

1 Ergebnisse

1.1 Elektrophysiologische Messungen

Bei den Versuchen zur Elektrophysiologie wurde davon ausgegangen, daß durch den an Protonen gekoppelten Transport von Peptiden (hier: Glycyl-Glutamin) und peptidähnlichen Substanzen (Captopril, Cefadroxil) ein Transport von Ladungen über das Epithel stattfindet (siehe Abb.1 und 2). Dieser Ladungstransfer wäre (ist) als Änderungen des Kurzschlußstroms (I_{sc}) und der Leitfähigkeit (G_t) meßbar.

1.1.1 Heugefütterte Tiere (HF-Tiere)

Die Untersuchungen wurden zuerst an den Vormagenepithelien von Heu gefütterten Tieren vorgenommen, weil davon ausgegangen wurde, daß eine Fütterung dieser Art, verglichen mit anderen Fütterungsregimen den geringsten Einfluß auf die Transportprozesse im Epithel hat.

1.1.1.1 pH 7,4 auf der mucosalen Kammerseite

Die Epithelien wurden zuerst bei einem pH-Wert von 7,4 auf mucosaler und serosaler Seite untersucht, da ein gleicher pH-Wert auf beiden Kammerseiten den Standardbedingungen bei Untersuchungen mit der Ussing-Kammertechnik entspricht. So wird vermieden, daß durch einen Protonengradienten passive Stoffbewegungen induziert werden könnten.

1.1.1.1.1 Pansenepithel

Messung des Kurzschlußstroms (I_{sc})

In der Grafik ist der Verlauf des Kurzschlußstroms in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt (Abb.6) (Mittelwerte aller Versuche, vgl. Kap.3). Der I_{sc} -Mittelwert der Kontrollgruppe beträgt während des gesamten Meßzeitraums $1,38 \mu\text{Eq} [\cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}]$, der I_{sc} -Mittelwert der Gruppe von Glycyl-Glutamin bleibt bei $1,5 \mu\text{Eq}$ konstant. In der Gruppe von Cefadroxil ist ein Anstieg um $0,2 \mu\text{Eq}$ ca. 2 min nach Zugabe festzustellen. Der I_{sc} -Mittelwert der Gruppe, der die Substanz Captopril zugegeben wurde fällt um $0,2 \mu\text{Eq}$ am Meßzeitpunkt 2 min, steigt aber danach wieder an und ist beim Zeitpunkt 6 min auf dem Ausgangsniveau. Statistisch signifikante Veränderungen wurden bei Betrachtung der Mittelwerte nicht festgestellt.

