

1 EINLEITUNG UND LITERATUR

1.1 ALLGEMEINE EINLEITUNG

Es ist seit langem bekannt, daß sich die Struktur und Transportfunktion des Pansenepithels von Wiederkäuern in Abhängigkeit von der Fütterung verändern (Brownlee, 1956).

In der landwirtschaftlichen und veterinärmedizinischen Praxis wird diese empirische Erkenntnis in der Praxis des „Anfütterns“ (engl. „lead feeding“) umgesetzt (Dirksen et al., 1992). Dabei werden trächtige, trockenstehende Milchkühe vor der Kalbung von einer reinen Raufutterration auf eine gemischte Raufutter-/Krafftutterration umgestellt, um die Pansenadaptation an energiereiche Rationen zu stimulieren. In diesem Zusammenhang tritt ein Zielkonflikt auf, der von DIRKSEN et al. (1984) als „Dilemma der Hochleistungskuh“ bezeichnet wird (Dirksen et al., 1984). Eine hohe Energiedichte in der Ration, welche bei der Anfütterung eingesetzt wird, stellt zwar eine starke Stimulation der Pansenadaptation dar, führt jedoch andererseits unter Umständen zu einer Verfettung der Tiere, die für den Geburtsvorgang als ungünstig angesehen wird. Der Zusammenhang von Körperkondition und Komplikationen während der Geburt wird zwar kontrovers diskutiert, sollte aber nach bisherigem Verständnis bei der Rationsgestaltung *ante partum* nicht außer Acht gelassen werden (Dirksen et al., 1992).

Zusätzlich ist bekannt, daß eine unzureichende oder verzögerte Adaptation des Pansens, insbesondere bei Milchkühen in der frühen Phase der Laktation zu schwerwiegenden Erkrankungen führen kann. Hierbei handelt es sich vor allem um das gehäufte Auftreten von Endometritis, Mastitis, Laminitis, Pansenazidose, Ketose, Milchfieber (hypokalzämische Gebärparese), Lipomobilisationssyndrom und Verlagerung des Labmagens (Coppock, 1972; Berg et al., 1976; Correa et al., 1990; Dirksen et al., 1992; Owens et al., 1998). Diese Erkrankungen haben große wirtschaftliche Bedeutung und sind zusätzlich im Sinne des Tierschutzes von hoher Relevanz.

Es besteht Bedarf nach einer Rationsempfehlung zur Anfütterung von Milchkühen, welche die erfolgreiche, vor Krankheiten schützende Pansenadaptation auf der einen Seite und die optimale Körperkondition zum Geburtstermin auf der anderen Seite, vereinbart.

Erkenntnisse des morphologischen und funktionellen Anpassungsprozesses sind in zahlreichen Arbeiten publiziert worden.

Zwar kann der zeitliche Rahmen der morphologischen Adaptation inzwischen angegeben werden (Dirksen et al., 1984), jedoch ist bislang unbekannt, ob die funktionelle Adaptation des Pansenepithels zeitgleich mit der morphologischen Adaptation stattfindet. So ist es Ziel dieser Arbeit, den funktionellen Adaptationsprozess des Pansenepithels in Abhängigkeit von der Diät und der Zeit zu untersuchen.

Aufgrund methodischer Beschränkungen sind bis vor wenigen Jahren molekulare Untersuchungen des Adaptationsprozesses kaum möglich gewesen. Daher existieren nur wenige Arbeiten, die sich mit der Adaptation auf zellulärer Ebene auseinandersetzen (Lane et al., 2002). Es ist jedoch zum Beispiel bekannt, daß es zu Genregulationen im adaptierenden Epithel des Gastrointestinaltrakts von Modelltieren kommen kann (Hass et al., 1997; Erwin et al., 2000; Hodin, 2000; Johnson et al., 2000; Ljungmann et al., 2000; Jiang et al., 2001; Musch et al., 2001). Derartige Untersuchungen am Pansenepithel von Wiederkäuern liegen bisher jedoch nicht vor. Deshalb soll zunächst der qualitative Nachweis ausgewählter Transportproteine am Pansenepithel von Wiederkäuern erbracht werden.

Ferner soll auf zellulärer Ebene die Abhängigkeit des Adaptationsprozesses von hierfür auslösenden Faktoren in Abhängigkeit von der Zeit untersucht werden. Dieser Teil der Arbeit kann aufgrund der vielfältigen Möglichkeiten nur als Vorversuch verstanden werden, der erste Hinweise auf das Mitwirken von „Stimulationsfaktoren“ beim Adaptationsprozess liefert.

1.2 MORPHOLOGISCH-HISTOLOGISCHE ADAPTATION

1.2.1 Anatomisch-histologische Übersicht über den Aufbau des Pansens

1.2.1.1 Kurze Darstellung der anatomischen Verhältnisse

Der Wiederkäuer besitzt im Gegensatz zu den monogastrischen Säugetieren 3 Vormagenabteilungen, die an der Verdauung, Resorption und der Verstoffwechslung der aufgenommenen Futtermittelbestandteile beteiligt sind.

Der Pansen stellt hierbei die größte Vormagenabteilung dar und hat beim Rind ein Fassungsvermögen von etwa 80-100 Litern. Aufgrund seiner Größe vereinigt er 80 % des gesamten Inhalts des Magens auf sich und füllt vollständig die linke Bauchhöhlenhälfte aus. Er stellt einen seitlich abgeflachten Sack dar, der vom Zwerchfell bis zur Beckenhöhle reicht. Seine linke Seite (*facies parietalis*) liegt der linken Bauchwand und dem linken Teil des Zwerchfells eng an, während seine rechte Seite (*facies visceralis*) nur mit dem kaudoventralen Viertel die Medianebene überragt, hier nahe der rechten Bauchwand verläuft und so im Bereich des Beckens den ventralen Teil der Bauchhöhle rechtsseitig ausfüllt. Dorsal (*curvatura dorsalis*) ist der Pansen im kranialen Bereich mit dem linken Zwerchfellpfeiler und der linken Lendenmuskulatur bindegewebig verwachsen. Ventral (*curvatura ventralis*) liegt er in seiner gesamten Länge der ventralen Bauchwand an.

Während das kaudale Ende des Pansensackes durch eine horizontale Furche (*sulcus caudalis*) in einen dorsalen und einen ventralen Blindsack (*saccus caecus caudosorsalis et caudoventralis*) unterteilt wird, teilt der dorsal ansteigende *sulcus cranialis* das kraniale Ende des Pansensackes in einen dorsalen und einen ventralen Pansensack (*saccus ruminis dorsalis et ventralis*). Der kraniale Teil des dorsalen Pansensackes wird als Schleudermagen (*atrium ruminis*) bezeichnet.

Sulcus cranialis und *caudalis* sind seitlich über den *sulcus longitudinalis dexter* bzw. *sinister* miteinander verbunden.

Der *sulcus longitudinalis sinister* gibt den *sulcus accessorius sinister*, der *sulcus longitudinalis dexter* den *sulcus accessorius dexter* ab, wobei von Letztgenanntem die Panseninsel (*insula ruminis*) auf der *facies visceralis* flankiert wird.

Die kaudalen Blindsäcke sind durch Kranzfurchen (*sulcus coronarius dorsalis et ventralis*) vom eigentlichen Pansen abgesetzt.

Die genannten Einziehungen umgeben außen den Pansen ringförmig und entsprechen den sich nach innen wölbenden Pansenpfeilern (Koch et al., 1990).

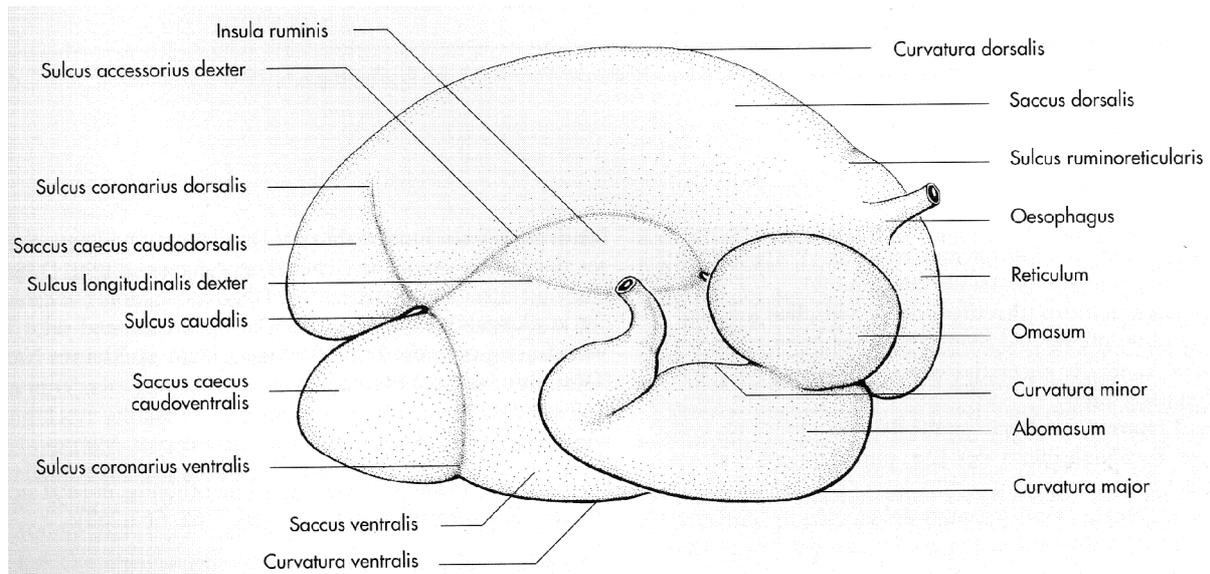


Abbildung 1 Graphische Darstellung des mehrhöhligen Magens des Rindes, Ansicht von rechts. Aus: O. Schaller, „Illustrated veterinary anatomical nomenclature“, Enke Verlag, 1992

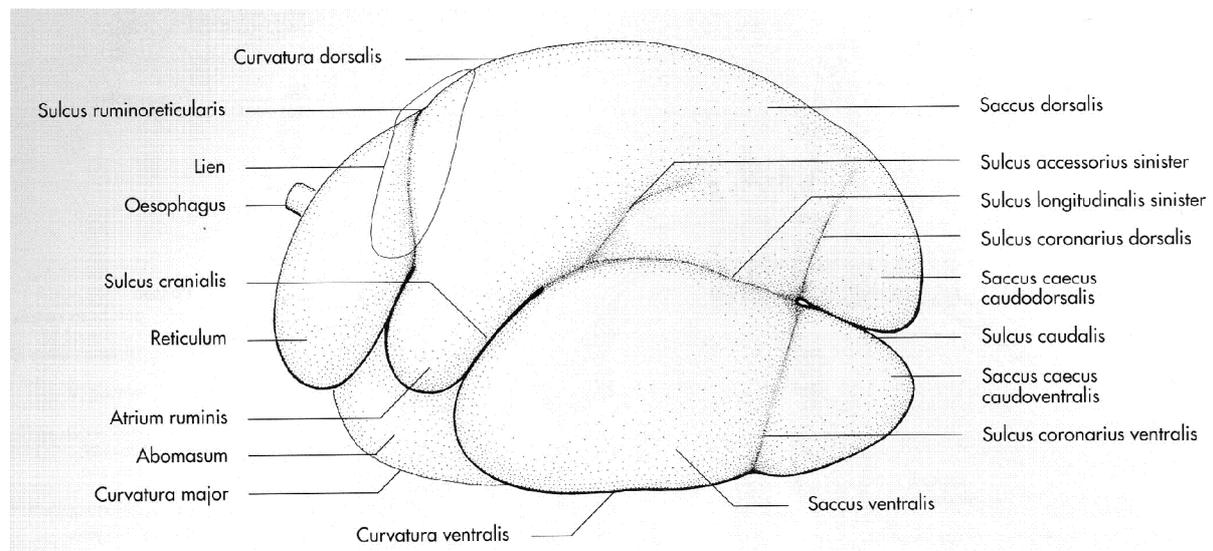


Abbildung 2 Graphische Darstellung des mehrhöhligen Magens des Rindes, Ansicht von links. Aus: O. Schaller, „Illustrated veterinary anatomical nomenclature“, Enke Verlag, 1992.

1.2.1.2 Tunica serosa

Die Außenfläche des Pansens wird fast überall von der *tunica serosa* überzogen. Nur im dorsalen Verwachsungsbereich handelt es sich um die *tunica adventitia*, die den Pansen in diesem Bereich überzieht (Mosimann, 1990).

1.2.1.3 Tunica muscularis

Die *tunica muscularis* besteht prinzipiell aus glatter Muskulatur. Es handelt sich um eine Besonderheit des Wiederkäuers, daß quergestreifte Muskulatur auf den Pansen ausstrahlt.

Es sind 2 deutlich getrennte Muskelschichten ausgebildet, von denen die äußere Schicht in kraniokaudaler Richtung verläuft, die Fasern der inneren Schicht verlaufen senkrecht hierzu. Die Pansenfeiler enthalten Muskelwülste glatter Muskulatur (Mosimann, 1990).

1.2.1.4 Tunica mucosa

Die *tunica mucosa* ist eine drüsenfreie, kutane Schleimhaut und weist aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen strukturelle Besonderheiten auf. Das für den Pansen typische Schleimhautrelief, die Pansenzotten (*papillae ruminis*), besteht im Wesentlichen aus lokalen Verdickungen der *lamina propria mucosae* (Mosimann, 1990).

Die Pansenzotten unterscheiden sich in Form (warzen-, zungen-, faden- und blattförmig), Länge (zwischen 3-13 mm lang und 1-3 mm breit), Verteilung und Dichte und vergrößern die Pansenoberfläche etwa um das Siebenfache. Die Anzahl und Größe der Zotten verringert sich prinzipiell nach ventral und dorsal. Die Zotten sind in diesen Bereichen jedoch stärker verhornt und ermöglichen hierdurch eine intensive Resorption bei einer gleichzeitig voll wirksamen Schutzfunktion gegenüber gröberen Futtermittelbestandteilen (Koch et al., 1990).

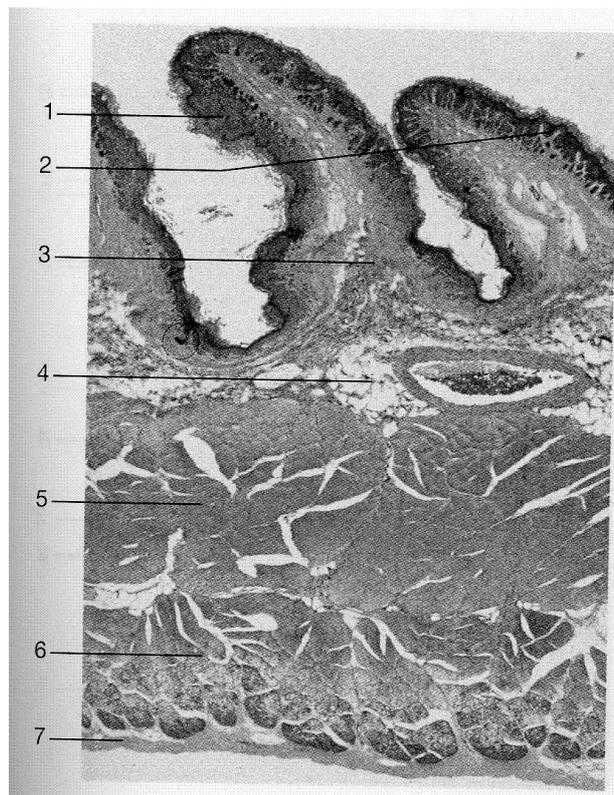


Abbildung 3 Graphische Darstellung des histologischen Aufbaus der Pansenwand. 1: mehrschichtig verhorntes Plattenepithel, 2: Papillarkörper, 3: gefäßreiches Bindegewebsstroma, 4: Tela submucosa, 5: zirkuläre Innenschicht der Pansenmuskulatur, 6: longitudinale Außenschicht der Pansenmuskulatur, 7: Tunica serosa. Aus: K. D. Weyrauch / A. Smollich / B. Schnorr, „Histologie-Kurs für Veterinärmediziner“, 1998, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

1.2.1.4.1 Lamina epithelialis mucosae

1.2.1.4.1.1 Stratum basale und stratum spinosum

In den tiefen Schichten der *lamina epithelialis mucosae*, dem *stratum basale* und dem *stratum spinosum* zeigt das Pansenepithel die übliche Struktur des geschichteten Plattenepithels (Mosimann, 1990).

1.2.1.4.1.2 Stratum granulosum

Im darauf folgenden *stratum granulosum* lassen sich elektronenmikroskopisch 2 Arten von Epithelzellen unterscheiden, die tiefer liegenden „normal“ abgeflachten Zellen (Typ A) und die höher liegenden aufgequollenen Zellen (Typ B) (Mosimann, 1990).

