puffersysteme eliminiert zu werden.

$100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Acetat sind unphysiologisch hoch. Da die Summe der SCFA jedoch in der Regel höher ist und da sehr wahrscheinlich alle SCFA überwiegend in der protonierten Form resorbiert werden, ist der Versuchsansatz als „physiologisch“ anzusehen. Acetat wurde gewählt, weil es im Pansenepithel kaum metabolisiert wird (Gäbel and Sehested, 1997) und angenommen wurde, dass dies auch für den Psalter zutrifft. Eine Verstoffwechslung könnte infolge der CO_2 Bildung und der Umsetzung durch die Karboanhydrase den Bikarbonattransport beeinflussen.

Eine Hemmung des HCO_3^- Transportes durch Acetat könnte auch durch den Transport von Acetat über den angenommenen Anionenaustauscher infolge der Verdrängung von HCO_3^- erfolgen, wie sie am Pansenepithel (Gäbel and Sehested, 1997) oder am Colonepithel (Binder, Rajendran et al., 2005) nachgewiesen wurde. Dieser kompetitive Mechanismus wurde von Tiling geprüft und nicht bestätigt. SCFA sind offensichtlich nicht am Anionenaustausch beteiligt (1997).

5.3.3.2. Butyrat

Butyrat ist eine weitere SCFA, die bei der Umsetzung von Kohlenhydraten im Rumen entsteht. Da es in der protonierten Form (HSCFA) in das Epithel gelangt und dort ein Proton freisetzt, säuert es das intrazelluläre Milieu an (Etschmann, Heipertz et al., 2006). Es wird hochgradig metabolisiert, während es durch das Pansenepithel transportiert wird. Durch diese Reaktion entstehen Ketonkörper (Acetoacetat, 3-Hydroxybutyrat) und Kohlensäure (Weekes, 1974; Weigand, Young et al., 1975; Sehested, Diernaes et al., 1999). Entsprechende Untersuchungen sind für das Psalterepithel nicht bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass sich entsprechende Umsetzungen ergeben.

Butyrat wurde in einer Konzentration von $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ eingesetzt. Es zeigte sich nach Zusatz von Butyrat kein signifikanter Einfluss auf den Bikarbonattransport, so dass die Schlussfolgerung zulässig ist, dass Butyrat in den üblichen physiologischen Konzentrationen keinen Einfluss auf den Bikarbonattransport hat. Ob die Metabolisierung von Butyrat (CO_2 Bildung) u.U. zur Stabilisierung des pH_i und damit auch des Bikarbonattransportes beiträgt, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

5.3.4. Der Einfluss von Ammoniak

Ammoniak¹ entsteht in den Vormägen durch den mikrobiellen Abbau stickstoffhaltiger Verbindungen. Hierbei handelt es sich primär um die Hydrolyse von Proteinen zu Aminosäuren und die Freisetzung von Ammoniak aus den Aminosäuren. Ferner wird Harnstoff (Urea) durch Urease zu Ammoniak abgebaut. Ammoniak liegt in der Vormagenflüssigkeit bei einem pH Wert von 7,0 nur zu etwa 0,1 Prozent als NH_3 vor. Aufgrund seines pK-Wertes von 9,25 ist der größte Teil des Ammoniaks bei physiologischen pH Werten der Vormagenflüssigkeit (6,0 – 7,0) protoniert (Ammonium = NH_4^+).

Angenommen wird, dass NH_3 per Diffusion in das Epithel gelangt, sich dort mit einem Proton verbindet und somit zu einem Anstieg des pH_i führt, der wiederum eine Abnahme des Na^+ Transportes via NHE verursacht (Martens, Krützfeldt et al., 2004). Dieser Effekt luminalen Ammoniaks auf den pH_i war Grundlage entsprechender Versuche über den Bikarbonattransport.

Eine luminal Ammoniakkonzentration von 5 bzw. $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ beeinflusste den Bikarbonattransport nicht, so dass aufgrund des nachgewiesenen Effektes auf den Na^+ Transport via NHE und damit auf den pH_i (Anstieg) angenommen werden kann, dass ein

¹ Ammoniak liegt in wässrigen Lösungen als NH_3 oder NH_4^+ vor. Die Verwendung des Begriffes Ammoniak beinhaltet immer beide Formen. Wenn erforderlich, wird die jeweilige Form spezifiziert.

Anstieg des pH Wertes den Bikarbonattransport nicht beeinträchtigt. Da das Ausmaß der Veränderung des pH_i unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht bekannt ist, ist eine Generalisierung (Anstieg des pH Wertes = keine Effekte auf den Bikarbonattransport) dieser Aussage nicht möglich. Zulässig ist sicherlich die Bemerkung, dass die gewählten Ammoniakkonzentrationen von 5 bzw. 15 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, die physiologische Konzentrationen repräsentieren, den Bikarbonattransport nicht beeinträchtigen. Diese Schlussfolgerung lässt sich auch deswegen vertreten, weil der eingesetzte mukosale pH Wert von 7,4 und damit auch der NH_3 Anteil relativ hoch ist im Vergleich zu einem üblichen physiologischen pH Wert von 6,4. Da keine Hinweise vorliegen, dass NH_4^+ luminal in das Psalterepithel aufgenommen wird (Martens, Krüzfeldt et al., 2004) und somit nicht wie in Pansenepithelzellen intrazellulär Protonen mit entsprechenden Wirkungen auf den Bikarbonattransport (siehe Diskussion SCFA und Amilorid) freigesetzt werden können, ist es als unwahrscheinlich anzusehen, dass Ammoniak (weder NH_3 noch NH_4^+) den Bikarbonattransport beeinflusst.

Ein möglicher methodischer Fehler könnte sich aufgrund der Tatsache ergeben, dass NH_3 durch das Epithel diffundiert und serosal protoniert wird. Der Protonenverbrauch in der serosalen Lösung würde einen Anstieg des pH Wertes verursachen und damit einen verfälschten Bikarbonattransport ergeben. Zum Ausschluss der Möglichkeit, dass Ammoniak den serosalen Puffer alkalisiert hat, wurde ein entsprechender Versuchsansatz bikarbonatfrei durchgeführt, aber mit 10 % Carbogen mukosal begast und zur Hemmung der Karboanhydrase Ethoxazolamid zugesetzt. Es wurde ein minimaler pH Anstieg über die Zeit (240 min) beobachtet, der etwa $0,1 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ Bikarbonattransport entsprach. Dies kann einerseits durch weiterhin endogen produziertes Bikarbonat verursacht sein (nicht gehemmte CA) oder andererseits durch den möglichen Transport von NH_3 . Aufgrund der sehr geringen Transportrate ist jedoch dieser Fehler zu vernachlässigen.