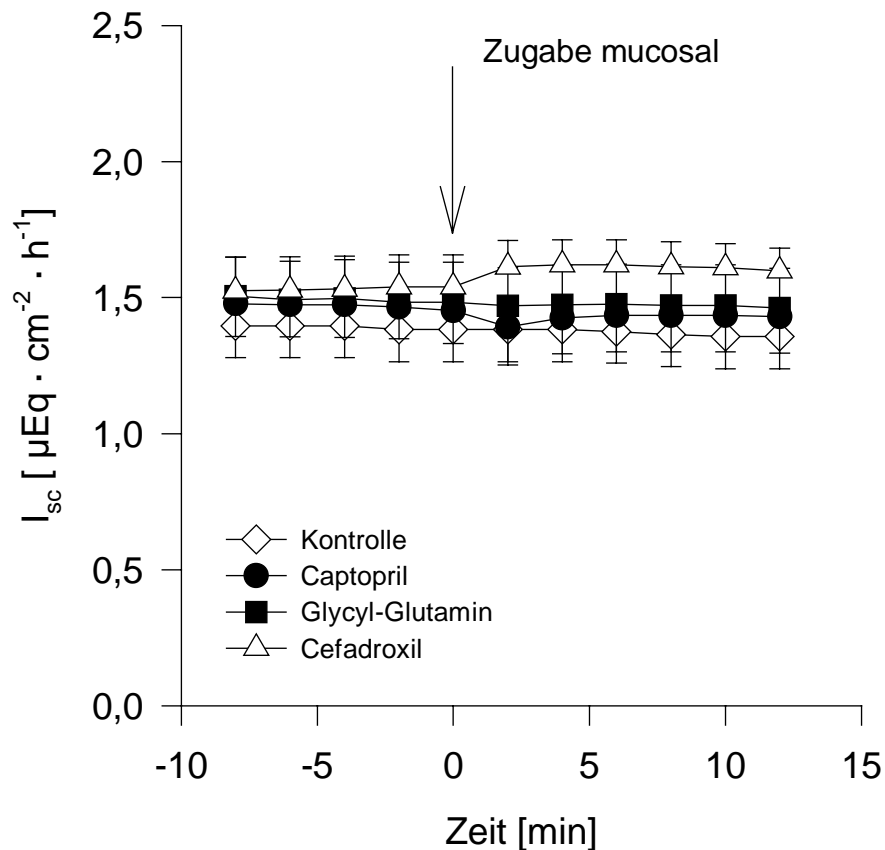


Abb. 6: Verlauf des I_{sc} am Pansenepithel (HF-Tiere), pH 7,4 mucosal (Mittelwerte und SEM).

Messung der Leitfähigkeit (G_t)

In der grafischen Darstellung der verschiedenen Leitfähigkeiten (Mittelwerte aller Versuche) ist zu erkennen, daß die G_t der Kontrollgruppe mit 3,2 mS während des gesamten Untersuchungszeitraums konstant bleibt (Abb.7). Die G_t der Gruppe von Captopril beginnt mit 3,4 mS etwas höher. Darüber liegen die Gruppen von Cefadroxil mit 3,6 und Glycyl-Glutamin mit 3,75 mS, die während des gesamten Untersuchungszeitraumes einen konstanten, leichten Abfall um ca. 0,2 mS erkennen lassen. Durch die mucosale Zugabe der verschiedenen Substanzen erfolgte keine signifikante Veränderung der G_t .

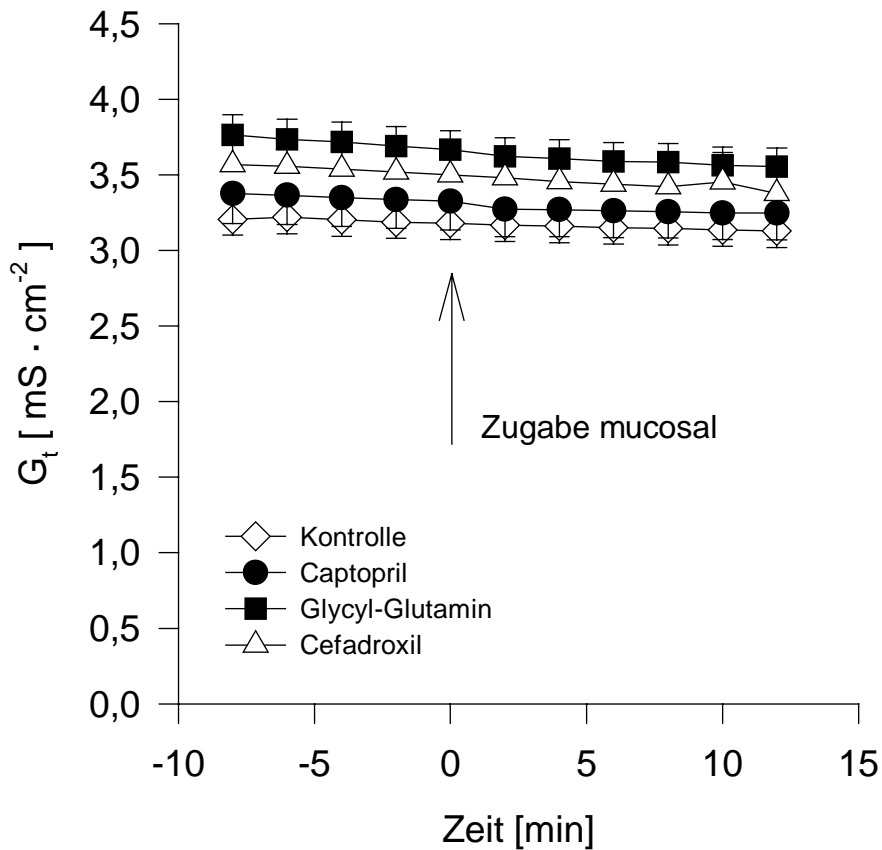


Abb. 7: Verlauf der G_t am Pansenepithel (HF-Tiere), pH 7,4 mucosal (Mittelwerte und SEM).