1.2.1.4.1.3 Stratum corneum

Im *stratum corneum* zeigen nur die basal gelegenen Hornzellen eine dichte Struktur (Typ A), während die darüber folgenden Schichten mittelgradig (Typ B) bis hochgradig (Typ C) aufgequollen sind. Am Übergang vom *stratum granulosum* zum *stratum corneum* sind die vorhandenen Interzellularspalten enger als in den übrigen Zonen und ferner durch *zonulae occludentes* verschlossen (Baldwin, 1998). Dieses Zellgefüge dient als Schranke gegenüber großmolekularen Stoffen (Mosimann, 1990; Graham et al., 2005).

1.2.1.4.2 Lamina muscularis mucosae

Eine *lamina muscularis mucosae* existiert im Bereich des Pansens nicht. Subpapillär gibt es jedoch eine dichte, aus kollagenen und elastischen Fasern bestehende Schicht, die als *stratum subpapillare fibrosum* bezeichnet wird. In ihr kommen vereinzelt glatte Muskelzellen vor (Oppel, 1896; Würfel, 1908; Ellenberger, 1911).

Unmittelbar subepithelial ist ein dichtes Netz von Blutkapillaren und Venulen ausgebildet, die die transepithelial aufgenommenen Stoffe abtransportieren (Mosimann, 1990).

1.2.1.4.3 Lamina propria

Die *lamina propria mucosae* bildet den Papillarkörper und besteht aus kollagenen Fibrillen und feinfaserigen elastischen Netzen, in deren Maschen neben Fibroblasten und Leukozyten (Steven, 1970) vereinzelt Mastzellen und Plasmazellen vorkommen. Ferner verlaufen in der Propria Blut- und Lymphgefäße sowie marklose Nervenfasern.

1.2.2 Mikrobielle Stoffwechselprozesse im Pansen (schematische Darstellung)

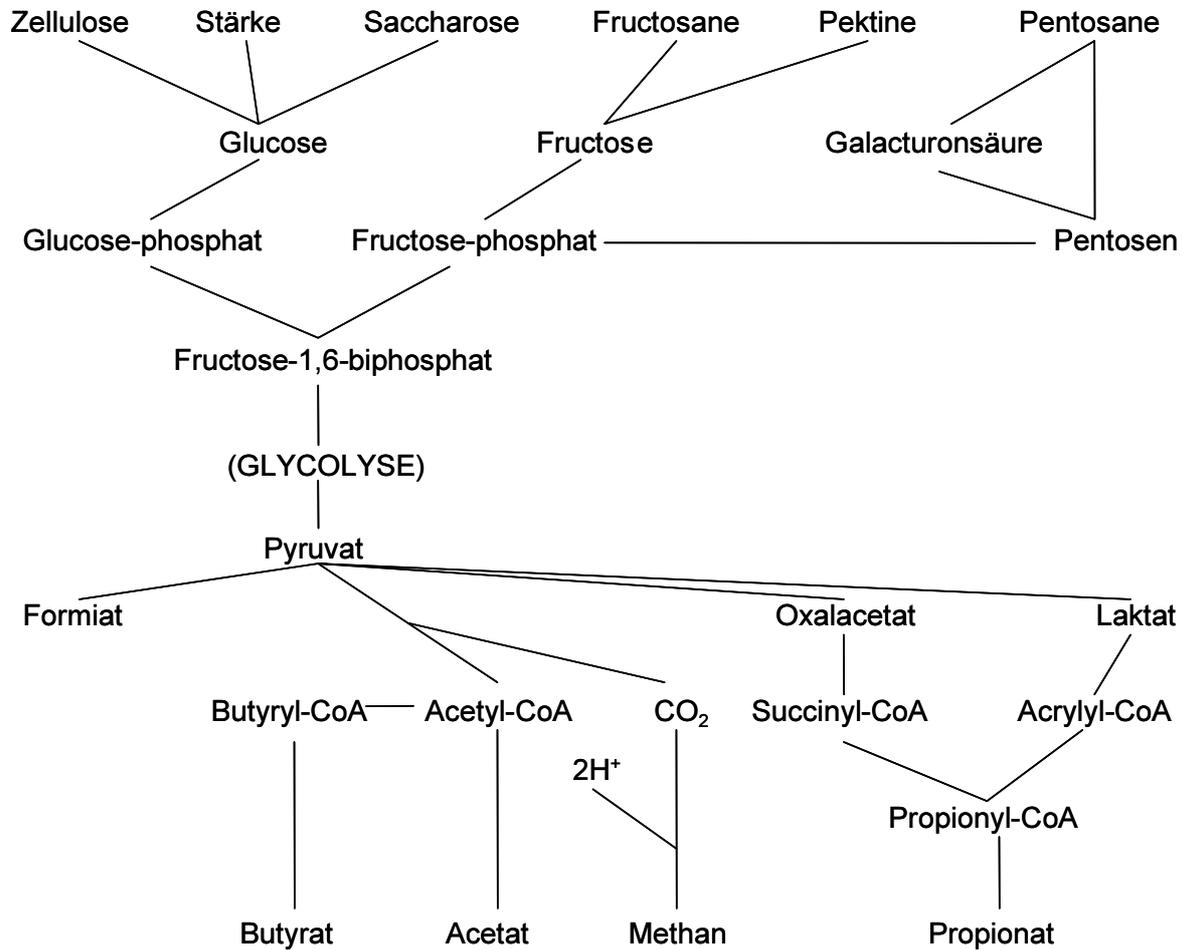


Abbildung 4 Schematische Darstellung der mikrobiellen Stoffwechselprozesse im Pansen.

Durch die Aktivität anaerober Mikroorganismen im Pansen fallen hier unter anderem Wasser, Methan (CH₄), Kohlendioxid (CO₂), Milchsäure (Laktat), Harnstoff, Vitamin B und K, Essigsäure (Acetat), Propionsäure (Propionat) und Buttersäure (Butyrat) als Stoffwechselprodukte an.

Acetat (etwa 60% der im Pansen anfallenden Fettsäuren) greift über das CoEnzym-A in den Fettstoffwechsel ein, während Propionat (etwa 25 % der intraruminalen Fettsäuren) in der Leber zur Synthese von Glucose (Gluconeogenese) verwendet wird. Butyrat wird bereits im Epithel zu β-Hydroxybutyrat transformiert und anschließend intrahepatisch zu Ketonkörpern verstoffwechselt. CO₂ und Wasser (H₂O) werden intrazellulär durch die enzymatische Aktivität der Carboanhydrase (CAH) zu Hydrogencarbonat (HCO₃⁻) und Wasserstoff (H⁺) verstoffwechselt und sind somit an der intrazellulären sowie intraruminalen pH-Homöostase beteiligt (Engelhardt et al., 2000).

1.2.3 Allgemeine Einführung in die Adaptationsprozesse der inneren ruminalen Oberfläche

Es ist schon lange bekannt, daß die Pansenschleimhaut kein ausdifferenziertes Gewebe darstellt, sondern exogenen, insbesondere fütterungsbedingten und endogenen Proliferations- und Regressionsvorgängen unterliegt (Kauffold, 1971; Dirksen et al., 1984). Die Adaptationsvorgänge der ruminalen Oberfläche beeinflussen die Nährstoffresorption und regulieren sowie stabilisieren den pH-Wert des Panseninhalts (Brownlee, 1956; Sander, 1959).

Generell lassen sich 4 nahrungsbedingte Ursachen definieren, die zu Veränderungen des Schleimhautreliefs führen können:

- physiologische Veränderungen bei der Umstellung von Milch auf pflanzliche Nahrung (siehe 1.2.4)
- zyklisch-jahreszeitliche Veränderungen von ganzjährig im Freiland lebenden Hauswiederkäuern
- Schleimhautveränderungen bei relativ artgemäßer Fütterung aber unterschiedlichem Energiebedarf
- Schleimhautveränderungen aufgrund verschiedener Fütterungen, die den Übergang zu pathologischen Prozessen und damit die Grenzen der Anpassungsfähigkeit markieren (Koch et al., 1990)

Im Folgenden sollen primär die Veränderungen des Pansenepithels hinsichtlich verschiedener Fütterungsregime erläutert werden, um Lösungsansätze des Zielkonfliktes hinsichtlich des peripartalen Ernährungsstatus des Milchrindes darzustellen.

Das Ausmaß der morphologischen Veränderungen wird durch die jeweilige Fütterung bzw. durch die bestehende Konzentration an Buttersäure und Propionsäure in der Hauben-Pansenflüssigkeit bestimmt. Diese beiden Fettsäuren stellen die eigentlichen Wachstumsstimulatoren dar, von deren proliferativen Auswirkungen maßgeblich die Resorptionskapazität der Vormagenmucosa für energieliefernde, kurzkettige Fettsäuren abhängt.

Die Resorptionskapazität der Pansenschleimhaut ihrerseits beeinflusst wiederum die Energieversorgung der Tiere sowie die intraruminale pH-Regulation. Diese beiden Eigenschaften nehmen starken Einfluss auf den peripartalen Gesundheitsstatus des Milchrindes und sollten so beeinflusst werden, daß das „Dilemma der Hochleistungskuh“ (siehe 1.1) optimalerweise umgangen werden kann (Dirksen et al., 1992).

1.2.4 Fütterungsabhängige Entwicklung des Vormagensystems beim neugeborenen Kalb

Zum Zeitpunkt der Geburt eines Kalbes entfällt etwa die Hälfte der Masse der Magenabteilungen auf den Labmagen. Nur etwa 30 % entfallen auf den Pansen, gut 10 % auf den Psalter und knapp 10 % auf die Haube. Das Schleimhautrelief der einzelnen Vormagenabteilungen ist beim Neugeborenen kaum entwickelt (Engelhardt et al., 2000).

Im Laufe der Entwicklung wächst der Vormagen deutlich stärker als der Labmagen, wobei Ausmaß und Geschwindigkeit des Wachstums durch die Fütterung beeinflusst werden können. Schon 1956 stellte BROWNLEE fest, daß Kälber, die bereits kurze Zeit nach der Geburt von einer reinen Milchratio auf eine gemischte Milch-/Raufutterration bzw. Milch-/Krafftutterration umgestellt werden, eine deutlich schnellere Entwicklung der Pansenzotten zeigen. Hierfür scheint nicht der Rohfaseranteil sondern der Energiegehalt des Futtermittels verantwortlich zu sein (Brownlee, 1956).

ZITNAN et al. (1999) zeigten, daß nicht zwingend die Anzahl der Papillen pro cm² ansteigt, sondern die Papillenoberfläche, -länge und -breite bei einem auf milchfreie Nahrung umgestellten Tier zunimmt (Zitnan et al., 1999).

Ausschlaggebend für die strukturelle und funktionelle Entwicklung des Pansens bei jungen Wiederkäuern, die erst nach Beginn der Pansenfermentation einsetzt, ist die Stimulation durch flüchtige Fettsäuren (Kauffold et al., 1975).

Nicht nur chemische Reize durch Gärprodukte, wie z.B. Buttersäure, die vor allem auf die Entwicklung der Schleimhautstruktur Einfluss nehmen, sondern auch mechanische Reize, die etwa vom Raufutter ausgehen und primär das Größenwachstum und die Entwicklung der Muskulatur anregen, sind an der Entwicklung der Vormagenabteilungen beteiligt (Tamate et al., 1962). Dieses konnten auch NOCEK et al. (1980) in einem Versuch nachweisen, bei dem heugefütterte Bullenkälber eine erheblich stärker ausgebildete Muskulatur aufweisen, als Kälber, die mit Konzentrat gefüttert werden (Nocek et al., 1980).

1.2.5 Morphologisch-anatomische Adaptation des Pansenepithels

In der Regel besitzen Pansenzotten eine zungenförmige Gestalt, die adaptativen Veränderungen unterworfen ist. Am deutlichsten ausgeprägt sind die Veränderungen von Form und Größe im Bereich des Pansendaches.

Die Papillen im Bereich des *atrium ruminis* sind nahezu filiform, wohingegen die Papillen der Pfeilernischen breit und blattförmig erscheinen. Die Seitenwände des Pansensackes stellen eine Übergangszone dar.

Das *atrium ruminis* ist die Hauptresorptionszone des Pansens und zeigt neben den Pfeilernischen auch am Boden der Blindsäcke einen auffallend dichten Zottenbesatz (Hofmann et al., 1982).

Bereits KAUFFOLD et al. konnten 1977 nachweisen, daß eine hohe Konzentration an Essig-, Propion- und Buttersäure für die morphologischen Adaptationsvorgänge ausschlaggebend ist (Kauffold et al., 1977a; Kauffold et al., 1977b).

Kurzkettige Fettsäuren entstehen intraruminal aus dem mikrobiellen Abbau kohlenhydrathaltiger Nährstoffe des Futtermittels (siehe 1.2.2) sowie durch den intraepithelialen Metabolismus. Nach Applikation von Buttersäure und Propionsäure zeigen sich die proliferativen Effekte jedoch wesentlich deutlicher als Effekte nach Applikation von Acetat, Natriumchlorid oder Glucose (Sander, 1959).

Während die Pansenzotten nach der Infusion von Essigsäure erheblich schmaler werden, zeigen Zotten nach einer Infusion von Propionsäure und Buttersäure eine deutliche Dickenzunahme (Kauffold et al., 1977a; Kauffold et al., 1977b; Galfi et al., 1983).

Diese Beobachtungen konnten ebenso bei Tieren gemacht werden, die mehrere Wochen einer energiereichen Diät unterzogen wurden. Pansenzotten von Tieren unter energiereicher Fütterung zeigen ebenfalls ein deutliches Dicken- und Längenwachstum sowie eine bemerkenswerte Oberflächenvergrößerung (Dirksen et al., 1984; Gäbel et al., 1987; Shen et al., 2004b).

Dieser Vorgang ist nach Umstellung auf energiearme Rationen als reversibel zu bezeichnen (Dirksen et al., 1984; Gäbel et al., 1987).

Entsprechend der Untersuchungen von LIEBICH et al. (1990) und BERG et al. (1976) zeigen Tiere nach einer mehrwöchigen Fütterung mit energiereichem Futtermittel einen dichten, geschlossenen Wandbesatz vorwiegend zungenförmiger Zotten. Die Zottenränder erscheinen hierbei nahezu glatt. Bei energiearmer Fütterung, wie zum Beispiel während der Trockenstehperiode, verkürzen sich die Zotten, werden zunehmend lanzett- und fingerförmig und das Zottenmuster wird auffallend heterogen. Im weiteren Verlauf der Trockenstehperiode treten zunehmend Längs- und Querfalten an den Zottenrändern auf und es kommt zur Ausbildung gezahnter Ränder. Nach Abschluss der Rückbildung sind zum Teil nur noch rudimentäre Zottenstümpfe erkennbar. Jedoch kann stellenweise die Proliferation neuer Pansenzotten aus Zottenstümpfen beobachtet werden. Dieses Phänomen tritt nach allmählicher Zufütterung energiereicher Rationen in erhöhtem Maße auf. Auffällig hierbei ist die regelmäßige Form der Zotten und der hohe Dichtegrad des Zottenbesatzes (Berg et al., 1976; Liebich et al., 1990).

Eine Zunahme der Durchblutung in Abhängigkeit von der Konzentration an Fettsäuren konnte DOBSON im Jahre 1955 beobachten (Dobson, 1955).

GALFI et al. untersuchten 1991 die Effekte kurzkettiger Fettsäuren *in vitro* und machten hierbei gegensätzliche Erfahrungen als bisher aus *in vivo*-Versuchen bekannt war. Sie stellten fest, daß die Mitoserate von REC (permanente Zellkultur) nach Inkubation mit kurzkettigen Fettsäuren gehemmt wird. Hierbei zeigt Butyrat einen stärkeren inhibitorischen Effekt als Propionat und Acetat auf das Teilungsverhalten der Zellen. Dieselben Effekte konnten hinsichtlich der DNA-Synthese beobachtet werden. Mit steigender Anzahl an C-Atomen der Fettsäuren wird die DNA-Synthese zunehmend eingeschränkt (Galfi et al., 1991).

Es sollte Beachtung finden, daß DOREAU et al. (1997) feststellen konnten, daß nach einer erhöhten Zufuhr kurzkettiger Fettsäuren die beobachteten proliferativen Effekte nicht ausschließlich auf Hypertrophie, sondern auch auf Hyperplasie der *tunica mucosa* und *muscularis* beruhen (Doreau et al., 1997a).

Die deutliche Zunahme der Keratinisierung des Pansenepithels nach Verabreichung von Fettsäuren ist als erster Hinweis einer Para- bzw. Hyperkeratose zu verstehen und zeigt die Grenzen der Adaptationsfähigkeit des Pansenepithels auf (Kauffold et al., 1977a; Kauffold et al., 1977b; Galfi et al., 1983).