5.4. Anmerkungen zur Methode

Die Präparation der Epithelien erfolgte möglichst schnell nach dem Betäuben und Entbluten der Schafe. Die stumpfe Präparation der Blätter wurde möglichst schonend durchgeführt, damit das Epithel bzw. der Epithelverband nicht geschädigt wird. Trotzdem ergaben sich hin und wieder außerordentlich hohe Transportraten bei geringem Widerstand und makroskopisch unversehrtem Epithel. Ferner kann es durch die mechanische Beanspruchung des Epithels beim Einbau in die Ussing Kammern zur vermehrten Ausschüttung von Prostaglandinen kommen. Als Konsequenz dieser mechanischen Beanspruchung der Epithelien und der

vermuteten Freisetzung von Mediatoren (wie z.B. von Prostaglandinen) wurde unmittelbar nach dem Einspannen der Epithelien relativ hohe Gewebeleitfähigkeitswerte und Transportraten beobachtet, die sich jedoch im Verlauf von 30 min stark verringerten. Daher wurden diese ersten 30 min jeden Versuches zur Äquilibration genutzt und die Daten bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Vermutlich durch das unterschiedliche Alter und/oder die Individualität der Tiere bedingt kam es zu einer Inhomogenität der Messwerte der einzelnen Tiere. Dies war deutlich sowohl den Transportraten als auch der Elektrophysiologie zu entnehmen. Dieser (bekannte) Tatbestand wurde bei der Versuchsdurchführung und -auswertung bedacht. Kontroll- und Versuchsepithelien wurden vom gleichen Tier zeitgleich eingesetzt. Durch die statistische Auswertung abhängiger Stichproben mit Hilfe des Wilcoxon Tests wurde diese Abhängigkeit der Epithelien zu dem zugehörigen Tier berücksichtigt. Schwankungen der Transportraten zwischen einzelnen Tieren wurde ebenfalls Rechnung getragen, indem die Differenz der Fluxe gebildet wurde. Diese Differenzen wurden zur statistischen Auswertung genutzt.

Das zur Diskussion gestellte Transportmodell (Abb. 15) wird vereinfacht als eine Zelle des Psalters dargestellt. Tatsächlich handelt es sich aber um ein mehrschichtiges Epithel. Die verschiedenen Zellschichten dürften analog zu den Befunden am Pansen mit Gap junctions verbunden sein (Henrikson, 1971; Graham and Simmons, 2005) und so einen Transport von der luminalen zur basolateralen Seite per Diffusion erlauben. Im Hinblick auf den transepithelialen Ionentransport kann daher das mehrschichtige Psalterepithel als ein Transportkompartiment angesehen werden.

Die verwendete *in vitro* Methode kann die *in vivo* Verhältnisse nur bedingt simulieren, weil serosal eine ungepufferte Lösung eingesetzt werden musste, um mit Hilfe des pH Wertanstieges den Bikarbonattransport zu erfassen. Damit ergeben sich automatisch Veränderungen im Hinblick auf die für den Anionenaustauscher der basolateralen Membran wirksamen Ionengradienten und sicherlich auch bezüglich der Höhe der Transportraten. Diese mögliche Verfälschung ist jedoch nur quantitativer Natur und von untergeordneter Bedeutung, weil für die Kontrollepithelien und die Behandlungsgruppe gleiche Bedingungen gegeben waren. Entscheidend für die Interpretation waren die relativen Änderungen und nicht die Größenordnung der Transportraten.

Die indirekte Bestimmung der Bikarbonattransportraten durch die pH-Stat-Methode ist fehleranfällig, wenn weitere Transportsysteme existieren, die zu einem Transport einer Base oder eines Protons in das serosale Kompartiment beitragen können. An erster Stelle wäre der NHE1 zu nennen, der basolateral Protonen ausschleusen könnte. Entsprechende Versuche mit

Blockern (Amilorid als unspezifischer NHE Blocker und Cariporid spezifischer Blocker für den NHE1) unterstützen nicht die Annahme eines NHE1 in der basolateralen Membran.

Alle Versuche waren *in vitro*. Teilweise lagen die Elektrolytkonzentrationen weit über (100 mmol·l⁻¹ Acetat) oder unter den physiologischen Konzentrationen (niedrige Natriumkonzentrationen). Die Erkenntnisse dieser Versuche geben einen besseren Einblick in die Transportprozesse des Psalters. Sie sind jedoch quantitativ nur bedingt auf das Tier übertragbar.

Die Ussing Kammer Methode ist **die** Standardmethode für die Untersuchung von Transportprozessen in Epithelien *in vitro* und entsprechend verbreitet wird sie weltweit eingesetzt (Winterhager, Stewart et al., 1986; Sellin and Desoignie, 1989; Vidyasagar, Barmeyer et al., 2005). In unserer Kombination aus Ussing Kammer und pH-Stat-Methode (Niebuhr, 2003; Wegeler, 2008) wurde mit einem serosal bikarbonatfreien und ungepufferten System gearbeitet. Es war nicht möglich, gleichzeitig mit dem Bikarbonattransport einen möglichen Säuretransport nach serosal zu messen. Diese mögliche Komplikation wurde durch entsprechende Versuchsansätze geprüft (Blockade von NHE1 serosal) und kann praktisch ausgeschlossen werden. Eine Alkalisierung des pH Wertes durch andere Ionen (z.B. Ammoniak) fiel gering aus und war nur für diesen Versuchsansatz von Bedeutung. Bemerkenswert ist der schon in der Untersuchung von Wegeler (2008) hohe Anteil des Bikarbonattransportes, der durch die Aktivität der Karboanhydrase bedingt ist. Trotz möglicher Grenzen der verwendeten Methode und der durchgeführten Versuchsansätzen, können aufgrund der Ergebnisse Rückschlüsse auf die Rolle und den Transport des Bikarbonats, sowie auf einflussnehmende Faktoren gezogen werden. Die Transportraten waren konstant, wenn auch unterschiedlich hoch. Durch die Durchführung jeden Versuchsansatz an mehreren Tieren wurde gezeigt, dass die beobachteten Effekte (reduzierter Bikarbonattransport) reproduzierbar waren.