1.1.1.1.2 Psalterepithel

Messung des Kurzschlußstroms (I_{sc})

Der Mittelwert des am Psalterepithel gemessenen Kurzschlußstroms beträgt für die Kontrollgruppe während der gesamten Meßperiode $1,6 \mu\text{Eq}$ (Abb.8). Die gemessenen I_{sc} -Mittelwerte der anderen Gruppen liegen zwischen $1,5$ und $1,6 \mu\text{Eq}$. Sowohl vor, als auch nach Zugabe der Testsubstanzen (Zeitpunkt 0 min) weisen sie einen annähernd parallelen Verlauf zur Kontrollgruppe auf. Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen bei Betrachtung des aus sämtlichen, pro Versuchsgruppe verwendeten Epithelien, gebildeten Mittelwertes.

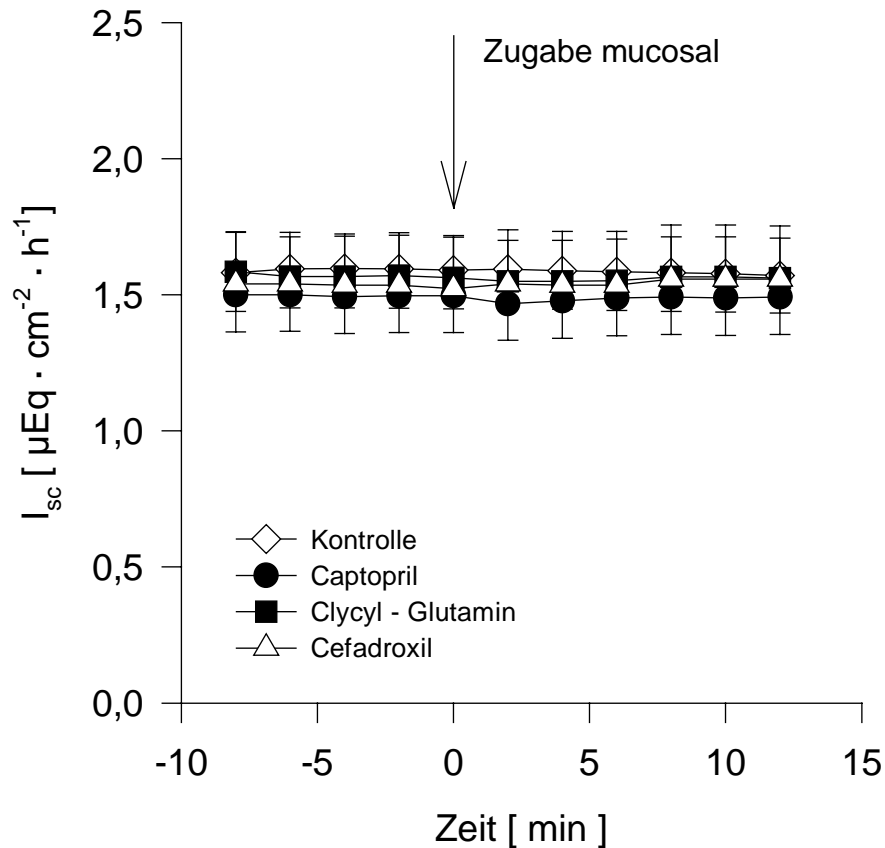


Abb. 8: Verlauf des I_{sc} am Psalterepithel (HF-Tiere), pH 7,4 mucosal (Mittelwerte und SEM)

Messung der Leitfähigkeit (G_t)