1.2.6 Histologische Adaptation des Pansenepithels

Die *tunica mucosa* ist hinsichtlich der Adaptationsvorgänge unter fütterungsbedingten Einflüssen von besonderer Bedeutung.

Die Dicke des *stratum germinativum*, die Größe der Zellkerne im *stratum basale*, die Art und Dicke des *stratum corneum* sowie die Erscheinung der *lamina propria* und viele andere Eigenschaften sind ernährungsbedingt veränderliche Merkmale der Pansenschleimhaut mit funktioneller Bedeutung (Kauffold et al., 1975).

KAUFFOLD et al. beschreiben in ihrem Versuch 1975 präzise die histologischen Veränderungen der Schleimhautzustände anhand folgender Merkmale: Oberflächenstruktur der Pansenschleimhaut, Anzahl an Zelllagen des *stratum corneum*, Struktur der einzelnen Gewebeschichten, Zellmorphologie der *stratum corneum*-Zellen, Sauerstoffaustausch der einzelnen Zelle sowie Zellkerngröße (Kauffold et al., 1975).

Tiere, die 3 Wochen Trockengrünfütter (hoher Rohfaser- und Trockensubstanzgehalt, niedrige Energiedichte) erhalten, zeigen nur schwache Oberflächenstrukturen der Pansenschleimhaut sowie ein gleichförmig „kompaktes“ *stratum corneum*, das sich aus „plättchenförmigen“ Hornzellen zusammensetzt.

Neben geringgradigen Quellungserscheinungen des *stratum transitionale (granulosum)* fällt eine Anhäufung von *stratum spinosum*-Zellen auf, die zur Zapfenbildung des *stratum germinativum (stratum spinosum et stratum basale)* nach innen beiträgt. Die *lamina propria* wirkt aufgelockert.

Hingegen zeigen Tiere, die 3 Wochen mit Konzentrat (niedriger Rohfaser- und Trockensubstanzgehalt, hohe energetische Futtereinheiten) gefüttert werden, eine Oberfläche mit warzenartigen Erhebungen, die vor allem durch Epithelproliferationen entstanden sind. Neben dem leicht aufgelockerten „kompakten“ *stratum corneum* aus plättchenförmigen Zellen, treten vermehrt kleinlumige Hornzellen mit diskusförmiger Gestalt auf. Ferner zeigt das *stratum germinativum* geringgradige Quellungserscheinungen sowie die Tendenz, mehrschichtig nach außen zu proliferieren (die vorhandene Menge des Gewebes dient als Ausdruck der Stoffwechselaktivität des Gewebes), sowie nach innen Zapfen auszubilden. Die *lamina propria* zeigt hier keine Veränderungen (Kauffold et al., 1975).

Tiere, die Frischfutter oder Silage erhalten, zeigen eine starke Auflockerung des *stratum corneum* und vergleichsweise dünne Epithelien sowie kleine Zellkerne und eine niedrige Sauerstoffaufnahme. Demgegenüber werden nach Fütterung von Trockengrünfutter und Futtermitteln mit niedrigem Konzentratgehalt vergleichsweise große Zellkerne und ein hoher Sauerstoffaustausch beobachtet. Die Epitheldicke zeigt einen nahezu identischen Wert (Kauffold et al., 1975).

Tiere, die Futtermittel mit hohem Konzentratgehalt erhalten, deren intraruminale Fettsäurekonzentration hierdurch erhöht wird, zeigen zwar nur geringe qualitative Unterschiede, jedoch auffällige quantitative Unterschiede. Die Erhöhung des Energiegehaltes auf nahezu das Doppelte des Erhaltungsbedarfs führt sowohl zur Vergrößerung der Zellkerne als auch zur Zunahme der Epitheldicke und der Sauerstoffaufnahme, so daß unter diesen Bedingungen für diese Parameter die insgesamt höchsten Werte erreicht werden. Die genannten Parameter kennzeichnen die Stimulation proliferativer Effekte und oxidativer Vorgänge. Tiere nach einer Diät mit hohen Anteilen an konzentriertem Futtermittel (Anteil an kurzkettigen Fettsäuren deutlich erhöht) weisen ferner ein *stratum corneum* auf, daß sich aus etwa 15 Zellschichten zusammensetzt. Hingegen besitzt das *stratum corneum* von Tieren, die einer energiearmen Diät unterzogen werden, nur etwa 4 Zellschichten (Gäbel et al., 1987; Baldwin, 1998).

Während die Sauerstoffaufnahme einen Parameter zur Beurteilung der Atmungsaktivität der Zelle darstellt, gilt die Zellkerngröße als Parameter der proteinsynthetischen Aktivität der Zelle.

Im Gegensatz zu den qualitativen Merkmalen (morphologische Veränderungen), die nach etwa 3 Wochen vollständig ausgebildet sind (Langzeitwirkung), können die quantitativen Veränderungen als Sofortwirkung bezeichnet werden (Kauffold et al., 1975).

Die markante Proliferation der Pansenzotten von Versuchstieren, die nach Erhöhung der Buttersäurekonzentration erfolgt, stimmt mit den Beobachtungen der stimulierenden Wirkung dieser Säure auf die Schleimhautentwicklung beim Jungtier überein (Sander, 1959; Tamate et al., 1962).

Auch BERG et al. (1976) stellten Untersuchungen zum Adaptationsverhalten des Pansenepithels an und studierten die Veränderungen anhand weiterer Parameter: Zellmorphologie der Zellen des *stratum corneum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* sowie des *stratum basale*, Anzahl an Zellschichten innerhalb der einzelnen Gewebeschichten, Vorhandensein von Keratohyalin granula, Struktur und Durchblutung des *corpus papillare* sowie Akkumulation von Leukozyten im Bereich der *lamina propria* (Berg et al., 1976).

Nach Fütterung einer herkömmlichen Ration (3,0 kg Wiesengras, 0,5 kg Stroh, 0,5 kg Milchviehmischfutter) besteht das *stratum corneum* aus blasenförmigen Zellen, von denen sich einzelne in Ablösung befinden. Das proximal darauf folgende *stratum granulosum* stellt sich als dünne Schicht blasiger, z.T. flacher Zellen dar, die Keratohyalin granula enthalten. Auch im *stratum spinosum* und *basale* lassen sich vorwiegend blasig transformierte Zellen erkennen, die sich fingerförmig organisieren, um sich so gegen das *corpus papillare* abzugrenzen. Der bindegewebige Körper des *corpus papillare* scheint hierbei locker strukturiert und reichlich mit Venolen und Kapillaren ausgestattet.

Tiere, die aufgeschlossene Strohpellets (2,5 kg aufgeschlossene Strohpellets, 1,0 kg Milchviehmischfutter) erhalten, zeigen im *stratum corneum* eine oberste Schicht aus platten Hornzellen; eine blasige Transformation fehlt. Im *stratum granulosum*, *spinosum* und *basale* können keine Veränderungen zur Kontrollgruppe verzeichnet werden. In der *lamina propria* jedoch wird zum einen jenes lockere Bindegewebe vorgefunden, welches schon bei der Kontrollgruppe auffiel, zum anderen fällt ein kompakteres, ebenfalls mit zahlreichen Gefäßen durchzogenes Bindegewebe, das geringgradig von Leukozyten (vor allem Lymphozyten) infiltriert ist, auf.

Eine dritte Versuchstiergruppe, deren Ration auf Konzentraten basiert, zeigt im *stratum corneum* eine glatte Schicht oberster Hornzellen. Während im *stratum granulosum* vorwiegend abgeplattete, mit Keratohyalin granula angereicherte Zellen gefunden werden, stellt sich das *stratum spinosum* ebenso wie das *stratum basale* als mächtiges Zelllager dar. Die Zellen des *stratum spinosum* jedoch erscheinen vakuolig transformiert. Das *corpus papillare* fällt im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen durch seine kompakte

Struktur auf und führt taschenartig erweiterte Venolen mit sich. Weiterhin fällt die hochgradig leukozytäre Infiltration (vor allem Lymphozyten) in diesem Bereich auf (Berg et al., 1976).

Einige Jahre später untersuchten auch LIEBICH et al. (1990) und DIRKSEN et al. (1984) das Adaptationsverhalten des Pansenepithels an Futterumstellungen. Sie beurteilten das Adaptationsverhalten anhand folgender Kriterien: Höhe des Epithels, Form der Epithelzapfen, Zellform, Interzellularräume, Verhornungsgrad des *stratum corneum* sowie Größe und bindegewebige Zusammensetzung des *corpus papillare*.

Hier konnte nach einer energiearmen Trockensteigerung beobachtet werden, daß die Höhe des Epithels abnimmt, der Grad der oberflächlichen Verhornung des *stratum corneum* jedoch zunimmt und der Papillarkörper sich reduziert. In der *lamina propria* treten englumige Venolen sowie erweiterte Arteriolen auf und das Zottenstroma erscheint verdichtet. Das kollagenfaserige Bindegewebe enthält vorwiegend Kollagen vom Typ 1 und nur geringe Mengen an Kollagen vom Typ 3 sowie geringe Mengen an Fibronektin.

Das *stratum basale* und *parabasale* weist nur wenige Schichten iso- bis hochprismatischer Zellen sowie enge Interzellularräume auf. Die Epithelzapfen sind zunächst klein und lassen degenerative Veränderungen in Kern und Zytoplasma erkennen, bis sie schließlich spitzkegelige Gestalt annehmen und nur noch eine schmale Basis besitzen.

Nach der Umstellung auf eine energiereiche Ration bilden sich subepithelial zwischen den Epithelzapfen lockere Geflechte aus kollagenfaserigem Bindegewebe aus. Hier enthält das Bindegewebe nur noch reduzierte Mengen an Kollagen Typ 1, jedoch ist der Gehalt an Kollagen Typ 3 sowie der Fibronektin Gehalt deutlich erhöht. Die Venolen erscheinen erweitert und der Papillarkörper vergrößert.

Insbesondere Zellen des *stratum basale* und des *stratum parabasale* proliferieren zu mehreren Schichten hochprismatischer Zellen. Die Epithelzapfen erscheinen abgerundet, mit breiter Basis. Die Interzellularräume zeigen sich erweitert, während sich die basalen Zellschichten hochdifferenziert und die Basalmembran verhältnismäßig dünn präsentieren (Dirksen et al., 1984; Liebich et al., 1990).

In einer weiteren Studie untersuchten KAUFFOLD et al. (1977) die Wirkung der einzelnen Fettsäuren auf das Adaptationsverhalten des Pansenepithels.

Hierbei wurde deutlich, daß nach Infusion von Essigsäure am Pansenepithel ein nahezu vollständig „kompaktes“ *stratum corneum* aus plättchenförmigen Hornzellen bestehend sowie verdickte und verfestigte Oberflächenschichten (*stratum corneum*, *stratum transitionale*) ohne Quellungserscheinungen (= histologische Merkmale der Keratinisierung) auftreten. Ferner fallen vereinzelt blasenförmig vergrößerte Zellen im *stratum transitionale* (= *stratum granulosum*), die Reduktion des *stratum germinativum* und der *lamina propria*,

eine verminderte Anzahl kapillärer Blutgefäße als auch eine signifikante Volumenverringerng der Zellkerne des *stratum basale* auf (Kauffold et al., 1977a; Kauffold et al., 1977b).

Nach Infusion von Propionsäure bestehen große Anteile (etwa 50-55 %) des *stratum corneum* aus einem aufgelockerten Gefüge kleinvacuoliger Hornzellen von diskusförmiger Gestalt. Das Gewebe zeigt nur geringgradige Keratinisierungserscheinungen, vermehrt blasenförmig vergrößerte Zellen im *stratum transitionale* sowie eine Zunahme der *lamina propria*. Besonders auffallend ist außerdem die signifikante Volumenverringerng der Zellkerne des *stratum basale* (Kauffold et al., 1977a; Kauffold et al., 1977b).

Nach Infusion von Buttersäure hingegen bestehen nur geringe Anteile (etwa 30 %) des *stratum corneum* aus einem aufgelockerten Gefüge kleinvacuoliger Hornzellen mit diskusförmiger Gestalt. Die oberflächlichen Schichten (*stratum corneum*, *stratum transitionale/granulosum*) erscheinen geringgradig verdickt und verfestigt, ohne Quellungserscheinungen zu zeigen (= histologische Merkmale der Keratinisierung). Ferner fallen vermehrt blasenförmig vergrößerte Zellen des *stratum transitionale* auf. Die Vermehrung der Lagen von *stratum spinosum*-Zellen führt zum Auftreten hierdurch verstärkter Oberflächenstrukturen in Gestalt warzenförmiger Erhebungen im Bereich der Zotten. Ebenso wie nach der Infusion von Propionsäure zeigen die Zellkerne des *stratum basale* signifikante Volumenverringerngen (Kauffold et al., 1977a; Kauffold et al., 1977b).

Die versuchsbedingten Zustandsänderungen der Pansenschleimhaut erfolgen mit Ausnahme von Acetat innerhalb des Normbereiches. Während des Essigsäureversuchs jedoch zeigt ein hoher prozentualer Anteil der Proben hyperkeratotische bzw. atrophische Zotten sowie Nekrosen und kleinere Ulzera. Die hier erhobenen Befunde ermöglichen eine deutliche Abgrenzung physiologischer Adaptationsvorgänge gegenüber den pathologischen Schleimhautzuständen.

Eine erhöhte Butyratkonzentration wirkt sich proliferativ, eine erhöhte Acetatkonzentration antiproliferativ auf das Pansenepithel aus. Propionat hingegen verursacht keine signifikanten Schleimhautveränderungen (Kauffold et al., 1977a).

Entsprechend der von KRUH (1982) und Galfi et al. (1983,1985) durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen lässt sich ergänzend hinzufügen, daß kultivierte Zellen nach einer Inkubation mit Butyrat größer werden und die Tendenz aufweisen, verschiedene Proteine (Präkeratine) und Enzyme (alkalische Phosphatase) in erhöhtem Maße zu synthetisieren (Kruh, 1982; Galfi et al., 1983; Galfi et al., 1985). Diese These unterstützt die Annahme, daß die Mitoserate *in vitro* nach Fettsäureinkubation eingeschränkt wird, jedoch eine signifikante

Volumenzunahme und Differenzierung der Zellen stattfindet. Ferner zeigen kultivierte Zellen unter diesen Bedingungen eine starke Tendenz zur Verhornung (Galfi et al., 1983).

Einer Veröffentlichung von GALFI et al. aus dem Jahre 1991 ist zu entnehmen, daß sich nach Stimulation durch Butyrat eine Teilung der Epitheliozyten, jedoch nicht der Fibrozyten der Pansenschleimhaut beobachten lässt (Galfi et al., 1991).

Wie schon unter Punkt 1.2.5 aufgeführt, markiert die zunehmende Keratinisierung des Pansenepithels unter Einfluss von kurzkettigen Fettsäuren, insbesondere unter Einfluss von Butyrat die Grenze zum pathologischen Erscheinungsbild und hiermit die Grenze der Adaptationsfähigkeit des Pansenepithels.

Störungen der Keratinisierung von Pansenepithelzellen sind in der Regel die Folge einer langen Fütterung von raufutterarmen und konzentrathaltigen Rationen, die einen pH-Abfall induzieren und das relative Verhältnis der im Pansen vorkommenden kurzkettigen Fettsäuren verändern.

Nach Inkubation einer Primärkultur mit Natrium-n-butytrat kann zum einen ein erhöhtes cytoplasmatisches Volumen beobachtet werden, zum anderen bewirkt dieses eine Verdopplung des Proteingehalts und eine Inkorporation von ¹⁴C-Glycin in die Epithelzellen. Keratin ist ein stark glycinhaltiges Protein, so daß hier die Glycininkorporation als direkter Parameter des Keratinisierungsgrades verstanden werden kann (Galfi et al., 1983).

Ebenso kann eine Akkumulation der alkalischen Phosphatase in der Zellmembran behandelter Zellen nachgewiesen werden. Die alkalische Phosphatase scheint an der Reifung von Epithelzellen beteiligt zu sein, tritt primär bei Zellen auf, die einen fortgeschrittenen Differenzierungsgrad erreicht haben und gilt deshalb ebenso als repräsentatives Merkmal der Keratinisierung.

Ferner wird unter Butyrateinfluss die Bildung und Ablösung von *stratum corneum*-ähnlichen Zellen gefördert.

Im Gegensatz dazu bleibt die Zugabe von D(-)-Laktat unter den in der Studie verwendeten Bedingungen ohne messbaren Einfluss auf die Verhornung.

Es scheint, als spiele Butyrat bei pathologischen Veränderungen eine wesentliche Rolle (Galfi et al., 1983).

Ferner wurde in Versuchen von GALFI et al. (1991) die Wirkung von Insulin auf Pansenepithelzellen untersucht. Hierbei konnte beobachtet werden, daß REC (permanente Zellkultur) in Gegenwart von Insulin sowohl die Mitoserate als auch die DNA-Syntheserate der Pansenepithelzellen erhöht.