5.5. Schlussfolgerungen für ein Modell des omasalen HCO₃⁻ Transportes

Alle Überlegungen zu der kombinierten Zusammenstellung der bisher bekannten Transportmechanismen am Psalterepithel müssen sich zunächst an der etablierten Tatsache orientieren, dass SCFA und HCO₃⁻ absorbiert werden und Cl⁻ sezerniert wird. Die Charakterisierung dieser Transportmechanismen hat zu der Schlussfolgerung geführt, dass die SCFA primär in der undissoziierten Form (HSCFA) luminal aufgenommen werden und für

die Anionen ein Austausch (Cl^- Sekretion und HCO_3^- Aufnahme) erfolgt. Die parallele Absorption von HSCFA (Säure) und HCO_3^- (Base), die aus physiologischen Gründen notwendig ist (Ansäuerung des Labmageninhalts, Vermeidung der Freisetzung von CO_2 im Labmagen) erfordert eine effektive Regulation des pH_i und Mechanismen der Verfügbarkeit von Cl^- für den Anionenaustausch zur Sicherstellung der HCO_3^- Aufnahme (Cl^- Gradienten) und des HCO_3^- Transportes durch das Epithel (pH_i Regulation). Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse bestätigen diese Arbeitshypothese. Die Belastung des pH_i durch hohe luminale Acetataufnahme verringert den HCO_3^- Transport. Zukünftig wäre zu prüfen, welche Bedeutung der NHE unter diesen Versuchsbedingungen hat. Die Wechselwirkungen zwischen dem Na^+/Cl^- Kotransport und dem HCO_3^- Transport waren überraschend und sind nach bisheriger Kenntnis in der aufgezeigten Kombination nicht beschrieben worden.

Im Hinblick auf die Molekularbiologie der vorgeschlagenen Transportmechanismen ist zurzeit nur die Schlussfolgerung zulässig, dass es sich bei dem NHE in der luminalen Membran um den NHE3 handelt. Die mRNA der Anionenaustauscher ist für DRA und AE2 (Wegeler, 2008) nachgewiesen worden. Die Lokalisation dieser Transportproteine (apikal oder basolateral) ist jedoch nicht bekannt. Wenn man die in anderen Epithelien nachgewiesene Lokalisation für diese Transportproteine übernimmt (Antalis, Reeder et al., 1998; Rajendran, Black et al., 2000; Jacob, Rossmann et al., 2002), könnte DRA apikal und AE2 basolateral positioniert sein.

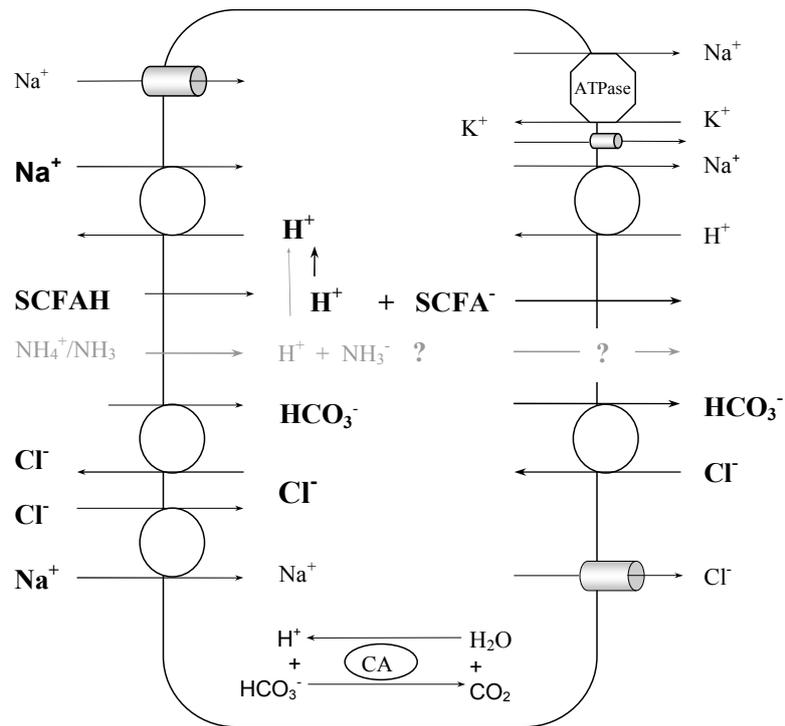


Abb. 15 Schematische Darstellung der bisher nachgewiesenen Transportmechanismen für Na⁺, SCFA, Cl⁻ und Bikarbonat. Fett schwarz sind die Ionen aufgenommen, deren Transportmechanismen und Interaktionen aufgezeigt bzw. bestätigt wurden. Hellgrau dargestellte Prozesse sind aufgrund der vorliegenden Beobachtungen weiterhin unsicher und bedürfen weiterer Studien. Fein schwarz sind vermutete und nachgewiesene Transporter, enzymatische Abläufe und Carrier, die in dieser Studie nicht speziell untersucht wurden.

6. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

6.1. Zusammenfassung

Charakterisierung des HCO_3^- Transportes des isolierten Psalterepithels des Schafes

Die transportphysiologischen Funktionen des Psalters sind bis heute vergleichsweise wenig bekannt. Ein Großteil der Erkenntnisse über Transportprozesse des Vormagensystems der Wiederkäuer wurde am Rumen gewonnen. Es war Absicht der vorliegenden Arbeit, Effekte verschiedener Transportmechanismen und somit mögliche Interaktionen mit dem Bikarbonattransport näher zu untersuchen. Hierzu wurden mit einer Kombination aus pH-Stat-Methode und Ussing Kammer Technik *in vitro* Versuche an isolierten Epithelien des Psalters von Schafen über den Transport von HCO_3^- durchgeführt.

Folgende Ergebnisse wurden gewonnen:

- Der Transport von HCO_3^- (Absorption) beträgt unter Kontrollbedingungen (mukosal $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^- / 10 \% \text{ CO}_2$) $4,79$ bis $9,13 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.
- Die Hemmung des Na^+/H^+ Austauschers durch Amilorid ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mukosal) verringert den HCO_3^- nicht signifikant.
- Die Annahme, dass Fettsäuren undissoziiert in das Epithel diffundieren und so ein Proton in das Epithel transportiert wird, das den Bikarbonattransport beeinträchtigt, ist bestätigt. Hohe Konzentrationen ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Acetat) reduzierten den Bikarbonattransport signifikant.
- Ammoniak wird zum Großteil als NH_3 aufgenommen. Der Transport von HCO_3^- wird nicht beeinflusst.
- Die Hemmung des Na^+/Cl^- Kotransportes durch HCTZ ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mukosal) verursacht eine erhebliche und signifikante Reduzierung der HCO_3^- Transportes. Es wird angenommen, dass die luminale Cl^- Aufnahme über den Na^+/Cl^- Kotransport der Energetisierung des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauschers dient (Cl^- Sekretion/ HCO_3^- Aufnahme).
- Die luminale Bikarbonataufnahme wird nicht durch eine hohe ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) mukosale Chloridkonzentration beeinflusst.