Die Mittelwerte für die Leitfähigkeiten rangieren zwischen 2,7 und 3,4 mS [$\cdot \text{cm}^{-2}$] (Abb.9). Dabei besitzt die Gruppe von Glycyl-Glutamin die niedrigsten Mittelwerte, die Kontrollgruppe die höchsten und die Gruppen von Cefadroxil und Captopril bewegen sich mit Mittelwerten um 3,0 mS in der Mitte. Die mittlere Leitfähigkeit der Kontrollgruppe zeigt 2 min nach dem Nullzeitpunkt, an dem bei den anderen Gruppen die Substanzzugabe erfolgte, einen leichten Abfall um 0,2 mS, befindet sich aber am Meßzeitpunkt 4 min (nach Zugabe) wieder auf dem vorherigen Niveau.

Die Gruppen von Captopril und Glycyl-Glutamin fallen während des gesamten Meßzeitraums im Mittel gleichmäßig um insgesamt 0,2 mS. Cefadroxil bleibt während des gesamten Zeitraums ungefähr auf dem Ausgangsniveau. Die Mittelwerte der G_t veränderten sich nicht in Abhängigkeit von der Substanzzugabe.

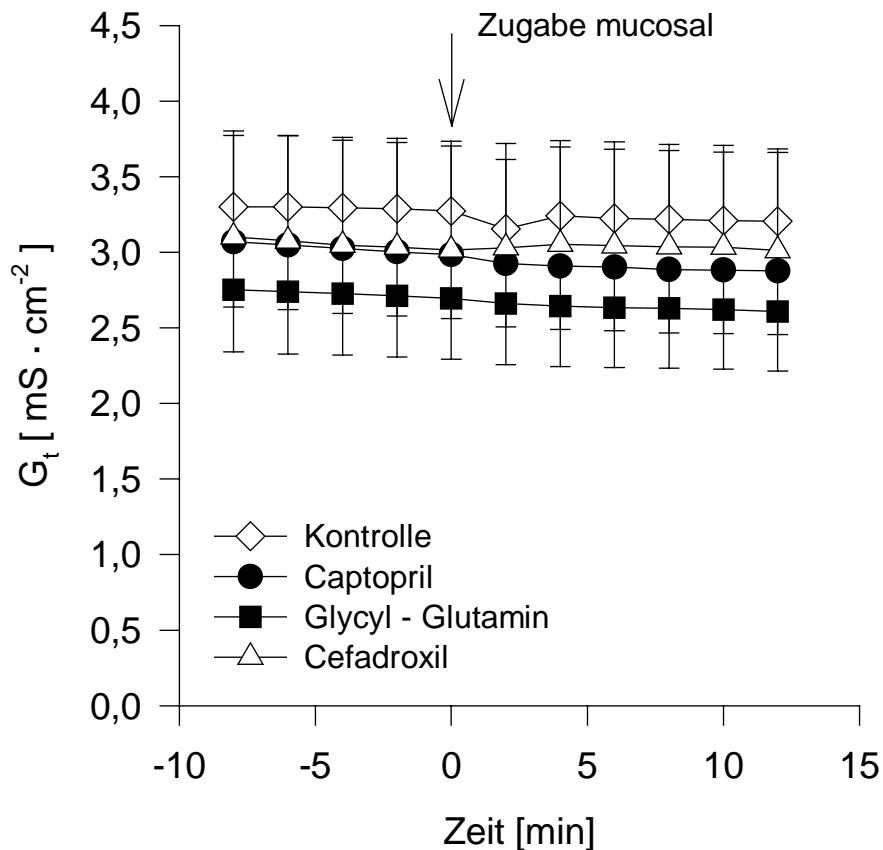


Abb. 9: Verlauf der Gt am Psalterepithel (HF-Tiere), pH 7,4 mucosal (Mittelwert und SEM)

Aufgrund des komplexen Versuchsaufbaus ergab sich die Notwendigkeit über den Vergleich der aus den Epithelgruppen aller Versuche errechneten Mittelwerte hinaus genauere Analysen durchzuführen. In das statistische Modell wurden mögliche Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen, innerhalb der Epithelien, die von einem Tier stammen, sowie Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren einbezogen (Vgl. Kap. 3).