Nach der Futteraufnahme liegt in physiologischer Weise ein erhöhter Insulinspiegel im Blut der Tiere vor. So lässt sich erklären, daß zwar unmittelbar nach der Aufnahme energiereichen Futtermittels (erhöhte intraruminale Konzentration kurzkettiger Fettsäuren) ein inhibitorischer Effekt auf das Teilungsverhalten der Pansenepithelzellen vermittelt wird

(short-term effect), jedoch anschließend der stimulative Effekt des Insulins auf die Mitoseraten dominiert (long-term effect) (Galfi et al., 1991).

1.3 ADAPTATION AUF FUNKTIONELLER EBENE

1.3.1 Grundlagen der nervösen und vaskulären Versorgung des Pansens

Alle Teile des Vormagens sind durch Äste des X. Gehirnnervs (*nervus vagus*) mit dem Zentralnervensystem verbunden und erhalten hierdurch ihre Bewegungsimpulse. Somit verhält sich der Vormagen anders als die übrigen Abschnitte des Verdauungsapparates, die sich ohne übergeordneten Antrieb ständig bewegen. In der *medulla oblongata* ist das motorische Zentrum der Vormagenbewegungen im dorsalen Vagus Kern lokalisiert, in dem die sensorisch erregenden und hemmenden Impulse eintreffen und die periodische Erregung auf die Vormagenmuskulatur ausgesendet wird.

Zwischen den Zellen einzelner Schichten der Pansenwand besteht ein gut ausgebildetes Gefäßsystem. Kapillaren eines subepithelialen Geflechtes umziehen schlingenartig die Zapfen der Papillarkörper. Die hierdurch hervorgerufene Vergrößerung der Oberfläche der Gefäßwände ermöglicht einen Moleküldurchtritt in großem Maßstab. Das Blut fließt über Zentral- und Randarterien den Zotten zu und verteilt sich gleichmäßig bis in das subepitheliale Kapillarnetz im Bereich der Zottenspitzen. Im Bereich der Zottenspitzen befinden sich ebenfalls Venolennetze, die den Blutrückstrom über Venen gewährleisten.

Die Blutdruckdifferenz zwischen den Kapillaren und Venolen stellt den für die Richtung des Stofftransportes wesentlichen Druckgradienten dar (Hofmann et al., 1982).

1.3.2 Grundlagen der Transportphysiologie des Pansens

Zum Verständnis der Transportvorgänge im Pansen ist es notwendig, die Konzentrationen der im Pansen befindlichen Substanzen darzustellen.

Die wichtigsten Kationen sind Natrium und Kalium, deren luminale Konzentration zusammen etwa 150 mmol/l beträgt. Beide Kationen verhalten sich reziprok und bleiben in der Summe der Konzentration annähernd konstant (Warner et al., 1965; Scott, 1967). Die Konzentration des luminalen Natriums wird vorwiegend durch den Gehalt an Natrium im Speichel bestimmt, der etwa 150 mmol/l beträgt (Martens et al., 1990). Nimmt der Kaliumgehalt im Futter zu, kommt es zum Konzentrationsanstieg des Kations im Pansen, was den reziproken Abfall der luminalen Natriumkonzentration bewirkt, um den osmotischen Druck des Panseninhalts möglichst gering zu halten (Scott, 1967; Gäbel et al., 1991a).

Die wichtigsten Anionen stellen die kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat dar, deren Konzentration im Pansen etwa 100 mmol/l oder mehr beträgt und deren

Konzentration stark schwanken kann. Ferner sind als Anionen Chlorid (10-20 mmol/l), Phosphat (10-15 mmol/l) sowie Hydrogencarbonat (20-60 mmol/l) vertreten.

Calcium und Magnesium kommen in nur geringen Mengen im Pansen vor (1-10 mmol/l) und unterliegen ebenfalls starken fütterungsabhängigen Schwankungen. Auch der luminale Ammoniakgehalt hängt vom Eiweißgehalt des Futtermittels ab (Engelhardt et al., 2000).

Die Osmolarität des Panseninhaltes wird von der Summe an gelösten Stoffen bestimmt und beträgt zwischen 260 mosmol/l (präprandial) und 400 mosmol/l (postprandial) (Engelhardt et al., 2000).

Der pH-Wert des Pansens liegt physiologischer Weise zwischen 5,5 und 7,0 (Engelhardt et al., 2000).

Es besteht also ein erheblicher Konzentrationsgradient zwischen Pansenumen und Blut, der vom Pansenepithel aufrechterhalten werden muß. Hieraus wird deutlich, daß das mehrschichtig verhornte Epithel des Pansens eine parazelluläre passive Bewegung der Moleküle verhindert und folglich als dichter Zellverband angesehen werden kann.

Diese Annahme findet Bestätigung in der vorhandenen Potentialdifferenz des Pansenepithels von 20-60 mV, wobei hierbei die Blutseite positiv ist (Engelhardt et al., 2000).

1.3.2.1 Natriumtransport über das Pansenepithel

1.3.2.1.1 Allgemeines

Es bestehen 2 Möglichkeiten für Natrium, das Pansenepithel zu passieren: der parazelluläre Weg sowie der transzelluläre Weg. Wie unter 1.3.2 beschrieben, überwiegt aufgrund der Dichte des Pansenepithels quantitativ der transzelluläre Transportweg.

Der parazelluläre, passive Weg verläuft durch die tight junctions der *zonulae occludentes* über den Interzellularraum und erfolgt über Diffusion (Powell, 1981).

Die ruminale Natriumkonzentration ist deutlich geringer (25-90 mmol/l) als die Konzentration dieses Kations im Blut (145 mmol/l). Ferner beträgt die transepitheliale Potentialdifferenz 20-60 mV / Blutseite positiv (Ferreira, 1966; Scott, 1967; Martens et al., 1986; Gäbel et al., 1987; Giduck et al., 1987). Da die Richtung des passiven Substrattransportes, wie oben erwähnt, vom elektrochemischen Gradienten abhängt, müsste Natrium sekretorisch in den Pansen abgegeben werden.

Jedoch konnte schon früh von DOBSON (1959) unter *in vivo* -Bedingungen und kurze Zeit später von STEVENS (1964) und FERREIRA (1964) unter *in vitro* -Bedingungen gezeigt werden, daß Natrium entgegen des elektrochemischen Gradienten vom Pansen in das Blut transportiert wird (Sperber et al., 1952; Parthasarathy et al., 1953; Dobson, 1959; Ferreira, 1964; Stevens, 1964; Chien et al., 1972; Ferreira et al., 1972; Scharrer et al., 1983; Martens et al., 1986). Hieraus wird deutlich, daß aktive Transportmechanismen am Natriumtransport beteiligt sein müssen. Diese Annahme konnte bei *in vitro*-Versuchen an isolierten

Pansenepithelien durch Zugabe spezifischer Hemmstoffe des Natriumtransportes bestätigt werden.

Beim aktiven Transport muß Natrium zunächst über die apikale Membran in die Zelle aufgenommen werden, um diese anschließend über die basolaterale Seite wieder zu verlassen (Boettcher, 2000).

1.3.2.1.2 Mechanismen der Natriumaufnahme über die apikale Membran der Zelle

Da über der apikalen Membran der Zelle eine Potentialdifferenz von $PD_a = -40$ bis -60 mV sowie ein chemischer Gradient mit $[Na^+]_{Lumen} > [Na^+]_{IZR}$ besteht, kann Natrium auf passivem Weg in die Zelle gelangen.

MARTENS et al. (1987, 1988) konnten einen elektrogenen Transport und einen elektroneutralen Transport differenzieren (Gäbel et al., 1987; Martens et al., 1988). Diese beiden Systeme arbeiten parallel und gewährleisten den optimalen Transport bei schwankenden Natriumkonzentrationen im Panselumen. Bei einer hohen luminalen Natriumkonzentration werden nahezu 90 % des Natriums über den elektroneutralen Weg transportiert, während bei niedriger Natriumkonzentration im Pansen, wie es zum Beispiel im Zusammenhang mit einer hohen Kaliumkonzentration zu beobachten ist (Sellers, 1960; Stacy et al., 1966; Scott, 1967), der elektrogene Transportmechanismus überwiegt (Martens et al., 1988; Martens, 1994).

Der elektrogene Natriumtransport am Pansenepithel ist weder Amilorid-sensitiv noch lässt er sich durch Aldosteron beeinflussen (Henseleit, 1991; Lang, 1997; Rübhelke, 1998).

In sämtlichen *in vitro*-Untersuchungen am isolierten Pansenepithel konnte festgestellt werden, daß der elektroneutrale Transport den überwiegenden Teil des Natriumtransportes ausmacht (Chien et al., 1972; Gäbel et al., 1987; Martens et al., 1988; Gäbel et al., 1991a).

Anhand verschiedener Versuche, unter anderem von CHIEN et al. im Jahre 1972 kam die Vermutung über das Vorhandensein eines Na^+/Cl^- -Transporters oder parallel geschalteter Na^+/H^+ - und Cl^-/HCO_3^- -Austauscher auf (Chien et al., 1972; Hopfer et al., 1987; Reuss et al., 1987; Martens et al., 1988; Gäbel et al., 1991a; Sehested et al., 1996a; Sehested et al., 1996b). Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, daß durch Zugabe von Azetazolamid, ein Hemmstoff der Carboanhydrase, nicht nur der Natrium- sondern auch der Chloridtransport gehemmt werden kann (Emanovic et al., 1976).

Während Hemmstoffe des $Na-Cl-$ (Hydrochlorothiazid) und des $Na^+ -K^+ -2Cl^-$ -Kotransportes (Furosemid, Bumetanid) keine Auswirkungen auf den elektroneutralen Natriumtransport zeigen, lässt sich jedoch nach Zugabe hoher Konzentrationen (1 mol/l) an Amilorid eine signifikant verminderte Aufnahme von Natrium feststellen (Gäbel et al., 1987; Martens et al., 1988; Gäbel et al., 1991a).

In dieser Konzentration wirkt Amilorid als Hemmstoff des apikalen Na^+/H^+ -Austauschers (Benos, 1982).

So liegt es nahe, daß der überwiegende Anteil des Natriumtransportes über die apikale Membran mittels des Na^+/H^+ -austauschers erfolgt, der vermutlich indirekt mit einem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher gekoppelt ist (Hopfer et al., 1987; Reuss et al., 1987; Martens et al., 1988; Gäbel et al., 1991a).

1.3.2.1.3 Mechanismen der Natriumabgabe über die basolaterale Membran der Zelle

Die basolaterale Abgabe von Natrium erfolgt über die Na^+/K^+ -ATPase, die durch hydrolytische Spaltung von ATP (Adenosintriphosphat) die hierfür notwendige Energie gewinnt und maßgeblich am Erhalt des Gradienten beteiligt ist. Durch die Na^+/K^+ -ATPase wird Natrium auf der basolateralen Seite aktiv an das Blut abgegeben (Martens et al., 1990). *In vitro*-Versuche konnten diese Annahme bestätigen und ferner den Nachweis erbringen, daß unter serosaler Präsenz von Ouabain (Hemmstoff der Na^+/K^+ -ATPase) eine reduzierte Natriumresorption stattfindet (Keynes, 1970; Harrison et al., 1975).

1.3.2.1.4 Mechanismen der Natriumaufnahme über die basolaterale Membran der Zelle

In den vergangenen Jahren konnten weitere Transportmechanismen für Natrium an der basolateralen Membran nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Na^+/K^+ -ATPase handelt es sich hierbei jedoch um passive Mechanismen zur Aufnahme von Natrium über die basolaterale Membran.

SOLEIMANI wies 2002 einen Natrium-Bicarbonat-Kotransporter (NBC) an der basolateralen Membran der proximalen Tubuli der Niere nach, der durch den elektrogenen, bicarbonatabhängigen Transportmechanismus die Aufnahme von Natrium in die Zelle ermöglicht. NBC lässt sich durch die Aktivität der Carboanhydrase II (CAH II) direkt stimulieren sowie durch Azetazolamide, ebenso wie die CAH II, hemmen (Emanovic et al., 1976; Soleimani, 2002).

HUHN et al. gelang 2003 der Nachweis von NBC sowohl an kultivierten Pansenepithelzellen sowie an intaktem Pansenepithel (Huhn et al., 2003).

Weitere Nachweise des Natrium-Bicarbonat-Kotransporters wurden an Gehirn, Pankreas, Leber, Herz, Prostata, Dick- und Dünndarm, Magen sowie der Schilddrüse erbracht (Kurtz, 1989; Burnham et al., 1997; Romero et al., 1997; Abuladze et al., 1998; Amlal et al., 1998; Romero et al., 1998; Choi et al., 1999).

Ferner existiert ein Natrium-Protonen-Austauscher an der basolateralen Membran der meisten Nierentubuluszellen. Sämtliche Natrium-Protonen-Austauscher führen ein Natriummolekül im Austausch gegen ein Proton in die Zelle ein, so auch der an der

basolateralen Membran lokalisierte Natrium-Protonen-Austauscher 1 (= NHE1) (Brant et al., 1995; Burckhardt et al., 2002). Wie NHE3 (Natrium-Protonen-Austauscher der apikalen Zellmembran) ist auch NHE1 über Zugabe von Amilorid hemmbar (Brant et al., 1995).

1.3.2.2 Chloridtransport über das Pansenepithel

Der aktive Transport von Chlorid (und Natrium) vom Lumen in das Blut wurde schon vor vielen Jahren durch Untersuchungen am Ileum der Ratte (Curran et al., 1957), an der Gallenblase der Plötze (Diamond, 1968) und des Kaninchens (Wheeler, 1963) sowie am Epithel der Vormägen verschiedener Wiederkäuer (Sperber et al., 1952; Stevens, 1964; Harrison, 1971; Chien et al., 1972; Ferreira et al., 1972; Scharrer et al., 1983; Martens et al., 1988) beobachtet.

Der Chloridtransport vom Pansenlumen Richtung Blut steht in enger Verbindung zum elektroneutralen Natriumtransport (Chien et al., 1972; Ferreira et al., 1972; Gäbel et al., 1987; Martens et al., 1988; Gäbel et al., 1991a; Sehested et al., 1996b). Diese indirekte Verbindung ergibt sich aus den mittels der Carboanhydrase in den Zellen aus H_2CO_3 entstehenden Dissoziationsprodukten H^+ und HCO_3^- (Hopfer et al., 1987). Während das Proton über den Natrium-Protonen-Austauscher die Zelle auf der apikalen Seite wie auch auf der basolateralen Seite verlassen kann, wird das Hydrogencarbonat über einen Anionenaustauscher (engl.: Anion exchanger = AE) über die apikale Membran an das Lumen abgegeben (Martens et al., 1990). Dass ein Chlorid-Bicarbonat-Austauscher (AE), der an der apikalen Membran eine HCO_3^- -Sekretion sowie eine Chlorid-Resorption bewirkt, auftritt, vermuteten schon SWALLOW (1966), DEVROEDE et al. (1969) und LEVITAN et al. (1962) (Levitan et al., 1962; Swallow, 1966; Devroede et al., 1969; Chien et al., 1972). Über die Abgabe von Chlorid auf der basolateralen Seite ist bislang nichts bekannt.

1.3.2.3 Transport von kurzkettigen Fettsäuren über das Pansenepithel

Die kurzkettigen Fettsäuren, die im Pansen in einer Konzentration von etwa 100 mmol/l und mehr vorkommen, entstehen als mikrobielle Fermentationsprodukte leichtverdaulicher Kohlenhydrate und stellen die quantitativ wichtigsten Anionen des Panseninhaltes dar (Bergman, 1990; Gäbel, 1995). Durch die Produktion der kurzkettigen Fettsäuren im Pansen kann der Energiebedarf des Tieres bis zu 80% gedeckt werden (Bugaut, 1987; Bergman, 1990). Kurzkettige Fettsäuren passieren die Zelle auf transzellulärem Weg, wobei die Transportmechanismen der basolateralen Membran bislang unbekannt sind.

Es ist unschwer zu erkennen, daß eine Akkumulation von kurzkettigen Fettsäuren im Pansen zu einem unerwünschten Absinken des pH-Wertes und zum Anstieg des osmotischen Drucks führen würde.