Die Ergebnisse lassen in Verbindung mit Erkenntnissen der Literatur zu, dass die Absorption von Bikarbonat im Psalter von Schafen durch zwei in Serie geschaltete Anionenaustauscher vermittelt wird. Die Aktivität des apikalen Anionenaustauschers und damit die

Bikarbonatabsorption wird beeinflusst durch den pH_i und durch die intrazelluläre Verfügbarkeit von Cl^- , die durch den Na^+/Cl^- Kotransport sichergestellt wird. Somit ergibt sich eine indirekte Interaktion zwischen den Na^+ Transport via NHE und Na^+/Cl^- Kotransport und dem HCO_3^- Transport.

6.2. Summary

Characterization of HCO_3^- transport in isolated omasum epithelium of sheep

The transport-physiological functions of the omasum are relatively unknown to date. The majority of knowledge about transport mechanisms in the forestomach system of ruminants is originated from research related to the rumen. The purpose of this thesis was to better characterize effects of different transport mechanisms and hence interactions with the bicarbonate transport in the omasum. To this end, we combined the pH-Stat-method and the Ussing Chamber method to study bicarbonate transport in hay-fed sheep omasum via *in vitro* experiments.

We obtained the following results:

- The range of bicarbonate transport (absorption) of the control group (mucosal $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^- / 10 \% \text{ CO}_2$) was $4,79 - 9,13 \text{ } \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.
- Inhibiting the Na^+/H^+ exchanger by amiloride ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mucosal) does not reduce HCO_3^- significantly.
- The assumption, that SCFA diffuse undissociated into the epithel while carrying a proton with them which inhibits bicarbonate transport, is confirmed. High concentrations ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ acetate) reduce transport rates significantly.
- The majority of ammonia is absorbed as NH_3 . HCO_3^- transport is not affected.
- Inhibiting Na^+/Cl^- Cotransport by HCTZ ($1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mucosal) causes a significant reduction of HCO_3^- transport. We suspect that luminal Cl^- absorption via the Na^+/Cl^- Cotransport serves the purpose of energizing the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (Cl^- secretion/ HCO_3^- absorption).
- Luminal bicarbonate absorption is not impacted by high ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) mucosal chloride concentration.

Combined with results from literature, these results allow that bicarbonate absorption in sheep omasum is mediated by two in serial placed anion exchangers in the apical and basolateral membrane. The activity of the apical anion exchanger – and therefore bicarbonate absorption – is impacted by pH_i and the intracellular availability of Cl^- , which is secured by the Na^+/Cl^- Kcotransport. Therefore, we conclude an indirect interaction between Na^+ transport via NHE and Na^+/Cl^- Kcotransport and the HCO_3^- transport.

7. LITERATUR

A

Aalkjaer, C.; Frische, S.; Leipziger, J.; Nielsen, S., et al. (2004):
Sodium coupled bicarbonate transporters in the kidney, an update.
Acta Physiol Scand 181(4). S. 505-12.

Aharonovitz, O.; Kapus, A.; Szaszi, K.; Coady-Osberg, N., et al. (2001):
Modulation of Na^+/H^+ exchange activity by Cl.
Am J Physiol Cell Physiol 281(1). S. C133-41.

Ali, O.; Shen, Z.; Tietjen, U.; Martens, H. (2006):
Transport of acetate and sodium in sheep omasum: mutual, but asymmetric interactions.
J Comp Physiol [B]. S. 1-11.

Ali, O. H. A. (2005):
In vitro studies of ion transport in sheep omasum: interaction between Na, Cl and short chain fatty acids.
Berlin, Freie Universität. 138 S.

Alper, S. L.; Darman, R. B.; Chernova, M. N.; Dahl, N. K. (2002):
The AE gene family of Cl/HCO_3^- exchangers.
J Nephrol 15(Suppl 5). S. S41-53.

Alvarez, B. V.; Loisel, F. B.; Supuran, C. T.; Schwartz, G. J., et al. (2003):
Direct extracellular interaction between carbonic anhydrase IV and the human NBC1 sodium/bicarbonate co-transporter.
Biochemistry 42(42). S. 12321-9.

Antalis, T. M.; Reeder, J. A.; Gotley, D. C.; Byeon, M. K., et al. (1998):
Down-regulation of the down-regulated in adenoma (DRA) gene correlates with colon tumor progression.
Clin Cancer Res 4(8). S. 1857-63.

B

Badawy, A. M.; Campbell, R. M.; Cuthbertson, D. P.; Fell, B. F., et al. (1958):
Further studies on the changing composition of the digesta along the alimentary tract of the sheep.
1. Total and non-protein nitrogen.
Br J Nutr 12(4). S. 367-83.

Ben-Ghedalia, D.; Tagari, H.; Zamwel, S.; Bondi, A. (1975):
Solubility and Net Exchange of Calcium, Magnesium and Phosphorus in Digesta Flowing Along Gut of Sheep.
Br J Nutr 33(1). S. 87-94.

Bergman, E. N. (1990):
Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species.
Physiol Rev 70. S. 567-590.

Binder, H. J.; Rajendran, V.; Sadasivan, V.; Geibel, J. P. (2005):
Bicarbonate secretion: a neglected aspect of colonic ion transport.
J Clin Gastroenterol 39(4 Suppl 2). S. S53-8.

Breves, G. (1991):
Physiologische Grundlagen des gastrointestinalen P-Umsatzes und Bedeutung einer nicht bedarfsgerechten P-Versorgung bei kleinen Wiederkäuern.
Übers. Tierernährung. 19. S. 23-44.

Brownlee, A.; Elliot, J. (1960):
Studies on the normal and abnormal structure and function of the omasum of domestic cattle.
Br Vet J 116(12). S. 467-473.

C

Care, A. D. (1994):
The absorption of phosphate from the digestive tract of ruminant animals.
Br Vet J 150(2). S. 197-205.

D

Dahl, N. K.; Jiang, L.; Chernova, M. N.; Stuart-Tilley, A. K., et al. (2003):
Deficient HCO_3^- transport in an AE1 mutant with normal Cl^- transport can be rescued by carbonic anhydrase II presented on an adjacent AE1 protomer.
J Biol Chem 278(45). S. 44949-58.

Diernaes, L.; Sehested, J.; Moller, P. D.; Skadhauge, E. (1994):
Sodium and chloride transport across the rumen epithelium of cattle in vitro: effect of short-chain fatty acids and amiloride.
Exp Physiol 79(5). S. 755-62.

Dobson, A. (1959):
Active transport through the epithelium of the reticulo-rumen sac.
J Physiol 146(2). S. 235-51.

Dölle, M. (2008 (unpublished)):
Charakterisierung des Natriumtransportes am isolierten Psalterepithel des Schafes
Berlin, Freie Universität Berlin. 105 S.