In Abb. 10 ist die Differenz des Kurzschlußstroms I_{sc} zwischen dem Zugabezeitpunkt (Zeitpunkt 0 min) und 2 min nach Zugabe grafisch dargestellt. Jedes Einzelsymbol steht hierbei für jeweils ein Einzelepithel. Gleiche Symbole zeigen die Zugehörigkeit der Epithelien zu jeweils einem Versuchstier an.

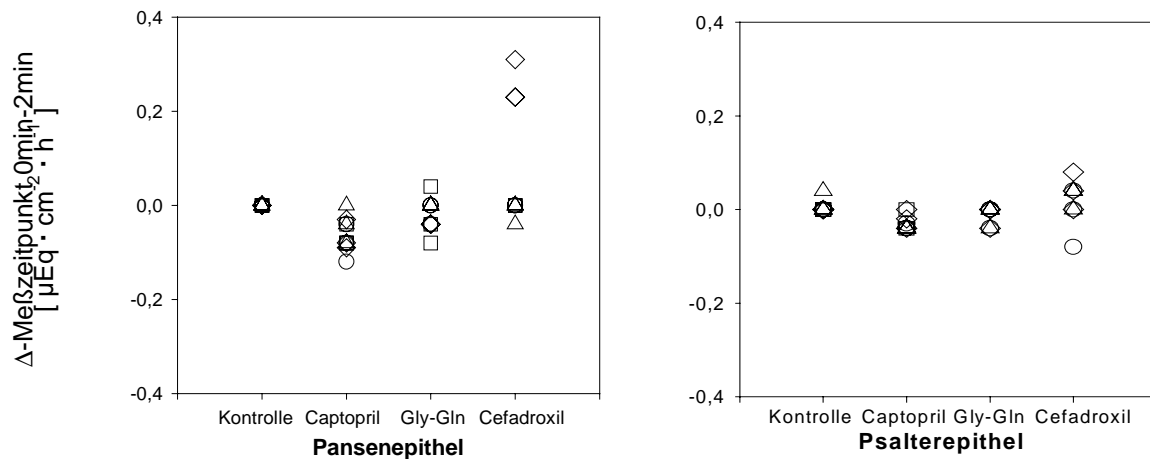


Abb. 10: Veränderung des Isc zwischen Zugabe (0 min) und Meßzeitpunkt 2min am Pansenepithel und Psalterepithel (HF-Tiere), pH 7,4 mucosal.

Pansenepithel: Die aus jeweils drei Epithelien bestehenden Behandlungsgruppen (Kontrolle, Captopril, Glycyl-Glutamin und Cefadroxil) der Versuchstiere weichen nicht signifikant voneinander ab ($p=0,566$). Auch im Vergleich der Epithelgruppen von Versuchstier zu Versuchstier sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen ($p=0,174$). Aus der grafischen Darstellung wird ersichtlich, daß sich fast alle Werte um $0,0 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ bewegen.

Psalterepithel: Die Behandlungsgruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede ($p=0,380$). Der größte Teil der errechneten Werte liegt um $0,0 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Zwischen den Versuchstieren sind signifikante Unterschiede zu erkennen ($p=0,015$), die sich durch eine sehr geringe Rest-Streuung verglichen mit einer relativ starken Abweichung von zwei Epithelien der Behandlungsgruppe Cefadroxil zu erklären lassen.

1.1.1.2 pH 6,4 auf der mucosalen Kammerseite

In einem zweiten Versuchsansatz wurde der pH-Wert der mucosalen Seite auf 6,4 abgesenkt, und somit die Konzentration an Protonen erhöht. Da der in das Zellinnere gerichtete Protonengradient neben dem elektrischen Potential der Zellmembran (Zellinneres negativ) eine der Triebkräfte des Peptidtransporters darstellt, wird durch eine Erhöhung des Gradienten die Triebkraft des Transportprozesses verstärkt.