Eine effektive Resorption der kurzkettigen Fettsäuren ist deshalb unerlässlich und verläuft transzellulär auf passivem Wege, wobei der hohe chemische Gradient zwischen

Pansenlumen und Blut als wesentliche Triebkraft angesehen werden kann (Sehested et al., 1999a; Sehested et al., 1999b). Zum einen können die SCFA⁻ (= short chain fatty acids) als Anion, in dissoziierter Form über einen Anionenaustauscher (AE), der unter anderem kurzkettige Fettsäuren gegen Hydrogencarbonat austauscht, in die Zelle aufgenommen werden (Ash et al., 1963; Rechkemmer et al., 1988a; Gäbel et al., 1991a; Gäbel et al., 1991b; Kramer et al., 1996; Gäbel et al., 1997; Leonhard-Marek et al., 1998; Sehested et al., 1999a; Sehested et al., 1999b; Schweigel et al., 2003), zum anderen können die SCFA⁻ nach Absinken des intraruminalen pH's in undissoziierter Form über Diffusion in die Zelle aufgenommen werden (Aafjes, 1967; Rechkemmer et al., 1988b; Gäbel et al., 1997; Sehested et al., 1999a; Sehested et al., 1999b). Da die Lipidlöslichkeit der kurzkettigen Fettsäuren entsprechend ihrer C-Kettenlänge zunimmt, wird bei gleichen Konzentrationen Butyrat > Propionat > Acetat resorbiert (Thorlacius, 1972; Gäbel et al., 1987).

Um jedoch die Akkumulation von SCFA⁻ intrazellulär zu vermeiden und den Konzentrationsgradienten aufrechtzuerhalten, müssen Mechanismen existieren, die die intrazelluläre Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren reduzieren. Es ist bekannt, daß Butyrat > Propionat > Acetat intraepithelial verstoffwechselt werden. Das hierbei in geringen Mengen anfallende Kohlendioxid katalysiert über die Synthese von H⁺ und HCO₃⁻ mittels Carboanhydrase die Aktivität der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE 1 und 3) sowie des Natrium-Bicarbonat-Kotransporters (NBC) und des Anionen-Austauschers (siehe 1.2.2).

Einerseits wirkt sich die hierbei freiwerdende Energie positiv auf sämtliche aktiven Transportmechanismen aus; andererseits wird hierdurch der Protonen-liefernde Mechanismus über den Natrium-Protonen-Austauscher unterstützt, so daß die intraruminalen Fettsäuren in undissoziierter Form die apikale Membran passieren können (Bugaut, 1987).

Auch intraruminal werden durch den Hydratisierungsvorgang von CO₂ (CO₂ + H₂O > H₂CO₃ > HCO₃⁻ + H⁺) Protonen zur Verfügung gestellt, welche die Diffusion der Fettsäuren in der undissoziierten Form begünstigen (Ash et al., 1963).

1.3.2.4 Transport von Protonen über das Pansenepithel

Es konnte an einigen Epithelien bereits nachgewiesen werden, daß eine protonenbetriebene Kraft, in Form von elektrogenen, vakuolären Protonen-ATPasen (vHATPasen) als Triebkraft zahlreicher Transportprozesse genutzt wird und diese ebenso zur intrazellulären pH-Homöostase in entscheidendem Maße beiträgt (Harvey, 1998; Schweigel et al., 2003). SCHWEIGEL et al. (2003) wiesen die vHATPasen am Pansenepithel von Schafen nach und postulierten die Funktion der vakuolären Protonen-ATPasen als Triebkraft zahlreicher Transportprozesse, vor allem durch die Beteiligung der vHATPasen an der Aufrechterhaltung des elektrischen Gradienten (intrazellulär = negativ), der für sämtliche elektrogenen

Transportmechanismen von essentieller Bedeutung ist. Hierfür geben die vHATPasen intrazelluläre Protonen über die apikale Membran in das Lumen ab (Schweigel et al., 2003). Die Aktivität der vakuolären Protonen-ATPasen lässt sich durch Zugabe von Bafilomycin A1 sowie Foliomycin hemmen (Bowmann, 1988; Dröse, 1997; Schweigel et al., 2003).

Weiterhin konnte das Mitwirken der vakuolären Protonen-ATPase an der Aufrechterhaltung des Protonengradienten bzw. des Membranpotentials zur Gewährleistung der Aufnahme von Norepinephrin in synaptische Vesikel, der Aktivität der sauren Hydrolasen in Lysosomen von zentralen Vakuolen der Pflanzen und niederen Eukaryonten sowie des Exozytose- und Endozytosevorgangs nachgewiesen werden. Ebenso gelang der Nachweis einer direkten Abhängigkeit des Transportes lysosomaler Enzyme zu den Lysosomen sowie der pH-Homöostase von Makrophagen von vakuolären Protonen-ATPasen.

Gewebespezifische Untersuchungen ergaben, daß vHATPasen der intercalated cells den Protonentransport entlang der apikalen Membran ermöglichen. Ferner spielen die vHATPasen in Osteoklasten im Zusammenhang mit der Knochenresorption eine wesentliche Rolle. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß die vakuolären H⁺-ATPasen in Zellen des Magen-Darm-Traktes von Insekten das Membranpotential aufrechterhalten, das zum Protonen-Kalium-Antiport benötigt wird (Bernasconi et al., 1990; Puopolo et al., 1992; Bartkiewicz et al., 1995; Davies et al., 1996; Stevens et al., 1997; Nakhoul et al., 2002).

1.3.2.5 Transport von Kalium über das Pansenepithel

Da *in vivo* die Kaliumkonzentration des Pansenlumens stark von der Kaliumzufuhr über die Nahrungsaufnahme (präprandial etwa 20-40 mmol/l, postprandial etwa 100 mmol/l) abhängt, liegen 2 bidirektionale Wege des Kaliumtransportes vor (Sellers, 1960; Ash et al., 1963; Warner et al., 1965; Dobson et al., 1966).

Nach der Futteraufnahme besteht ein großer Konzentrationsgradient zwischen Pansenlumen (~ 100 mmol/l) und der Plasmakonzentration (~ 4-5 mmol/l), so daß die Kaliummoleküle entsprechend dem Konzentrationsgradienten aus dem Lumen resorbiert werden. Hierbei wird angenommen, daß es sich um einen passiven Transportmechanismus handelt, dessen eindeutiger Passageweg noch nicht vollständig verstanden wird (Parthasarathy et al., 1953).

Es konnte jedoch unter *in vitro*-Bedingungen nachgewiesen werden, daß sowohl auf der basolateralen Membran wie auch auf der apikalen Membran ein Kalium-Kanal zur Verfügung steht, der das über die Na⁺/K⁺-ATPase in die Zelle aufgenommene Kalium nach luminal oder basolateral wieder abgibt (Martens et al., 1990). Der apikal lokalisierte Kaliumkanal stellt jedoch eine Besonderheit des Pansens dar und fehlt in anderen Geweben.

Unter *in vitro*-Bedingungen ergibt sich bei etwa gleichen Konzentrationen (etwa 4-5 mmol/l) von Kalium auf luminaler sowie auf basolateraler Seite eine geringe Nettosekretion von Kalium über den apikalen Kaliumkanal in das Pansenlumen (Ferreira et al., 1972).

1.3.2.6 Magnesiumtransport über das Pansenepithel

Für Magnesium besteht zwar ein chemischer Gradient, der eine Resorption von Magnesium begünstigen würde, ihm entgegen wirkt jedoch der elektrische Gradient, der eine Sekretion in das Pansolumen fördert. Da der elektrische Gradient die stärkere Triebkraft darstellt, müssen aktive, transzelluläre Transportmechanismen angenommen werden, die zur Magnesiumresorption führen. Hierbei konzentrieren sich die Untersuchungen auf Transportmechanismen, die denen der Natriumresorptionsmechanismen sehr ähnlich zu sein scheinen (Schweigel et al., 2003). Man differenziert auch hier ein elektrogenes/kaliumsensitives und ein elektroneutrales/kaliuminsensitives Transportsystem (Leonhard et al., 1989; Schweigel et al., 2003).

Eine erhöhte intraruminale Kaliumkonzentration führt immer zu einem reduzierten elektrogenen Magnesiumtransport (Gäbel et al., 1987). Dieses Verhalten stellt insbesondere durch das hierdurch hervorgerufene Auftreten einer Hypomagnesämie (hypomagnesämische Weidetetanie) ein in der Praxis weit verbreitetes Problem dar.

1.3.2.7 Harnstofftransport über das Pansenepithel

Der ruminohepatische Kreislauf stickstoffhaltiger Verbindungen bei Wiederkäuern verlangt sowohl die Resorption von Ammoniumionen als auch die Sekretion von Harnstoff. Beide Transportwege verlaufen entlang eines Konzentrationsgradienten über passive Diffusionsmechanismen (Engelhardt et al., 2000).

1.3.2.8 Kalziumtransport über das Pansenepithel

Von CHIEN et al. (1972), HÖLLER (1988) sowie BEARDSWORTH et al. (1987) und anderen gehen Beobachtungen aus, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Resorption von Kalzium aus dem Pansen vermuten lassen. (Chien et al., 1972; Care et al., 1984; Beardsworth, 1987; Höller, 1988). Hierbei handelt es sich um einen aktiven Transportmechanismus (Schroder et al., 1997; Wadhwa et al., 2000). Informationen über genaue Mechanismen der Kalziumresorption liegen jedoch nicht vor.

1.3.2.9 Phosphatresorption über das Pansenepithel

Bisher vorliegende Ergebnisse zur Phosphatresorption verhalten sich widersprüchlich. Obwohl SCOTT et al. (1987) in ihren Versuchen keine Phosphatresorption aus dem Pansen feststellten (Scott et al., 1987), wurde diese von anderen Untersuchern festgestellt (Engelhardt et al., 2000).

1.3.2.10 Wasser- und CO₂-Transport über das Pansenepithel

Die Osmolarität des Panseninhalts ist fütterungsabhängig. Vor der Fütterung ist der Vormageninhalt isoton bis leicht hypoton (260-340 mosmol/l). Nach der Futteraufnahme

1.3.3 Beeinflussung der Transportprozesse am Pansenepithel

Seit Langem ist bekannt, daß die Transportprozesse über das Pansenepithel durch verschiedene Größen beeinflusst werden können. Diesbezüglich wurde vor allem der Transport von Natrium untersucht. Parameter wie:

- Fütterungsregime (Gäbel et al., 1987)
- Akkumulation ruminaler Fermentationsprodukte, z.B. SCFA⁻, CO₂, HCO₃⁻ (Gäbel et al., 1987; Martens et al., 1988; Gäbel et al., 1991a; Gäbel et al., 1991b)
- intraruminaler pH-Wert (Gäbel et al., 1987; Gäbel et al., 1989) sowie
- Osmolarität (Gäbel et al., 1987; Martens, 1998; Leclerq, 1999)

verändern die Transportprozesse über das Pansenepithel.

Adaptative Veränderungen von Transportvorgängen im Pansenepithel werden insbesondere nach Fütterungsumstellungen beobachtet, bei denen der Raufutteranteil zugunsten des Kraffutteranteils reduziert wird (Nocek et al., 1980; Scharrer et al., 1983; Dirksen et al., 1984). Diese energiehaltige aber rohfaserarmer Diät führt zu einer Zunahme intraruminaler Fermentationsprodukte, insbesondere zur Zunahme der kurzkettigen Fettsäuren und somit zum Anstieg der Osmolarität und einem Abfall des pH-Wertes im Pansenlumen (Gäbel et al., 1987; Lopez et al., 2003).

Sämtliche Transportvorgänge des Pansenepithels erfahren eine Steigerung nach einer energiereichen Diät. Dieses konnte von DIRKSEN et al. (1984) und GÄBEL et al. (1987) für SCFA⁻ (Dirksen et al., 1984; Gäbel et al., 1987), von GÄBEL et al. (1987) für Magnesium und Natrium (Gäbel et al., 1987) und von UPPAL et al. (2003) für Kalzium nachgewiesen werden (Uppal et al., 2003a; Uppal et al., 2003b).

Werden Wiederkäuer hingegen längere Zeit unter Bedingungen gehalten, die nur eine minimale Energiezufuhr gewährleisten, so kommt es zu gegenläufigen adaptativen Veränderungen im Pansen. Futterentzug führt unter Einschränkung der metabolischen Aktivität am Pansenepithel zu einer starken Reduktion der Resorptionsraten kurzkettiger Fettsäuren, Natrium, Chlorid, Magnesium und Wasser. (Gäbel et al., 1993a).

1.3.3.1 Beeinflussung des Natrium-Protonen-Austauschers (NHE) durch konzentratreiche Fütterung

GÄBEL et al. gelang 1987 der Nachweis des stimulativen Effektes kurzkettiger Fettsäuren durch energiereiche Diäten auf den Natriumtransport am Pansenepithel (Gäbel et al., 1987). Ebenso konnten ULLRICH et al. (1971) und PETERSEN et al. (1981) einen gesteigerten Natriumtransport nach Stimulation durch SCFA⁻ an den proximalen Tubuli der Rattenniere

und der Gallenblase des Meerschweins beobachten (Ullrich et al., 1971; Petersen et al., 1981).

WARNER et al. (1965) führen die gesteigerten Transportraten für Natrium auf den intraruminal erhöhten osmotischen Druck zurück. Postprandial beträgt der intraruminale osmotische Druck etwa 400 mosmol/l (Warner et al., 1965). Hieran sind maßgeblich die vor allem bei energiereichen Diäten entstehenden kurzkettigen Fettsäuren beteiligt (Bennink et al., 1978). Eine erhöhte intraruminale Osmolarität führt zu einem vermehrten Wassereinstrom in das Pansenlumen (Dobson et al., 1976), zum anderen wird durch den hypertonen Panseninhalt sowohl der Speichelfluss reduziert (Warner et al., 1977) als auch die Futteraufnahme gedrosselt (Carter et al., 1990a; Carter et al., 1990b; Carter et al., 1990c) sowie die Natriumresorption gesteigert (Warner et al., 1965). Diese Mechanismen dienen der Normalisierung des osmotischen Drucks.

Die dargestellte Veränderung des Natriumtransportes durch energiereiche Fütterung, beziehungsweise erhöhte Konzentrationen kurzkettiger Fettsäuren wird ferner von den Beobachtungen unterstützt, die GÄBEL et al. (1991) und MÜLLER et al. (2000) während ihrer *in vitro*-Versuche machen konnten. Sie stellten fest, daß ein erhöhter CO₂-Partialdruck, wie er im Pansen nach erhöhter Zufuhr kurzkettiger Fettsäuren beobachtet wird, beziehungsweise eine erhöhte intraruminale CO₂-Konzentration, zu einer gesteigerten Resorption von Natrium am Pansenepithel führt (Gäbel et al., 1991a; Gäbel et al., 1991b; Müller et al., 2000).

PETERSEN et al. (1981) erklären die gesteigerte Natriumresorption folgendermaßen: Da der pK-Wert von kurzkettigen Fettsäuren bei etwa 4,8 liegt, kommt es nach der Aufnahme der kurzkettigen Fettsäuren in undissoziierter Form, intrazellulär zur schnellen Dissoziation dieser. Hierbei werden freie H⁺-Ionen an das Zellinnere übergeben, die über den apikal lokalisierten Natrium-Protonen-Austauscher nach extrazellulär „recycled“ werden und hierdurch den Natriumtransport katalysieren (Petersen et al., 1981).

UPPAL et al. (2003) konnten diesen Vorgang für den Austausch von Kalzium gegen ein Proton und LEONHARD-MAREK et al. (1998) für den Austausch von Magnesium gegen ein Proton nachvollziehen (Leonhard-Marek et al., 1998; Uppal et al., 2003a; Uppal et al., 2003b).

Werden die kurzkettigen Fettsäuren in dissoziierter Form als Anion über den apikal lokalisierten Anionexchanger (AE) in die Zelle aufgenommen, so geschieht dieses im Austausch mit Hydrogencarbonat an das Pansenlumen. In jedem Fall resultiert ein Abfall des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) nach der Aufnahme kurzkettiger Fettsäuren in dissoziierter Form. Einerseits geschieht dieses durch die Abgabe von Hydrogencarbonat an das

Pansenlumen, andererseits durch die Abgabe freier Protonen an das Zellinnere. Hierbei stellt die gesteigerte Aktivität des apikalen NHE einen Mechanismus zur Kompensation der intrazellulären Ansäuerung dar (Uppal et al., 2003a; Uppal et al., 2003b). Eine Akkumulation von Natrium in der Zelle wird durch erhöhte Aktivität der basolateral lokalisierten Natrium-Kalium-ATPase (Na^+/K^+ -ATPase) verhindert, die das anfallende Natrium auf basolateraler Seite Richtung Blut transportiert (Gäbel et al., 1991a; Gäbel et al., 1991b). Durch den gesteigerten intrazellulären Fettsäuremetabolismus kann die durch das in erhöhtem Maße anfallende ATP (Adenosintriphosphat), freiwerdende Energie für den Antrieb der energiebedürftigen Na^+/K^+ -ATPase genutzt werden (Gäbel et al., 1991a; Gäbel et al., 1991b; Martens et al., 1991; Diernaes et al., 1994; Sehested et al., 1996b). Jedoch darf der intrazelluläre pH-Wert nicht zu stark sinken, da hierdurch die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase gehemmt würde (Orlando et al., 1984).