Dubberke, M. (1988):
Studies on the flux of inorganic phosphate and of calcium across the isolated mucosa of the sheep omasum.
Berlin, Freie Universität. 137 S.

E

Edrison, B. M.; Smith, R. H. (1979):
Absorption and secretion in the omasum of the young steer.
Ann Rech Vet 10(2-3). S. 354-5.

- Edrise, B. M.; Smith, R. H. (1986a):
Exchanges of magnesium and phosphorus at different sites in the ruminant stomach.
Arch Tierernähr 36(11). S. 1019-27.
- Edrise, B. M.; Smith, R. H.; Hewitt, D. (1986b):
Exchanges of water and certain water-soluble minerals during passage of digesta through the stomach compartments of young ruminating bovines.
Br J Nutr 55(1). S. 157-68.
- Ekman, J.; Sperber, I. (1953):
The distribution of concentrations of bicarbonate (including carbon dioxide) and chloride in the omasum of cows.
Kungl. Lantbrukshögskolans Annaler 19. S. 227 - 231.
- Engelhardt, W. v.; Hauffe, R. (1975a):
Functions of Omasum in Small Domestic Ruminants .4. Absorption and Secretion of Electrolytes.
Zentralbl Veterinärmed- Reihe A 22(5). S. 363-375.
- Engelhardt, W. v.; Hauffe, R. (1975b):
Role of the omasum in absorption and secretion of water and electrolytes in sheep and goats.
In: Digestion and Metabolism in the Ruminant. / I. W. McDonald, and A. C. I. Warner (Hrsg.).
Armidale: University of New England Publishing Unit. - S. 216 - 230.
- Etschmann, B.; Heipertz, K. S.; von der Schulenburg, A.; Schweigel, M. (2006):
A vH^+ -ATPase is present in cultured sheep ruminal epithelial cells.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 291(6). S. G1171-9.
- Everett, L. A.; Green, E. D. (1999):
A family of mammalian anion transporters and their involvement in human genetic diseases.
Hum Mol Genet 8(10). S. 1883-91.
- F**
- Favilli, N. (1937):
Struktur und Tätigkeit des dritten Magens (Blättermagen oder Psalter) bei den Hauswiederkäuern.
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift. S. 592 - 594.
- Ferreira, H. G.; Harrison, F. A.; Keynes, R. D. (1966):
Potential and Short-Circuit Current across Isolated Rumen Epithelium of Sheep.
Journal of Physiology-London 187(3). S. 631-&.
- Fitt, T. J.; Hutton, K.; Armstrong, D. G. (1979):
Site of absorption of magnesium from the ovine digestive tract.
Proc Nutr Soc 38(2). S. 65A.

G

Gäbel, G.; Aschenbach, J. R.; Muller, F. (2002):
Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations.
Anim Health Res Rev 3(1). S. 15-30.

Gäbel, G.; Bestmann, M.; Martens, H. (1991):
Influences of diet, short-chain fatty acids, lactate and chloride on bicarbonate movement
across the reticulo-rumen wall of sheep.
Zentralbl Veterinärmed A 38(7). S. 523-9.

Gäbel, G.; Sehested, J. (1997):
SCFA transport in the forestomach of ruminants.
Comp Biochem Physiol A Physiol 118(2). S. 367-74.

Giesecke, D.; Engelhardt, W. v. (1975):
Functions of Omasum in Small Ruminants
2. Fermentation Rate and DNA Content.
Zentralbl Veterinärmed A 22(3). S. 177-186.

Grace, N. D. (1981):
Phosphorus kinetics in the sheep.
Br J Nutr 45(2). S. 367-74.

Grace, N. D.; Ulyatt, M. J.; Macrae, J. C. (1974):
Quantitative digestion of fresh herbage by sheep
III. The movement of Mg, Ca, P, K, and Na in the digestive tract.
J. Agric. Sci. Camb. 82. S. 321 - 330.

Graham, C.; Simmons, N. L. (2005):
Functional organization of the bovine rumen epithelium.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 288(1). S. R173-81.

Greene, L. W.; Webb, K. E., Jr.; Fontenot, J. P. (1983):
Effect of potassium level on site of absorption of magnesium and other macroelements in
sheep.
J Anim Sci 56(5). S. 1214-21.

Grinstein, S.; Ship, S.; Rothstein, A. (1978):
Anion transport in relation to proteolytic dissection of band 3 protein.
Biochim Biophys Acta 507(2). S. 294-304.

H

Harrison, F. A. (1971):
Ion Transport across Rumen and Omasum Epithelium.
Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences
262(842). S. 301-&.

Harrison, F. A.; Keynes, R. D.; Zurich, L. (1970):
Ion Transport across Isolated Omasal Epithelium of Sheep.
Journal of Physiology-London 207(1). S. P24-&25.

Hauffe, R.; Engelhardt, W. v. (1975):
Functions of Omasum of Small Ruminants
3. Absorption of Water.
Zentralbl Veterinärmed A 22(4). S. 283-295.

Heipertz, K. S. (2007):
Die vH^+ -ATPase und ihre Bedeutung für die pH-Regulation bei ovinen Pansenepithelzellen.
Berlin, Freie Universität

Henrikson, R. C. (1971):
Mechanism of sodium transport across ruminal epithelium and histochemical localization of ATPase.
Exp Cell Res 68(2). S. 456-8.

Höfelmeier, G. (1991):
Untersuchungen über die Wirkung von Lasalocid auf Transportvorgänge isolierter Vormagenepithelien von Schafen.
Hannover, Tierärztl. Hochsch. 145 S.

Hofmann, R. R. u. S., B. (1982):
Die funktionelle Morphologie des Wiederkäuer-Magens. F. Enke Verlag, Stuttgart.

Holler, H.; Breves, G.; Dubberke, M. (1988):
Flux of inorganic phosphate and calcium across the isolated mucosa of the sheep omasum.
Zentralbl Veterinärmed A 35(9). S. 709-16.

Holtenius, K.; Bjornhag, G. (1989):
The significance of water absorption and fibre digestion in the omasum of sheep, goats and cattle.
Comp Biochem Physiol A 94(1). S. 105-9.

J

Jacob, P.; Rossmann, H.; Lamprecht, G.; Kretz, A., et al. (2002):
Down-regulated in adenoma mediates apical Cl^-/HCO_3^- exchange in rabbit, rat, and human duodenum.
Gastroenterology 122(3). S. 709-724.

K

Kirat, D.; Masuoka, J.; Hayashi, H.; Iwano, H., et al. (2006):
Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short-chain fatty acids absorption in caprine rumen.
J Physiol 576(Pt 2). S. 635-47.