1.1.1.2.1 Pansenepithel

Messung des Kurzschlußstroms (I_{sc})

Der I_{sc} Mittelwert der Kontrollgruppe liegt während des gesamten Meßzeitraums bei ungefähr 1,15 μ Eq. Nahezu deckungsgleich dazu verlaufen die mittleren Kurzschlußströme von Cefadroxil, Glycyl-Glutamin und Captopril (Abb.11).

Messung der Leitfähigkeit (G_t)

Die Mittelwerte der Leitfähigkeiten aller Gruppen liegen zwischen 2,3 und 2,7 mS und bleiben während des gesamten Meßzeitraums auf dem Ausgangsniveau ohne (signifikante) Veränderungen (Abb.11).

1.1.1.2.2 Psalterepithel

An Psalterepithelien wurden ebenfalls Messungen von Kurzschlußstrom und Leitfähigkeit bei einem pH-Wert von 6,4 auf der mucosalen Seite durchgeführt.

Messung des Kurzschlußstroms (I_{sc})

Die Mittelwerte der I_{sc} aller Gruppen liegen zwischen 1,75 und 1,9 μ Eq. Es sind keine signifikanten Änderungen nach Pharmakazugabe festzustellen (Abb.12).

Messung der Leitfähigkeit (G_t)

Der G_t -Mittelwert der Kontrollgruppe beginnt mit 2,75 mS und fällt während des gesamten Verlaufs auf 2,6 mS, geringfügig niedriger (ca. 0,1 mS) verlaufen die Mittelwerte der Gruppen von Captopril und Glycyl-Glutamin. Die Gruppe von Cefadroxil bleibt im Mittel die ganze Zeit über bei 2,9 mS (Abb.12). Die G_t -Mittelwerte veränderten sich nicht signifikant.

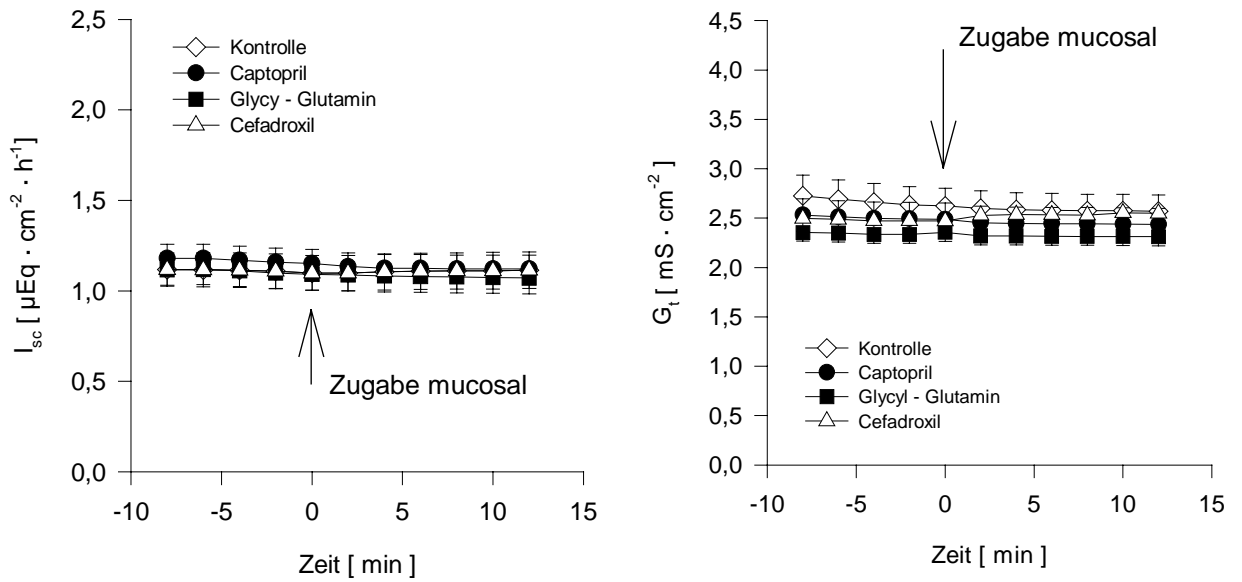


Abb. 11: Verlauf von I_{sc} und G_t am Pansenepithel (HF-Tiere), pH 6,4 mucosal (Mittelwerte und SEM).