SEHESTED et al. (1996) hingegen erklären den stimulativen Effekt kurzkettiger Fettsäuren auf den Natriumtransport dadurch, daß große Anteile der in die Zelle aufgenommenen kurzkettigen Fettsäuren direkt im Epithel metabolisiert werden. Das hierdurch vermehrt anfallende CO_2 bedingt einen intrazellulären pH-Abfall, der über eine gesteigerte Aktivität des basolateralen Natrium-Protonen-Austauschers reguliert wird. Hierdurch werden vermehrt Natriumionen nach intrazellulär verbracht (Sehested et al., 1996b).

Daß es sich bei der diätabhängigen Steigerung des Natriumtransportes um elektroneutralen Transport handelt, konnten SHEN et al. (2004) nachweisen. Der Natriumtransport ließ sich durch Zugabe des NHE-spezifischen Hemmstoffes Amilorid hemmen (Shen et al., 2004a).

Wie von MARTENS (1994) am Schaf und SEHESTED et al. (1996) am Rind nachgewiesen werden konnte, erfährt der elektroneutrale Natriumtransport, der bei hohen Natriumkonzentrationen überwiegt, eine Sättigung. Dieses Phänomen tritt dann auf, wenn die Protonenaufnahme der Zelle über undissoziierte Fettsäuren die Kapazität des Natrium-Protonen-Austauschers übersteigt (Martens, 1994; Sehested et al., 1996b).

Weiterhin gelang WEIGAND et al. (1975), GÄBEL et al. (1993) und DIERNAES et al. (1994) der Nachweis, daß die ruminale Transportkapazität sowie der Metabolismus kurzkettiger Fettsäuren über die Fütterung beeinflusst werden können (Weigand et al., 1975; Gäbel et al., 1993b; Diernaes et al., 1994). Die an heugefütterten Schafen beobachtete Sättigung der Natriumresorption bei einer Konzentration von 80 mmol/l SCFA^- , konnte an Geweben konzentratereich gefütterter Schafe nicht festgestellt werden (Diernaes et al., 1994).

1.3.3.2 Beeinflussung des Anionenaustauschers (AE) durch konzentratereiche Fütterung

Da es sich im Pansenepithel um ein parallel arbeitendes Natrium-Protonen- und Chlorid-Hydrogencarbonat-Transportsystem handelt, ist es verständlich, daß ein intrazellulärer pH-

Abfall nicht nur die Aktivität des Natrium-Protonen-Austauschers beeinflusst, sondern auch die Aktivität des Anionenaustauschers (Knickelbein et al., 1985a; Knickelbein et al., 1985b; Hopfer et al., 1987; Diener et al., 1997).

Wie oben dargestellt, kommt es nach einer gesteigerten intrazellulären Aufnahme kurzkettiger Fettsäuren zu einer CO_2 -Anflutung im Zellinneren. Durch die Aktivität der Carboanhydrase entstehen im Folgenden große Mengen an H^+ -sowie HCO_3^- -Ionen, die die Zelle über den Natrium-Protonen-Austauscher sowie den Anionenaustauscher wieder verlassen.

Die Sekretion von Hydrogencarbonat in das Pansenlumen hängt daher in vermehrtem Maße von der luminalen Konzentration kurzkettiger Fettsäuren ab und gilt vor allem bei Tieren, die unter Bedingungen einer konzentratreichen Diät gehalten werden, als wichtiger Faktor des Alkalisierungsprozesses des Panseninhaltes (Gäbel et al., 1991a; Gäbel et al., 1991b).

Da wie von STACY et al. (1966) postuliert, die Speichelsekretion bei hypertonem Panseninhalt gedrosselt wird, um die Osmolarität des Panseninhaltes zu beschränken, kommt es hierdurch gleichermaßen zu einer reduzierten Pufferzufuhr über den Speichel, so daß unter diesen Bedingungen die Alkalisierung über den Anionenaustauscher von großer Bedeutung ist (Ash et al., 1963; Stacy et al., 1966).

PETERSEN et al. konnten 1981 eine gesteigerte Chloridresorption nach Stimulation durch Butyrat am isolierten Epithel der Gallenblase nachweisen (Petersen et al., 1981), während DIENER et al. diesen Nachweis 1997 am Colonepithel der Ratte führen konnten (Diener et al., 1997). DIERNAES et al. gelang dieser Nachweis 1994 am Pansenepithel des Rindes (Diernaes et al., 1994) und MULLER et al. (2000) an Epithelzellen des Schafpansen (Müller et al., 2000).

Neben der Abhängigkeit der Hydrogencarbonatsekretion von der Chloridresorption (Chien et al., 1972; Gäbel et al., 1991a) besteht eine Abhängigkeit der Hydrogencarbonatsekretion von der Resorption kurzkettiger Fettsäuren (Ash et al., 1963).

So konnten GÄBEL et al. (1987) nachweisen, daß Schafe nach Erhalt einer konzentratreichen Diät eine gesteigerte Hydrogencarbonatsekretion sowie eine erhöhte Resorption kurzkettiger Fettsäuren gegenüber den „heugefütterten“ Tieren aufweisen (Dirksen et al., 1984; Gäbel et al., 1987; Doreau et al., 1997b; Doreau et al., 1997a). Dieses führt bei den konzentratreich gefütterten Tieren innerhalb kurzer Zeit zu einer signifikanten Erhöhung des intraruminalen pH-Wertes. So zeigen energiereich gefütterte Tiere ein Adaptationsverhalten des Pansenepithels, daß die weit verbreitete und gefürchtete Pansenazidose durch die oben dargestellten Mechanismen minimieren kann (Gäbel et al., 1991a; Gäbel et al., 1991b).

Auch hier werden die Beobachtungen von den Ergebnissen, die GÄBEL et al. (1991) und MULLER et al. (2000) während ihrer Versuche erhielten, unterstützt. Ein erhöhter CO_2 -

Partialdruck beziehungsweise eine erhöhte CO₂-Konzentration führt, wie schon für den Natriumtransport beschrieben, zu einer gesteigerten Chloridresorption (Gäbel et al., 1991a; Gäbel et al., 1991b; Müller et al., 2000).

ALPER et al. (2001) konnten beobachten, daß eine intrazelluläre wie auch extrazelluläre Ansäuerung sowie die Akkumulation von Protonen, die Aktivität des Anionenaustauschers 2 (AE2) hemmen (Alper et al., 2001). Dieses steht in positiver Korrelation zu den Beobachtungen von BERNARDO et al. (1999), die nachweisen konnten, daß die intrazelluläre pH-Regulation durch den Natrium-Bicarbonat-Kotransporter eine wichtige Funktion für den Erhalt der Transportvorgänge der Epithelzellen im Bereich der proximalen Tubuli der Niere darstellt (Bernardo et al., 1999).

1.3.3.3 Beeinflussung des Natrium-Bicarbonat-Kotransporters (NBC) durch konzentratreiche Fütterung

Über die Wirkung kurzkettiger Fettsäuren beziehungsweise eines intraruminalen pH-Abfalls sowie der intraruminalen Erhöhung der Osmolarität auf den Natrium-Bicarbonat-Kotransporter ist bislang nichts bekannt.

Lediglich BERNARDO et al. (1999) konnten eine gesteigerte Aktivität des NBC's während einer metabolischen Azidose an den proximalen Tubuli der Niere nachweisen. Im umgekehrten Sinne wird die Aktivität des Natrium-Bicarbonat-Kotransporters während einer metabolischen Alkalose gehemmt. Der basolateral lokalisierte NBC und der apikal lokalisierte NHE3 arbeiten hierbei synergistisch und garantieren hierdurch die intrazelluläre pH-Homeostase (Bernardo et al., 1999).

Aus der Veröffentlichung von HUHN et al. (2003) geht hervor, daß der Natrium-Protonen-Austauscher auch im Pansenepithel einen wesentlichen Beitrag zur Regulation des intrazellulären pH-Wertes leistet. Informationen über regulative Wirkungen von zum Beispiel kurzkettigen Fettsäuren liegen jedoch nicht vor (Huhn et al., 2003).

1.3.3.4 Beeinflussung der vakuolären Protonen-ATPasen (vHATPasen) durch konzentratreiche Fütterung

Über die Wirkung kurzkettiger Fettsäuren beziehungsweise eines intraruminalen pH-Abfalls sowie der intraruminalen Erhöhung der Osmolarität auf die vakuolären Protonen-ATPasen ist bislang nichts bekannt.

1.3.4 Erläuterung der gewählten Stimulatoren

1.3.4.1 Komponenten, die bei einer üblichen Konzentratfütterung vermehrt anfallen

1.3.4.1.1 Kurzketttige Fettsäuren: Acetat, Propionat und Butyrat

Die Adaptation des Pansenepithels wird maßgeblich von der Wahl des Futtermittels beeinflusst und führt zu morphologischen, biochemischen und physiologischen Veränderungen (Nocek et al., 1980; Scharrer et al., 1983; Dirksen et al., 1984; Gäbel et al., 1987; Uppal et al., 2003a; Uppal et al., 2003b).

Das Ausmaß der morphologischen und funktionellen Veränderungen der Pansenschleimhaut korreliert mit den Veränderungen der Konzentrationen von Essig-, Propion- und Buttersäure in der Pansenflüssigkeit.

Propionat und Butyrat stellen hierbei sowohl Stimulatoren des morphologischen Wachstums als auch „Katalysatoren“ der Transportprozesse der einzelnen Zelle dar. Sowohl von der resorbativen Oberfläche der Pansenschleimhaut als auch von der Aktivität der in den Pansenepithelzellen lokalisierten Transporter hängt schließlich die Resorptionskapazität des Pansenepithels ab (Dirksen et al., 1984; Gäbel et al., 1987; Dirksen et al., 1992).

Zahlreiche Nachweise einer gesteigerten Aktivität des Natrium-Protonen-Austauschers (NHE) sowie des Anionenaustauschers (AE) am Pansenepithel unter Anwesenheit einer erhöhten Konzentration kurzkettiger Fettsäuren konnten bereits geführt werden (siehe 1.3.3). Zur Simulation möglicher Effekte von Butyrat auf REC wurden dem Erhaltungsmedium *in vitro* Konzentrationen von 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM und 1,0 mM zugesetzt.

1.3.4.1.2 Laktat

Laktat stellt ein Intermediärprodukt der intraruminalen Abbauvorgänge leicht fermentierbarer Kohlenhydrate dar. Es entsteht als Abbauprodukt von Pyruvat, bevor dieses enzymatisch zu Propionat umgewandelt wird (Engelhardt et al., 2000).

Nach Untersuchungen von MOLLER et al. (1997) wird Laktat passiv durch Diffusion über das Pansenepithel transportiert. Der Transport von Laktat erfährt hierbei keine Sättigung. Während der von ihnen durchgeführten Versuche konnte unter erhöhter Laktatkonzentration (20 mmol/l) eine signifikante Reduktion des Natriumtransportes beobachtet werden (Moller et al., 1997).

Um die Situation, die im Pansen nach konzentratreicher Diät vorliegt, *in vitro* nachzuempfinden, wurde dem Erhaltungsmedium Laktat in einer Konzentration von 0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM und 1,0 mM zugefügt.

1.3.4.2 Kohlendioxid (CO₂)

Nicht nur durch den mikrobiellen Abbau von Kohlenhydraten im Pansen der Wiederkäuer, sondern auch durch den intrazellulären Fettsäuremetabolismus fallen intra- als auch extrazellulär beträchtliche Mengen an CO₂ an (Sehested et al., 1996b; Engelhardt et al., 2000).

Die direkte Wirkung von CO₂ auf die Transportprozesse des Pansenepithels konnte bereits nachgewiesen werden. Sowohl die Aktivität des Natrium-Protonen-Austauschers als auch des Anionenaustauschers wurde unter erhöhter CO₂-Konzentration gesteigert (Gäbel et al., 1991a; Gäbel et al., 1991b; Müller et al., 2000).

CO₂ wird im Pansen in erster Linie im Rahmen des Decarboxylierungsvorganges von Pyruvat produziert. Da Pyruvat als Intermediärprodukt des Abbaus von Kohlenhydraten entsteht, besteht eine positive Korrelation zwischen konzentratreichen, kohlenhydrathaltigen Futtermitteln und der extra- wie intrazellulären Produktion von CO₂ (Engelhardt et al., 2000). Dabei liefert ein kg Trockensubstanz (TS) des Futters zwischen 4 und 5 Mol CO₂ (Czerkawski, 1986; Leonhard, 1990).

Über den Speichel gelangen darüber hinaus große Mengen an HCO₃⁻ als notwendige Puffersubstanz in den Pansen. Bei einer Konzentration von 125 mmol HCO₃⁻/l Speichel (Erdmann, 1988) und einer Speichelflussrate von 10-13 l/kg TS des aufgenommenen Futters fließen dem Pansen nochmals 1,3-1,69 Mol HCO₃⁻/kg aufgenommene TS zu, die zu CO₂ umgewandelt werden können. Die Mengen an CO₂ und HCO₃⁻ führen im Pansen zu einem CO₂-Partialdruck von etwa 85 kPa und einer Bicarbonatkonzentration von circa 80 mmol/l (Leonhard, 1990).

In vitro werden Pansenepithelzellen in einem Gasgemisch von 5 % CO₂ und 95 % O₂ Zufuhr kultiviert. Der CO₂-Partialdruck wurde während der Durchführung der *in vitro*-Stimulationsversuche auf 7,5 % erhöht.

1.3.4.3 Mögliche Wachstumsfaktoren, die an dem Adaptationsvorgang des Pansenepithels beteiligt sind

1.3.4.3.1 Insulin-like growth factor (IGF1) und epidermal growth factor (EGF)

Das in der Hypophyse gebildete Wachstumshormon (GH = Growth Hormone, = STH = Somatotropes Hormon) wirkt in der Peripherie nicht direkt, sondern über 2 in der Leber synthetisierte Peptide: IGF1 und IGF2. IGF1 und 2 sind am prae- (1) und postnatalen (2) Wachstum beteiligt und zeigen mitogene Wirkung.

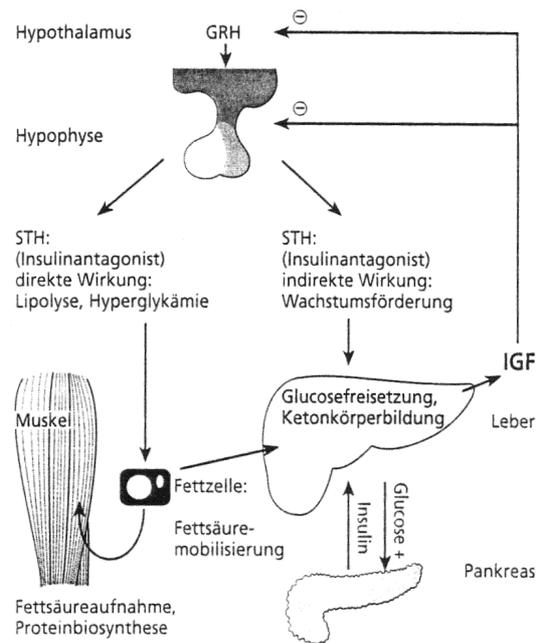


Abbildung 6 Graphische Darstellung der Wirkungsmechanismen von GRH und STH sowie deren Einfluss auf die IGF1-Abgabe. Aus: W.V. Engelhard, G. Breves, „Physiologie der Haustiere“, 1. Auflage, Enke Verlag, 2000.

Ferner wirkt das hypophysäre Hormon STH (Somatotropes Hormon) lipolytisch, fördert beim Rind die Milchleistung und führt zur Glucosefreisetzung in der Leber. Steigt der Blutglucosegehalt über das physiologische Maß hinaus an, so kommt es zur Insulinausschüttung. Insulin (STH-Antagonist) reguliert primär den Kohlenhydratstoffwechsel und verhindert einen übermäßigen Anstieg der Blutglucose durch eine vermehrte Aufnahme von Glucose und Aminosäuren in Leber, Muskel und Fettgewebe sowie durch vermehrte Bildung von Glycogen, Triglyceriden und Proteinen.

Eine Besonderheit des Wiederkäuers stellt die Tatsache dar, daß im Gegensatz zu monogastrischen Spezies die Steuerung der Insulinsekretion nicht vom Blutglucosegehalt ausgeht, sondern von dem Gehalt an Propionat und Butyrat im Blut abhängt. Steigt die Konzentration der kurzkettigen Fettsäuren im Blut an, kommt es zur Insulinausschüttung (Engelhardt et al., 2000).

Die Ergebnisse von BALDWIN (1999) und SHEN et al. (2004) unterstützen die Annahme einer Beteiligung von IGF1 an der Adaptation des Pansenepithels in Abhängigkeit von energiereichen Diäten (Baldwin, 1999; Shen et al., 2004b). Während ihrer Versuche haben SHEN et al. (2004) neben gesteigertem Zottenwachstum und der Zunahme der resorptiven Oberfläche, eine Steigerung des Natrium-Nettofluxes sowie einen erhöhten IGF1-Gehalt im Plasma beobachtet (Shen et al., 2004a).