Knickelbein, R.; Aronson, P. S.; Schron, C. M.; Seifter, J., et al. (1985):

Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border.

II. Evidence for Cl/HCO_3^- exchange and mechanism of coupling.

Am J Physiol 249(2 Pt 1). S. G236-45.

Krützfeldt, T. (2002):

Die Auswirkungen luminaler Ammoniakkonzentrationen auf den Natriumtransport am Psalter von Schafen in Abhängigkeit von der Fütterung.

Berlin, Freie Universität. 69 S.

L

Low, P. S. (1986):

Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions.

Biochim Biophys Acta 864(2). S. 145-67.

Lubis, D.; O'Shea, J. D. (1978):

Development of the omasum in sheep.

Acta Anat (Basel) 100(4). S. 400-10.

M

Mangold, E. (1950):

Die Verdauung bei Nutztieren.

Berlin: Akademie Verlag.

Martens, H. (1998):

Beziehungen zwischen Fütterung, Physiologie der Vormägen und der Pathogenese der Dislocatio abomasi.

In: Ätiologie, Pathogenese, Diagnostik, Prognose, Therapie und Prophylaxe der Dislocatio abomasi.

Leipzig, 14.Okt.1998. -

Proceeding Internationaler Workshop. S. 81 - 101.

Martens, H.; Blume, I. (1987):

Studies on the absorption of sodium and chloride from the rumen of sheep.

Comp Biochem Physiol A 86(4). S. 653-6.

Martens, H.; Gäbel, G. (1988):

Transport of Na and Cl across the Epithelium of Ruminant Forestomachs - Rumen and Omasum - a Review.

Comp Biochem Physiol A 90(4). S. 569-575.

Martens, H.; Gäbel, G.; Leonard, S. (1990):

Mechanisms of transport in the epithelium of the rumen of sheep.

Tierärztl Umschau 45. S. 805-813.

Martens, H.; Gäbel, G.; Strozyk, B. (1991):

Mechanism of electrically silent Na and Cl transport across the rumen epithelium of sheep.

Exp Physiol 76(1). S. 103-14.

- Martens, H.; Kasebieter, H. (1983):
Invitro Studies on the Influence of Sodium and Potassium-Ions on Magnesium Transport across the Isolated Rumen Mucosa of Sheep.
Zentralbl Veterinärmed A 30(1). S. 1-14.
- Martens, H.; Krützfeldt, T.; Wolf, K. (2004):
Sodium transport across the isolated epithelium of sheep omasum is influenced by luminal ammonia.
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 51(2). S. 46-51.
- Martens, H.; Rayssiguier, Y. (1980):
Magnesium metabolism and hypomagnesaemia.
In: Digestive physiology and metabolism in ruminants. / Ruckebus, Y, and P. Thivend (Hrsg.).
Lancaster, UK: MTP Press Ltd. - S. 447 - 466.
- McMurtrie, H. L.; Cleary, H. J.; Alvarez, B. V.; Loiselle, F. B., et al. (2004):
The bicarbonate transport metabolon.
J Enzyme Inhib Med Chem 19(3). S. 231-6.
- McSweeney, C. (1986):
An omaso-abomasal cannula used to assess efflux from the omasum of sheep.
Aust Vet J 63(10). S. 332-4.
- McSweeney, C. (1988):
A Comparative-Study of the Anatomy of the Omasum in Domesticated Ruminants.
Aust Vet J 65(7). S. 205-207.
- Mertz, D. P.; Schettler, G. (1959):
[Comparative clinical studies on new diuretics; experiences with hydrochlorothiazide].
Med Klin (Munich) 54(16). S. 782-4.
- Müller, F.; Aschenbach, J. R.; Gäbel, G. (2000):
Role of Na⁺/H⁺ exchange and HCO₃⁻ transport in pH_i recovery from intracellular acid load in cultured epithelial cells of sheep rumen.
J Comp Physiol [B] 170(4). S. 337-43.
- Murray, M. G.; Reid, R. S.; Sutherland, T. M. (1962):
The rate of passage of digesta from the reticulo-rumen of the sheep.
J. Physiol. Soc. 164(Proceedings). S. 26.
- N**
- Nickel, R.; Schummer, A.; Seiferle, E. (1999):
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere - Band II: Eingeweide. - 8., vollst. neubearb. Aufl.
Berlin ; Hamburg: Parey. - ISBN: 3-8263-3179-6.
- Niebuhr, V. (2003):
In vitro Untersuchungen zum Bikarbonattransport des Blättermagenepithels von Schafen.
Berlin, Freien Universität. Inaugural – Dissertation. 102 S.

O

Oyaert, W.; Bouckaert, J. H. (1961):
A study of passage of fluid through the sheep's omasum.
Res. vet. Sci. 2. S. 41 - 52.

P

Pfeffer, E.; Bertzbach, J.; Lenkeit, W. (1966):
Untersuchungen über das Verhalten der mineralischen Mengenelemente im Verdauungskanal
von Schafen bei Zufütterung von NaCl oder KCl.
Z Tierphysiol Tierernähr Futtermittelkd 22. S. 115-124.

Pfeffer, E.; Thompson, A.; Armstrong, D. (1970):
Studies on Intestinal Digestion in Sheep.
3. Net Movement of Certain Inorganic Elements in Digestive Tract on Rations Containing
Different Proportions of Hay and Rolled Barley.
Br J Nutr 24(1). S. 197-&.

Popov, M.; Tam, L. Y.; Li, J.; Reithmeier, R. A. (1997):
Mapping the ends of transmembrane segments in a polytopic membrane protein. Scanning N-
glycosylation mutagenesis of extraZytosolic loops in the anion exchanger, band 3.
J Biol Chem 272(29). S. 18325-32.

Poppi, D. P.; Norton, W. (1980):
The validity of the critical size theory for particles leaving the rumen.
J. Agric. Sci. Camb. 94. S. 275 - 280.

R

Rajendran, V. M.; Black, J.; Ardito, T. A.; Sangan, P., et al. (2000):
Regulation of DRA and AE1 in rat colon by dietary Na depletion.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279(5). S. G931-42.

Reithmeier, R. A. (2001):
A membrane metabolon linking carbonic anhydrase with chloride/bicarbonate anion
exchangers.
Blood Cells Mol Dis 27(1). S. 85-9.

Romero, M. F.; Fulton, C. M.; Boron, W. F. (2004):
The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters.
Pflügers Arch 447(5). S. 495-509.