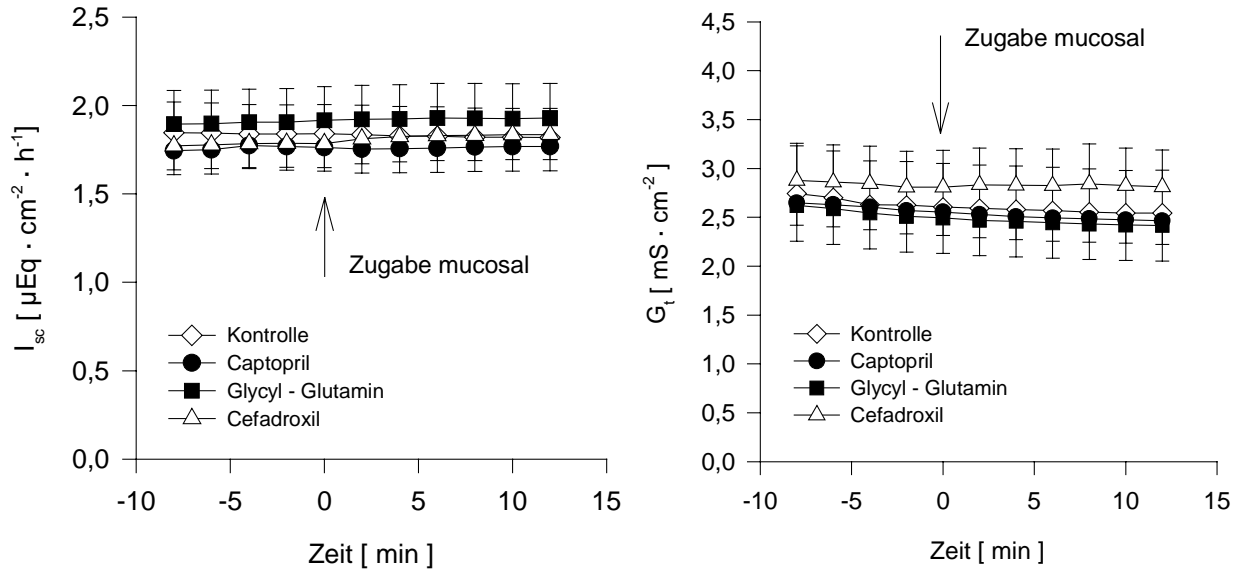


Abb. 12: Verlauf von I_{sc} und G_t am Psalterepithel (HF-Tiere), pH 6,4 mucosal (Mittelwerte und SEM).