Unter *in vitro*-Bedingungen wurde nach Inkubation mit IGF1 (25-50 µg/L) neben zellproliferativen Effekten eine gesteigerte DNA-Synthese an kultivierten Pansenepithelzellen festgestellt (Shen et al., 2004b).

Neben dem insulin-like growth factor 1 existiert ein weiteres epidermisspezifisches Wachstumshormon, das epidermale Wachstumshormon (EGF). BALDWIN (1999) konnte die positive Einflussnahme von EGF auf das Zellwachstum von Pansenepithelzellen bereits nachweisen (Baldwin, 1999).

DONOWITZ et al. (2000) beobachteten die positive Einflussnahme von EGF auf das Vorkommen von NHE3 in Caco2 Zellen. In Anwesenheit von EGF wird hierbei eine gesteigerte Expression des Natrium-Protonen-Austauschers 3 festgestellt (Donowitz et al., 2000).

In den hier durchgeführten *in vitro*-Versuchen wurde gemäß den Literaturangaben dem Erhaltungsmedium IGF1 als auch EGF in einer Konzentration von 2 ng/ml zugefügt.

1.3.4.4 cyclisches Adenosin-Monophosphat (cAMP)

cAMP ist als intrazellulärer Botenstoff an zahlreichen Reaktionen beteiligt. In der Regel kommt es nach der Bindung eines Liganden (Hormone) an einen spezifischen Rezeptor über ein G-Protein zur Aktivierung des Adenylatcyclasesystems und somit zu einer vermehrten intrazellulären Bereitstellung von cAMP, welches seinerseits an eine Proteinkinase bindet und diese aktiviert. Die Proteinkinase gibt anschließend 2 katalytische Untereinheiten frei, die die Phosphorylierung zellulärer Proteine (Enzyme, etc.) katalysiert. Die phosphorylierten Proteine bewirken die Änderung der Zellfunktion und damit die physiologische Antwort auf das Signal des Liganden. Durch diese Reaktion kann das Signal, das vom Liganden ausgeht, amplifiziert werden (Engelhardt et al., 2000).

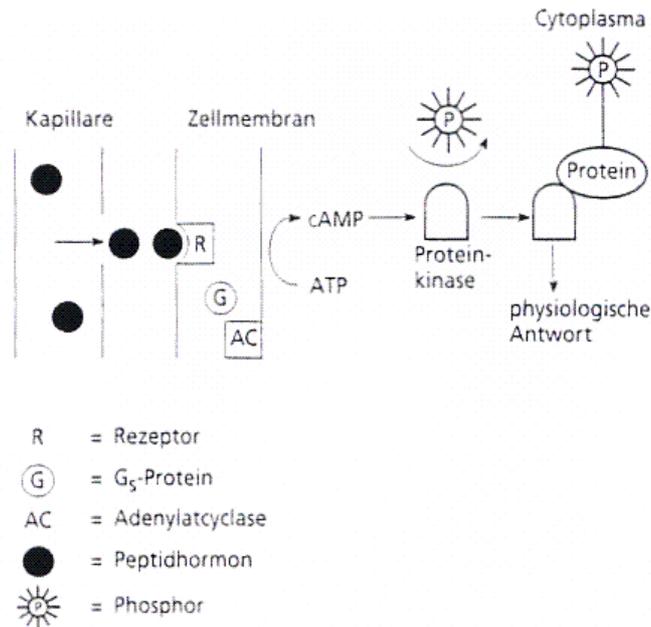


Abbildung 7 Graphische Darstellung der Wirkungsweise des cyclischen Adenosinmonophosphates. Aus: W.V. Engelhard, G. Breves, „Physiologie der Haustiere“, 1. Auflage, Enke Verlag, 2000.

Entsprechend verschiedener Studien kann die inhibitorische Wirkung der cAMP-abhängigen Proteinkinase auf die Aktivität des apikalen Natrium-Protonen-Austauschers sowie der basolateralen Na⁺/K⁺-ATPase bestätigt werden (Reuss et al., 1985; Weinman et al., 1987; Noel, 1995; Yun, 1997). Auch GÄBEL et al. (1999) sowie WOLFFRAM et al. (1989) haben nachgewiesen, daß eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an cAMP sowohl die Natrium- als auch die Chloridresorption hemmt (Wolffram et al., 1989; Gäbel et al., 1999).

Im Gegensatz dazu wird NHE1 an der basolateralen Membran verschiedener Zelltypen über cAMP aktiviert (Kandasamy et al., 1995; Cabado et al., 1996).

In den hier durchgeführten *in vitro*-Versuchen an PEZ wurde dem Erhaltungsmedium di-Butyl-cAMP in einer Konzentration von 25 µM, 50 µM, 75 µM und 100 µM zugefügt.

1.3.4.5 Prostaglandin E2 (PGE2)

Prostaglandin E2 ist ein Gewebshormon, das über den Cyclooxygenase-Weg aus Arachidonsäure gebildet wird. Wie unter 1.3.4.3.2. beschrieben, wird die Wirkung von Hormonen über spezifische Rezeptorbindungen in der Zellmembran vermittelt. Hierdurch wird das Adenylatcyclasesystem aktiviert, das über die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration die Phosphorylierung durch Proteinkinasen anregt (Lawson et al., 1987; Boettcher, 2000). Es ist bekannt, daß der NHE1 über die Proteinkinase aktiviert wird (Tse et al., 1993), der NHE3 jedoch über die Proteinkinase gehemmt wird (Bookstein et al., 1999).

Prostaglandine werden in verschiedenen Zellen der Wand des Gastrointestinaltraktes gebildet (Lawson et al., 1987) und gelten als externe Trigger der cAMP-Freisetzung im gastrointestinalen Gewebe (Clarke et al., 1990).

GÄBEL et al. (1999) haben den zu erwartenden inhibitorischen Effekt des Prostaglandins E2 auf den Natriumtransport in ihren *in vitro*-Versuchen bereits nachgewiesen (Gäbel et al., 1999).

In den hier durchgeführten *in vitro*-Versuchen wurde dem Erhaltungsmedium Prostaglandin E2 in einer Konzentration von 100 nM zugefügt.

1.3.5 Übersicht zu den biochemischen und molekularbiologischen Charakteristika der einzelnen Transporter

1.3.5.1 Der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE)

Die Natrium-Protonen-Austauscher-Genfamilie zeigt sich funktionell einheitlich. Sämtliche Natrium-Protonen-Austauscher führen Natrium in die Zelle ein und Protonen aus der Zelle aus. Hierbei liegt ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 vor. Dieses Verhalten beeinflusst neben der intrazellulären pH-Homöostase den elektroneutralen Natriumchloridtransport an Epithelzellen und kontrolliert das Zellvolumen (Brant et al., 1995; Hayashi et al., 2002).

Die Aktivität der Natrium-Protonen-Austauscher wird durch zahlreiche Signale, wie zum Beispiel Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren, Peptidhormone, cAMP, chemotaktische Reize, osmotische Verhältnisse, pH-Verhältnisse sowie Glucocorticoide und Schilddrüsenhormone beeinflusst (Kandasamy et al., 1996).

Die NHE-Proteine setzen sich aus einem N-terminalen Ende, das etwa 12-mal die Zellmembran durchläuft und den eigentlichen Kationentransfer ermöglicht, und einem C-terminalen Ende, das die Aktivität des Transporters über Interaktion mit der Proteinkinase sowie anderen regulatorischen Einflussfaktoren vermittelt, zusammen (Burckhardt et al., 2002).

Das Protein besitzt eine Größe zwischen 81 und 93 kDa und erscheint in der Membran als Homodimer (Kandasamy et al., 1996).

Das N-terminale Ende setzt sich aus etwa 500 Aminosäuren, das C-terminale Ende aus ungefähr 300 Aminosäuren zusammen. Man geht von einer 40-60 %-igen Übereinstimmung dieser Daten bei sämtlichen Isoformen aus (Cavet et al., 1999).

Der Natrium-Protonen-Austauscher vereint 9 Subtypen (NHE1-9) beziehungsweise Isoformen, die entsprechend ihrer unterschiedlichen biochemischen und pharmakologischen Charakteristika sowie ihrer zahlreichen physiologischen Funktionen unterschieden werden (Zachos et al., 2005).

NHE1:

Der Natrium-Protonen-Austauscher 1 zeigt ein ubiquitäres Vorkommen und wird primär an der basolateralen Membran von Epithelzellen exprimiert.

Eine Aktivierung des NHE1 kann durch Wachstumsfaktoren, Proteinkinasen, Zugabe von Serum, hyperosmolare Zustände, cAMP sowie extra- und intrazelluläre Ionen (Na^+_{ez} , H^+_{iz} , $\text{Ca}^{2+}_{\text{iz}}$) erfolgen. Ein ATP-Mangel führt zur Hemmung der NHE1-Aktivität. Sämtliche Subtypen der Natrium-Protonen-Austauscher (mit Ausnahme des NHE2) lassen sich durch Amilorid und dessen Analoga blockieren; so auch der NHE1 (Park et al., 1999).

NHE2:

Der Nachweis des Natrium-Protonen-Austauschers 2 wurde im Bereich des Gastrointestinaltraktes, in der Niere sowie im Uterus erbracht. An der Skelettmuskulatur, der Trachea und der Leber hingegen tritt der NHE2 nur vereinzelt auf. Er wird vor allem an der apikalen Membran der Epithelzellen exprimiert und lässt sich mit Ausnahme von cAMP durch die gleichen Stimulatoren wie auch NHE1 aktivieren. Auch hier kann eine Hemmung der Aktivität bei Vorliegen azidotischer Zustände, ATP-Mangel sowie während eines erhöhten intrazellulären Gehaltes an cAMP und Ca^{2+} beobachtet werden (Kandasamy et al., 1996; Bookstein et al., 1999; Boettcher, 2000). Im Gegensatz zum NHE1, konnte eine Hemmung der NHE2-Aktivität an der Kaninchenniere unter hyperosmolaren Verhältnissen festgestellt werden. Eine Blockierung des NHE2 durch Amilorid-Analoga wurde nicht beobachtet.

NHE3:

Der Natrium-Protonen-Austauscher 3 zeigt ein Vorkommen an Niere, Magen und Darm und wird ausschließlich an der apikalen Membran exprimiert. Neben Wachstumsfaktoren, Zugabe von Serum, azidotischen Zuständen sowie extra- und intrazellulärer Akkumulation von Ionen (Na^+_{ez} , H^+_{iz}) wurde eine Aktivierung auch durch Glucocorticoide beobachtet (Kandasamy et al., 1996; Lucioni et al., 2002). Der Austauscher lässt sich durch Amilorid und dessen Analoga blockieren und seine Aktivität wird durch ATP-Mangel, Hyperosmolarität und einen erhöhten intrazellulären Spiegel an cAMP und Ca^{2+} gehemmt (Bookstein et al., 1999; Doble et al., 2000).

Der Nachweis eines inhibitorischen Effektes des Fibroblasten-Wachstums Faktor (= fibroblast growth factor) auf die NHE3-Aktivität konnte bisher ausschließlich an humanem Gewebe erbracht werden (Brant et al., 1995).

Entsprechend der Untersuchungen von KANDASAMY et al. (1996) umfasst das NHE3-Gen mehr als 40 Kilobasen und enthält 17 Exons. Während Exon 1-7 (etwa 453 Aminosäuren) die N-terminale transmembrane Region codieren, codieren Exon 8 und 9 (etwa 50 Aminosäuren) die C-terminale zytoplasmatische Region. Ferner zeigt das N-terminale

Segment eine hohe Aminosäurehomologie im Vergleich von Ratte und Mensch (~55-95 %), während das C-terminale Segment nur eine minimale Aminosäureidentität (~25-35 %) erkennen lässt (Kandasamy et al., 1996).

NHE4:

Der Natrium-Protonen-Austauscher 4 wurde bisher nur unzureichend untersucht. Über seine Lage in den Epithelzellen ist bislang nichts bekannt. Man konnte jedoch bereits seine Aktivierung unter hyperosmolaren Verhältnissen beobachten sowie feststellen, daß unter ATP-Mangel eine Hemmung der Aktivität auftritt (Wakabayashi et al., 1997).

NHE5 und NHE6:

Das Vorkommen, die Funktion und die Regulation der Natrium-Protonen-Austauscher 5 und 6 sind bislang nahezu unbekannt (Burckhardt et al., 2002).

Entsprechend einer Veröffentlichung von PARK et al. (1999) ist jedoch bekannt, daß es sich bei dem Natrium-Protonen-Austauscher 5 um einen nicht epithelial lokalisierten Transporter, bei dem Natrium-Protonen-Austauscher 6 um einen mitochondrialen Austauscher handelt (Park et al., 1999).

NHE7-9:

Bezüglich des Vorkommens, der Funktion und Regulation der Natrium-Protonen-Austauscher 7-9 stehen bislang nur wenige Veröffentlichungen zur Verfügung. Entsprechend der Publikation von ZACHOS et al. aus dem Jahr 2004 kann von einer Expression der genannten Transportproteine im Bereich des Gastrointestinaltraktes ausgegangen werden. Während das Vorkommen von NHE7 im Gastrointestinaltrakt, im Pankreas, in der Leber als auch in der Gallenblase im trans-Golgi-Netzwerk als erwiesen gilt, wird dieses für NHE8 und 9 bisher nur vermutet. So konnte NHE8 an der apikalen Membran der Nierenrinde (Ratte) und der Leber (Maus) nachgewiesen werden. Ferner wird angenommen, daß NHE8 ubiquitär expremiert wird. Die zelluläre Lokalisation von NHE9 ist bislang unbekannt (Zachos et al., 2005).

1.3.5.2 Der Anionenaustauscher (AE)

Zur Gruppe der Bicarbonattransporter zählen 2 Genfamilien: SLC 4 und SLC 26. Die Genfamilie SLC 4 lässt sich wie folgt untergliedern:

- 3 Natrium-unabhängige Anionenaustauscher = SLC 4 A 1-3 = AE1-3
- 2 Natrium-abhängige Anionenaustauscher = SLC 4 A 8 und SLC 4 A 10
- 3 Natrium-Bicarbonat-Kotransporter = SLC 4 A 4 = NBC e 1, SLC 4 A 7 = NBC n 1, NBC 4 = NBC e 2

Die Genfamilie SLC 26 lässt sich wie folgt untergliedern:

- Chlorid-Bicarbonat-Austauscher = SLC 26 A 3 = DRA (downregulated Adenoma)
- Sulfat-Oxalat-Bicarbonat-Austauscher = SLC 26 A 2 (DTD)
- Chlorid-Iodid-Format-Bicarbonat-Austauscher = SLC 26 A 4 = Pendrin
- Chlorid-Format-Bicarbonat-Austauscher = CFEX (nur beim Schaf)
- Chlorid-Format-Bicarbonat-Austauscher = SLC 26 A 6 = PAT 1 (nur beim Menschen)

Die Anionenaustauscher 1-3 (AE1-3) gehören innerhalb der Genfamilie SLC 4 zu der Gruppe der natriumunabhängigen Anionenaustauscher.

Alle Anionenaustauscher weisen eine cytoplasmatische, hydrophile N-terminale Domäne auf, die mit verschiedenen Membranproteinen sowie cytoplasmatischen Proteinen interagiert und eine transmembrane, hydrophobe C-terminale Domäne auf, die den eigentlichen Anionentransfer ermöglicht. Die Lokalisation der Transporter ist der Tabelle 1 zu entnehmen:

Tabelle 1 Lokalisation verschiedener Vertreter der Familie der Anionenaustauscher

Transporter	Vorkommen
AE1	
kAE1	basolaterale Membran der ICC vom Typ A am Sammelrohr der Niere
eAE1	Erythrozyten Herz, Colon
AE2	parietale Zellen des Magens, epitheliale Zellen des Plexus chorioideus, Oberfläche der Colonenterozyten, Zellen der aufsteigenden Henelschen Schleife der Niere, polarisierte Epithelzellen zeigen die AE2-Expression an der basolateralen Seite, in einigen Fällen konnte AE2 jedoch auch an der apikalen Membran nachgewiesen werden (z.B. Colon, Duodenum), entsprechend verschiedener N-terminaler Enden unterscheidet man: AE2a, AE2b1, AE2b2, AE2c1, AE2c2
AE3	
bAE3	Gehirn
cAE3	Herz Retina, Muskulatur, Darm, Niere
AE4	ICC am Sammelrohr der Niere, Kaninchen: Typ A der ICC, Ratte: Typ B der ICC
SLC26A3	Dick- und Dünndarm
SLC26A4	Niere
SLC26A6	Dünn- und Dickdarm, Magen, Niere, Herz
SLC26A7	Magen, Niere, parietale Zellen des Magens

Die wesentlichsten Stoffwechselprodukte des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels sind Kohlendioxid und Hydrogencarbonat. Sie stellen das große Puffersystem des Organismus dar. Durch die Funktion von Protonen- und Bicarbonataustauschern und deren transepitheliale Säure-Base-Austausch werden das intrazelluläre Volumen sowie der intrazelluläre pH-Wert konstant gehalten.