S

Schröder, B.; Vössing, S.; Breves, G. (1999):
In vitro studies on active calcium absorption from ovine rumen.
J Comp Physiol B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology 169(7).
S. 487-494

- Schultheiss, G. (1995):
Calcium-sensitiver,elektrogener Natriumtransport des Psalterepithels von Schafen.
Berlin, Freie Universität. 149 S.
- Schultheiss, G.; Martens, H. (1999):
Ca-sensitive Na transport in sheep omasum.
Am J Physiol 276(6 Pt 1). S. G1331-44.
- Scott, A. u. G., I.C. (1971):
The surface of the ovine omasum as seen with the scanning electron microscope.
Z.Morph.Tiere 70. S. 229-237.
- Sehested, J.; Diernaes, L.; Moller, P. D.; Skadhauge, E. (1999):
Ruminal transport and metabolism of short-chain fatty acids (SCFA) in vitro: effect of SCFA
chain length and pH.
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 123(4). S. 359-68.
- Sellin, J. H.; Desoignie, R. (1989):
Regulation of bicarbonate transport in rabbit ileum: pH stat studies.
Am J Physiol 257(4 Pt 1). S. G607-15.
- Siciliano-Jones, J.; Murphy, M. R. (1989):
Production of volatile fatty acids in the rumen and cecum-colon of steers as affected by
forage:concentrate and forage physical form.
J Dairy Sci 72(2). S. 485-92.
- Sklan, D.; Hurwitz, S. (1985):
Movement and absorption of major minerals and water in ovine gastrointestinal tract.
J Dairy Sci 68(7). S. 1659-66.
- Smith, R. H. (1984):
Microbial Activity in the Omasum.
Proc Nutr Soc 43(1). S. 63-68.
- Soleimani, M.; Greeley, T.; Petrovic, S.; Wang, Z., et al. (2001):
Pendrin: an apical Cl⁻/OH⁻/HCO₃⁻ exchanger in the kidney cortex.
Am J Physiol Renal Physiol 280(2). S. F356-64.
- Sterling, D.; Casey, J. R. (2002):
Bicarbonate transport proteins.
Biochem Cell Biol 80(5). S. 483-97.
- Sterling, D.; Reithmeier, R. A.; Casey, J. R. (2001):
A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and
chloride/bicarbonate exchangers.
J Biol Chem 276(51). S. 47886-94.
- Stevens, C. E. (1964):
Transport of Sodium and Chloride by the Isolated Rumen Epithelium.
Am J Physiol 206. S. 1099-105.

Stokes, J. B. (1988):
Passive NaCl transport in the flounder urinary bladder: predominance of a cellular pathway.
Am J Physiol 255(2 Pt 2). S. F229-36.

T

Tiling, C. (1997):
In vitro Untersuchungen zum Cloridtransport des Blättermagenepithels von Schafen.
Berlin, Freie Universität. Inaugural-Dissertation. 134 S.

Tomas, F. M.; Potter, B. J. (1976):
The site of magnesium absorption from the ruminant stomach.
Br J Nutr 36(1). S. 37-45.

Towne, G.; Nagaraja, T. G. (1990):
Omasal ciliated protozoa in cattle, bison, and sheep.
Appl Environ Microbiol 56(2). S. 409-12.

Trautmann, A. F., Jos. (1949):
Lehrbuch der Histologie und vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haustiere.
Paul Parey Verlag in Berlin.

Tsuganezawa, H.; Kobayashi, K.; Iyori, M.; Araki, T., et al. (2001):
A new member of the HCO₃⁻ transporter superfamily is an apical anion exchanger of beta-intercalated cells in the kidney.
J Biol Chem 276(11). S. 8180-9.

U

Ussing, H. H. (1949):
Transport of ions across cellular membranes.
Physiol Rev 29(2). S. 127-55.

Ussing, H. H.; Zerahn, K. (1951):
Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.
Acta Physiol Scand 23(2-3). S. 110-27.

V

Van Soest, P. J. (1994):
Function of the ruminant forestomach.
In: *Nutritional ecology of the ruminant.* / (Hrsg.).
Ithaca und London: Cornell University Press. - S. 230 - 252.

Vidyasagar, S.; Barmeyer, C.; Geibel, J.; Binder, H. J., et al. (2005):
Role of short-chain fatty acids in colonic HCO₃ secretion.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 288(6). S. G1217-1226.

Vince, J. W.; Carlsson, U.; Reithmeier, R. A. (2000):
Localization of the Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger binding site to the amino-terminal region of carbonic anhydrase II.
Biochemistry 39(44). S. 13344-9.

Vince, J. W.; Reithmeier, R. A. (1998):
Carbonic anhydrase II binds to the carboxyl terminus of human band 3, the erythrocyte Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger.
J Biol Chem 273(43). S. 28430-7.

Vince, J. W.; Reithmeier, R. A. (2000):
Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the Cl⁽⁻⁾/HCO₃⁽⁻⁾ anion exchanger AE1.
Biochemistry 39(18). S. 5527-33.

W

Weekes, T. E. (1974):
The in vitro metabolism of propionate and glucose by the rumen epithelium.
Comp Biochem Physiol B 49(3). S. 393-406.

Wegeler, C. (2008):
Transport von HCO₃⁻ am isolierten Psalterepithel des Schafes (Charakterisierung und Einfluss der Fütterung).
Berlin, Freie Universität Berlin.

Weigand, E.; Young, J. W.; McGilliard, A. D. (1975):
Volatile fatty acid metabolism by rumen mucosa from cattle fed hay or grain.
J Dairy Sci 58(9). S. 1294-300.

Weston, R. H.; Cattle, J. A. (1984):
The movement of undigested plant particle fractions through the stomach of roughage-fed young sheep.
Can. J. Anim. Sci. 64((Suppl.)). S. 322-323.

Winterhager, J. M.; Stewart, C. P.; Heintze, K.; Petersen, K. U. (1986):
Electroneutral secretion of bicarbonate by guinea pig gallbladder epithelium.
Am J Physiol 250(4 Pt 1). S. C617-28.

Wright, E. (1955):
Site of phosphorus absorption of the sheep.
Nature 176(4477). S. 351-2.

Y

Yamamoto, Y.; Kitamura, N.; Yamada, J.; Andren, A., et al. (1994):
Morphological study of the surface structure of the omasal laminae in cattle, sheep and goats.
Anat Histol Embryol 23(2). S. 166-76.

- Yamamoto, Y.; Kitamura, N.; Yamada, J.; Yamashita, T. (1991a):
Scanning electron microscopy of vascular architecture in the mucosa of sheep omasal laminae.
J Vet Med Sci 53(5). S. 833-8.
- Yamamoto, Y.; Kitamura, N.; Yamada, J.; Yamashita, T. (1991b):
Muscular architecture in the omasal laminae of cattle and sheep.
Vet Res Commun 15(4). S. 249-56.
- Yang, M. G.; Thomas, J. W. (1965):
Absorption and secretion of some organic and inorganic constituents and the distribution of these constituents throughout the alimentary tract of young calves.
J Nutr 87(4). S. 444-58.

8. ANHANG

Gase

10 % CO₂90 % O₂

Standard-Pufferlösungen

Substanzen	mukosaler Kontrollpuffer in mmol·l ⁻¹
Natriumchlorid (NaCl)	15,2
Na-Glukonat (C ₆ H ₁₁ O ₇ Na)	74,6
Natrium Bikarbonat (NaHCO ₃)	50
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0,4
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O)	2,4
Kaliumchlorid (KCl)	5
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	5
Calciumchlorid (CaCl ₂ ·2 H ₂ O)	1,2
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ ·6 H ₂ O)	1,2

Substanzen	serosaler Kontrollpuffer in mmol·l ⁻¹
Natriumchlorid (NaCl)	90,2
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄)	27,4
Kaliumchlorid (KCl)	5
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	5
Calciumchlorid (CaCl ₂ ·2 H ₂ O)	1,2
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ ·6 H ₂ O)	1,2

Natriumreduktion

Substanz	Puffer (A) Na = 100 mmol·l ⁻¹	Puffer (B) Na = 80 mmol·l ⁻¹
Natriumchlorid (NaCl)	15,2	15,2
Na-Glukonat (C ₆ H ₁₁ O ₇ Na)	29,6	9,6
Natrium Bikarbonat (NaHCO ₃)	50	50
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0,4	0,4
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O)	2,4	2,4
Kaliumchlorid (KCl)	5	5
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	5	5
Calciumchlorid (CaCl ₂ ·2 H ₂ O)	1,2	1,2
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ ·6 H ₂ O)	1,2	1,2
Kaliumbikarbonat (KHCO ₃)	0	0
Kaliumgluconat (C ₆ H ₁₁ KO ₇)	45	65

Anhang

Substanzen	Puffer (C) Na = 65 mmol·l ⁻¹	Puffer (D) Na = 57 mmol·l ⁻¹
Natriumchlorid (NaCl)	15,2	15,2
Na-Glukonat (C ₆ H ₁₁ O ₇ Na)	0	0
Natrium Bikarbonat (NaHCO ₃)	44,6	36,6
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0,4	0,4
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O)	2,4	2,4
Kaliumchlorid (KCl)	5	5
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	5	5
Calciumchlorid (CaCl ₂ ·2 H ₂ O)	1,2	1,2
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ ·6 H ₂ O)	1,2	1,2
Kaliumbikarbonat (KHCO ₃)	5,4	13,4
Kaliumgluconat (C ₆ H ₁₁ KO ₇)	74,6	74,6

Substanzen	Puffer (E) Na = 50 mmol·l ⁻¹	Puffer (F) Na = 30 mmol·l ⁻¹
Natriumchlorid (NaCl)	15,2	15,2
Na-Glukonat (C ₆ H ₁₁ O ₇ Na)	0	0
Natrium Bikarbonat (NaHCO ₃)	29,6	9,6
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0,4	0,4
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O)	2,4	2,4
Kaliumchlorid (KCl)	5	5
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	5	5
Calciumchlorid (CaCl ₂ ·2 H ₂ O)	1,2	1,2
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ ·6 H ₂ O)	1,2	1,2
Kaliumbikarbonat (KHCO ₃)	20,4	40,4
Kaliumgluconat (C ₆ H ₁₁ KO ₇)	74,6	74,6

Substanzen	Puffer (G) Na = 20 mmol·l ⁻¹	Puffer (H) Na = 5,2 mmol·l ⁻¹
Natriumchlorid (NaCl)	14,8	0
Na-Glukonat (C ₆ H ₁₁ O ₇ Na)	0	0
Natrium Bikarbonat (NaHCO ₃)	0	0
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0,4	0,4
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O)	2,4	2,4
Kaliumchlorid (KCl)	5,4	20,2
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	5	5
Calciumchlorid (CaCl ₂ ·2 H ₂ O)	1,2	1,2
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ ·6 H ₂ O)	1,2	1,2
Kaliumbikarbonat (KHCO ₃)	50	50
Kaliumgluconat (C ₆ H ₁₁ KO ₇)	74,6	74,6

Fettsäuren

Substanz	Puffer Acetat = 25 mmol·l ⁻¹	Puffer Butyrat = 25 mmol·l ⁻¹
Natriumchlorid (NaCl)	15,2	15,2
Na-Glukonat (C ₆ H ₁₁ O ₇ Na)	49,5	49,5
Natrium Bikarbonat (NaHCO ₃)	50	50
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0,4	0,4
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O)	2,4	2,4
Kaliumchlorid (KCl)	5	5
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	5	5
Calciumchlorid (CaCl ₂ ·2 H ₂ O)	1,2	1,2
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ ·6 H ₂ O)	1,2	1,2
Na-Acetat (C ₂ H ₃ NaO ₂ ·3 H ₂ O)	25,00	0
Na-Butyrat (C ₄ H ₇ NaO ₂ 3H ₂ O)	0	25

Substanzen	Puffer Acetat = 100mmol·l ⁻¹
Natriumchlorid (NaCl)	15,2
Na-Glukonat (C ₆ H ₁₁ O ₇ Na)	0
Natrium Bikarbonat (NaHCO ₃)	50
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0,4
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O)	2,4
Kaliumchlorid (KCl)	5
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	5
Calciumchlorid (CaCl ₂ ·2 H ₂ O)	1,2
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ ·6 H ₂ O)	1,2
Natriumbutytrat (C ₄ H ₇ NaO ₂ ·3 H ₂ O)	0
Essigsäure 100% (C ₂ H ₄ O ₂)	100
N Methyl di Glucamine (C ₇ H ₁₇ NO ₅)	500

Ausgleich des Chloridgradienten

Substanz	Mukosaler Puffer Cl = 100 mmol·l ⁻¹
Natriumchlorid (NaCl)	90,2
Na-Glukonat (C ₆ H ₁₁ O ₇ Na)	0
Natrium Bikarbonat (NaHCO ₃)	50
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	0,4
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O)	2,4
Kaliumchlorid (KCl)	5
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O)	5
Calciumchlorid (CaCl ₂ ·2 H ₂ O)	1,2
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ ·6 H ₂ O)	1,2

Danksagung

Ohne die es nicht möglich gewesen wäre

Prof. Dr. Holger Martens
Katharina Wolf
Anja Lüdecke

DANKE

ebenso an alle
die mich in unterschiedlichster Form bei dieser Arbeit unterstützt haben

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Maïke Beisele, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe. Ferner erkläre ich, dass die Arbeit bisher in keinem anderen Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt worden ist.