Anionenaustauscher transferieren monovalente Anionen elektroneutral, das heißt natriumunabhängig. Das Anion bindet hierbei an die Oberfläche der AE und induziert hierdurch eine Konformationsänderung, welche die Translokation über die Lipiddoppelmembran ermöglicht. Anschließend wird das Anion an der entsprechenden Seite abgekoppelt, so daß der Anionenaustauscher für einen reversen Transportprozess zur Verfügung steht.

Entsprechend FEJES-TOTH et al. (1994) findet an der basolateralen Membran der intercalated cells (ICC) vom Typ A der Niere die Hydrogencarbonatresorption über den AE1 statt. Am Typ B der ICC der Niere findet hingegen die Hydrogencarbonatsekretion über den AE1 an der apikalen Membran statt, wobei der AE1-Gehalt (mRNA) an den ICC vom Typ A überwiegt. Liegt eine Azidose vor, so kommt es zur „Up-Regulation“ des AE1; bei einer Alkalose hingegen zu einer „Down-Regulation“ (Fejes-Toth et al., 1994).

Nach RAJENDRAN et al. (2000) findet der elektroneutrale Natriumchloridtransport und die damit verbundene intrazelluläre Regulation des pH-Wertes über 2 Transportsysteme statt: die Natrium-Protonen-Austauscher 1-3, den Chlorid-Bicarbonataustauscher, sowie die Anionenaustauscher 1-3. Ihre Untersuchungen am Rattencolon ergaben, daß der auf der basolateralen Seite lokalisierte NHE1 für die pH-Homeostase verantwortlich ist, während die an der apikalen Membran lokalisierten NHE2 und 3 die Natriumresorption gewährleisten.

Die Isoformen AE1-3 übernehmen an der apikalen Membran die Funktion des Chlorid-Bicarbonat-Austauschers und gewährleisten den gerichteten Transport von Chlorid und Hydrogencarbonat, während der Cl⁻/OH⁻-Austauscher (zum Beispiel: DRA) für die Aufrechterhaltung intrazellulärer Funktionen (zum Beispiel: Konstanthaltung des pH-Wertes) verantwortlich ist (Rajendran et al., 2000).

Entsprechend der von RAJENDRAN et al. (2000) durchgeführten Versuche am Rattencolon konnte eine „Down-Regulation“ des aldosteronabhängigen Chlorid-Bicarbonat-Austauschers AE1 nach einer natriumarmen Diät festgestellt werden. Der aldosteronunabhängige Chlorid-Bicarbonat-Austauscher DRA hingegen zeigt nach einer natriumarmen Diät keine Veränderungen hinsichtlich seines Auftretens (Rajendran et al., 2000).

ALPER et al. (2002) konnten an den ICC adulter Organismen beobachten, daß sowohl eine akute metabolische Azidose als auch eine chronisch-metabolische Azidose zu einer „Up-Regulation“ des AE1 führt. Ferner konnte dieses nach dem Auftreten einer chronisch-

respiratorischen Azidose, aber auch nach einer akuten metabolischen Alkalose festgestellt werden.

Untersuchungen am distalen Colon zeigen die „Up-Regulation“ des AE1 nach Aldosteroneinwirkung (Alper et al., 2002).

SABOLIC et al. untersuchten bereits 1997 das Vorkommen des AE1 an den ICC des Sammelrohrs der Rattenniere genauer. Hierbei stellten sie fest, daß es sich im Falle einer metabolischen Azidose um die „Up-Regulation“ des apikal lokalisierten AE1 in den ICC vom Typ A handelt. Der basolateral lokalisierte AE1 der ICC vom Typ B hingegen zeigt eine deutliche „Down-Regulation“. Beim Auftreten einer metabolischen Alkalose kommt es zu umgekehrten Verhältnissen (Sabolic et al., 1997).

Entsprechend der Veröffentlichung von PETROVIC et al. aus dem Jahr 2003 gewährleistet der AE2 an der basolateralen Seite der parietalen Zellen des Magens den Austausch von Hydrogencarbonat und Chlorid. Hierbei wird Bicarbonat im Austausch gegen Chlorid nach extrazellulär verbracht, während Chlorid mit Protonen intrazellulär zu Salzsäure verstoffwechselt wird und anschließend über die apikale Membran nach extrazellulär in das Magenlumen abgegeben wird (Petrovic et al., 2003).

Am Dünndarm der Ratte konnten peripartale Veränderung hinsichtlich des Auftretens von AE 2 beobachtet werden. Postnatal kommt es zur „Up-Regulation“, während es nach dem Absetzen der Neugeborenen zur „Down-Regulation“ kommt. Weiterhin konnte ein reduziertes Vorkommen nach Tyroxingaben (Schilddrüsenhormon) festgestellt werden.

An Zellen des Rattenherzens konnte postnatal ein vermindertes Auftreten des AE3 beobachtet werden (Alper et al., 2002).

1.3.5.3 Der Natrium-Bicarbonat-Kotransporter (NBC)

Der Natrium-Bikarbonat-Kotransporter wird aufgrund seiner funktionellen und strukturellen Ähnlichkeit zur Familie der Anionenaustauscher gezählt.

Nach ROMERO et al. (1997/1998) und BURNHAM et al. (1997) besteht auf Aminosäureebene eine 35 %-ige Homologie zu den Anionenaustauschern 1-3. Die Homologie auf Aminosäureebene von NBC verschiedener Spezies liegt jedoch über 35 % (Burnham et al., 1997; Romero et al., 1997; Romero et al., 1998).

Hinsichtlich der Einteilung der Transporter, die zur Familie der Natrium-Bikarbonat-Kotransporter gezählt werden, lassen sich unterschiedliche Angaben in der Literatur finden.

ROMERO et al. (1997/1998) unterteilen die Familie der Bikarbonat-Kotransporter folgendermaßen:

- natriumunabhängiger Chlorid-Bikarbonat-Austauscher

- natriumabhängiger Chlorid-Bikarbonat-Austauscher
- Natrium-Bikarbonat-Kotransporter (3 Isoformen)
- Kalium-Bikarbonat-Kotransporter

(Romero et al., 1997; Romero et al., 1998).

KURTZ (1989) hingegen unterscheidet die verschiedenen Anionenaustauscher und Natrium-Bikarbonat-Kotransporter folgendermaßen:

- NBC = natriumabhängiger Säuren-Basentransporter, Natrium-Basen-Kotransporter, Stilbene-sensitiv
- AE = NaCL-unabhängiger Säuren-Basentransporter, Natrium-Protonen-Antiporter, Amylorid-sensitiv

(Kurtz, 1989).

Tabelle 2 Lokalisation und Struktur des Natrium-Bikarbonat-Kotransporters (Kurtz, 1989; Burnham et al., 1997; Romero et al., 1997; Abuladze et al., 1998; Amlal et al., 1998; Romero et al., 1998; Choi et al., 1999). Funktionell gewährleisten sämtliche Natrium-Bikarbonat-Kotransporter die Regulation des intrazellulären pH-Wertes.

Transporter	Vorkommen	Struktur
NBC	apikale und baslaterale Membran der Azinus- und Ductulizellen des Pankreas	Expression eines Proteins, das aus 1079 Aminosäuren besteht, setzt sich aus 12 transmembranen Segmenten zusammen, besitzt hydrophile, intrazelluläre C-terminale als auch N-terminale Segmente
NBC	basolaterale Membran der Epithelzellen der proximalen Tubuli der Niere	Expression eines Proteins, das aus 1035 Aminosäuren besteht, mit einer molekularen Masse von 116 kDa, das C-terminale und N-terminale Ende liegt vermutlich intrazellulär, besitzt 10 membranintegrierte Segmente, die Lysinreste stellen den DIDS-reaktiven Bereich dar
NBC	basolaterale Membran der Zellen des Herzens	Expression eines Proteins, das aus 1079 Aminosäuren besteht, mit einer molekularen Masse von 121 kDa
NBC	Gehirn, Milz, Leber, Prostata, Nebenhoden, Dünn- und Dickdarm/Colon, Magen, Schilddrüse, Rückenmark	

In der Niere wird Natriumbicarbonat, das als Glomerulumfiltrat die proximalen Tubuli passiert, an der apikalen Membran reabsorbiert, um an der basolateralen Seite an das Blut abgegeben zu werden. Dieses dient der Konstanthaltung des pH-Wertes und somit der Vermeidung einer metabolischen Azidose (Choi et al., 1999).

Über verschiedene Transportmechanismen (NHE, Na-Glc-Kotransporter) wird das im Tubuluslumen befindliche Natrium reabsorbiert und gelangt basolateral über den Natrium-Bicarbonat-Kotransporter oder die Natrium-Kalium-Pumpe nach extrazellulär. Über den NHE (Natrium-Protonen-austauscher) oder die vHATPase an der apikalen Membran werden Protonen nach extrazellulär ins Tubuluslumen sezerniert. Da Bicarbonat per se nicht reabsorbiert werden kann, verbindet es sich mit den Protonen zu Kohlensäure und wird über die Carboanhydrase 4 zu Wasser und Kohlendioxid verstoffwechselt. Beide Metaboliten können nun von den Tubuluszellen reabsorbiert werden und unterliegen intrazellulär der Verstoffwechslung durch die Carboanhydrase 2. Die CAH2 katalysiert die Verstoffwechslung zu Protonen und Bicarbonat. Während die Protonen wiederum die Zellen über den NHE Richtung Tubuluslumen verlassen, wird das Bicarbonat unter anderem über den NBC, zusammen mit Natrium nach extrazellulär ins Blut verbracht (Amlal et al., 1998; Romero et al., 1998).

Nach BURNHAM et al. (1997) scheint der Bicarbonatfluß im Colon ebenfalls blutwärts gerichtet zu sein (Burnham et al., 1997).

Der Natrium-Bikarbonat-Kotransporter zeigt neben der Abhängigkeit von Natrium eine Abhängigkeit von Bikarbonat. Eine Chloridabhängigkeit des Transporters ist nicht gegeben (Abuladze et al., 1998).

Stilbene/DIDS gleichen in ihren Wirkungsmechanismen denen natürlicher Östrogene und führen über einen kompetitiven Verdrängungsmechanismus an der Bikarbonatbindungsstelle zur Hemmung des NBC (Amlal et al., 1998). Ebenso kommt es zur Hemmung des NBC durch einen kompetitiven Verdrängungsmechanismus an der Natriumbindungsstelle durch Harmaline (Amlal et al., 1998).

Eine Hemmung des NBC durch cAMP sowie durch die cAMP-abhängige Proteinkinase C konnte ausschließlich an der Niere beobachtet werden. Am Pankreas hingegen kommt es zur Stimulation der Bikarbonatsekretion nach cAMP-Einwirkung (Abuladze et al., 1998).

1.3.5.4 Die vakuolären Protonen-ATPasen B und E

Die vakuoläre Protonen-ATPase stellt einen Komplex verschiedener Subunits dar und bildet 2 hierdurch funktionell unterschiedliche Domänen:

- die extrazelluläre, katalysierende Domäne V1, die die ATP-Hydrolyse gewährleistet

- die transmembrane Protonentranslokationsdomäne V0, die den eigentlichen Protonentransfer vornimmt (Bernasconi et al., 1990; Graham et al., 2000)

Die V1-Domäne ihrerseits gliedert sich in weitere 8 Subunits (Polypeptide):

- Subunit A = Gen: VM A1, 69 kDa, ATP-bindende katalytische Subunit
- Subunit B = Gen: VM A2, 60 kDa, ATP-bindende katalytische Subunit, Regulation der Aktivität der vHATPase
- Subunit C = Gen: VM A5, 42 kDa
- Subunit D = Gen: VM A 8, interagiert mit VM A7
- Subunit E = Gen: VM A4, 28 kDa, interagiert mit VM A10
- Subunit F = Gen: VM A7, 14 kDa, interagiert mit VM A8
- Subunit G = Gen: VM A10, 16 kDa, stabilisiert VM A4
- Subunit H = Gen: VM A13, 54 kDa, aktiviert die vHATPase

(Graham et al., 2000).

Die V0-Domäne ihrerseits gliedert sich in folgende Untereinheiten:

- Subunit a = Gen: VPH 1, 100 kDa, vakuolenspezifisch
- Subunit b = Gen: VMA 3, 16,5 kDa, „proton – translocating proteopeptid“
- Subunit c = Gen: VMA 3
- Subunit c` = Gen: VMA 11, 17 kDa, Proteolipid, VMA 3 – ähnlich
- Subunit c`` = Gen: VMA 16, 23 kDa, Proteolipid, VMA 3 – ähnlich
- Subunit d = Gen: VMA 6, 36 kDa, hydrophil

Ferner konnten die Isoform: STV 1 (100 kDa) und folgende assembly factors: VMA 12 (25 kDa), VMA 21 (8,5 kDa), VMA 22 (21 kDa) identifiziert werden (Graham et al., 2000).

Innerhalb der Subunit B lassen sich 2 Isoformen differenzieren: I = Nierenisoform (vor allem in der Niere lokalisiert) und II = Gehirnisiform (in verschiedenen Geweben lokalisiert). In einigen Fällen wird die Nierenform auch als B1-Typ und die Gehirnisiform als B2-Typ bezeichnet (Bernasconi et al., 1990).

Die B-Subunit konnte in allen Geweben nachgewiesen werden, in denen die vHATPase exprimiert wurde (Puopolo et al., 1992).

Ferner wurde beobachtet, daß die Aminosäuresequenz der B-Subunit der vHATPase große Homologien zwischen humanem und bovinem Gehirntyp (99 %) und humanem und bovinem Nierentyp aufweist, wohingegen die B-Subunits der Gehirnisiform und Nierenform erhebliche

Unterschiede aufweisen (Homologien der AS-Sequenz zwischen bovinem Gehirntyp und humanem Nierentyp = 92 %). Dennoch lässt sich das Vorhandensein multipler Formen der B-Subunit in eukaryotischen Geweben nicht ausschließen (Puopolo et al., 1992).

Vergleiche der AS-Sequenz der bovinen und humanen Gehirnform, als auch der Gehirnform niederer Eukaryonten, Pflanzen und Archeabakterien zeigen signifikante Homologien innerhalb einer großen Zeitspanne der Evolution. Dieses lässt vermuten, daß es im Laufe der Evolution zunächst zur Differenzierung der Isoformen Gehirn- und Nierentyp und erst im Anschluß daran zur Aufteilung in die einzelnen Gattungen kam (Puopolo et al., 1992).

Im Rahmen verschiedener zellulärer Funktionen wurde eine Beteiligung der vakuolären Protonen-ATPase unter anderem an Vorgängen der Endozytose und des Proteinabbaus, an rezeptorvermittelten sowie intrazellulären Transportprozessen, an der Regulation des intrazellulären pH-Wertes sowie der Aufrechterhaltung des transmembranen elektrischen Gradienten, der die Antriebsquelle verschiedener Transportprozesse über die Membran gewährleistet, festgestellt (Stevens et al., 1997).

An den ICC der Sammelrohre im Nierenrindbereich von Säugetieren wurde die Expression der vHATPase nachgewiesen. Hier gewährleistet der Transporter den Protonentransport durch die apikale Membran (Stevens et al., 1997).

Im Magen-Darm-Trakt von Insekten wurde gezeigt, daß die vakuoläre HATPase für die Entstehung eines Membranpotentials verantwortlich ist, das die Abgabe von Kalium über einen Protonen-Kalium-Antiporter in das Darmlumen ermöglicht (Stevens et al., 1997).

Ferner wurde festgestellt, daß die vHATPase bei Osteoklasten im Rahmen von Knochenresorptionsvorgängen den Extrazellularraum ansäuert, wodurch die Löslichkeit der Knochenmatrix erheblich zunimmt und lytische Enzyme aktiviert werden (Bartkiewicz et al., 1995; Stevens et al., 1997).

Weiterhin konnte die Beteiligung der vakuolären Protonen-ATPase an tumorinvasiven Prozessen beobachtet werden. Tumorzellen sezernieren digestive Enzyme (lysosomale Proteasen), die die extrazelluläre Matrix zerstören und dadurch die Tumordinvasion ermöglichen. Das pH-Optimum dieser Zellen liegt im sauren Bereich. Hierdurch wird die positive Korrelation zwischen dem Aktivitätsgrad der vHATPase und dem metastatischen Potential eines Tumors deutlich (Stevens et al., 1997).