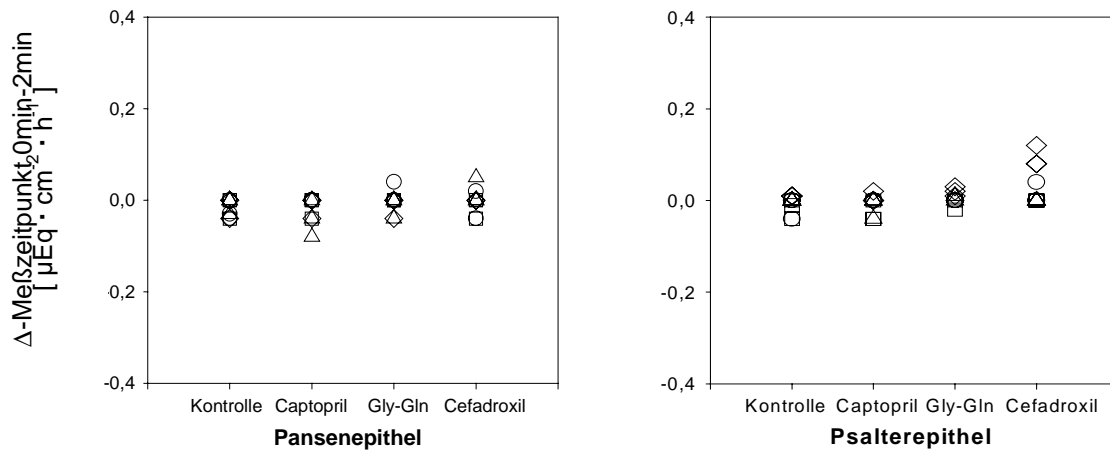


Abb. 13: Veränderung des Isc zwischen Zugabe (0 min) und Meßzeitpunkt 2min am Pansen- und Psalterepithel (HF-Tiere), pH 6,4 mucosal.

Auch dieser Versuchsansatz wurde einer Analyse mit dem erweiterten statistischen Modell unterzogen (vgl. Kap.3).

Pansenepithel: Die einzelnen Behandlungsgruppen eines Tieres zeigen keinen signifikanten Unterschied zueinander ($p=0,380$). Auch beim Vergleich der Versuchstiere sind keine signifikanten Abweichungen erkennbar ($p=0,926$).

Psalterepithel: Beim Vergleich der Behandlungsgruppen am Psalterepithel zeigen sich keine Unterschiede ($p=0,087$). Zwischen den Versuchstieren sind Unterschiede feststellbar ($p=0,034$). Diese Abweichung scheint durch die relativ starke Abweichung der Werte eines Tieres in der mit Cefadroxil behandelten Gruppe bedingt zu sein, da deutlich erkennbar ist, daß die restlichen Ergebnisse um $0,0 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ liegen.

1.1.2 Kraftfutter gefütterte Tiere (KF-Tiere)

Es ist bekannt, daß energiereiche Fütterung die Aktivität verschiedener Transportsysteme der Vormagenepithelien erhöht (DIRKSEN et al., 1984, DOREAU et al., 1997). In Versuchen an menschlichen Enterocyten konnte gezeigt werden, daß eine Erhöhung der Peptidkonzentration im umgebenden Medium zu einer Steigerung der Peptidaufnahme die Zelle führt (WALKER et al. 1998).

In einer weiteren Reihe von Versuchen wurden Vormagenepithelien von Tieren verwendet, deren Futtermittel zusätzlich zum Heu (ad libitum) 800g Kraftfutter pro Tag enthielt. Dabei wurde davon ausgegangen, daß die durch Kraftfutter erhöhte Fermentation von Stärke und vor allem von Protein und die damit verbundene Freisetzung von Peptiden sich stimulierend auf die Ausbildung der Peptidtransportsysteme auswirken könnte.

1.1.2.1 pH 7,4 auf der mucosalen Kammerseite

Zuerst wurden die Epithelien wieder bei einem pH-Wert von 7,4 auf der mucosalen sowie serosalen Seite untersucht, um keine passiven Transportbewegungen durch einen Protonengradienten hervorzurufen.

1.1.2.1.1 Pansenepithel

Messung des Kurzschlußstroms (I_{sc})

Die Mittelwerte der I_{sc} der Kontrollgruppe und der Gruppe, der Glycyl-Glutamin zugegeben wurde, verlaufen beide identisch auf einem gleichbleibenden Niveau von 0,8 μ Eq (Abb.14). Der I_{sc} der Cefadroxil-Gruppe beginnt im Mittel bei 0,75 μ Eq und steigt ab dem Zeitpunkt der Substanzzugabe an, um am Ende des Meßzeitraumes eine Höhe von 0,9 μ Eq zu erreichen. Der Mittelwert der Captopril-Gruppe befindet sich zum Beginn der Messungen auf einer Höhe von 0,9 μ Eq, fällt nach der Zugabe auf 0,8 μ Eq und steigt dann wieder auf 0,85 μ Eq an. Signifikante Veränderungen wurden nicht beobachtet.

Messung der Leitfähigkeit (G_t)

Die G_t der Kontrollgruppe beginnt mit einem Mittelwert von 3,3 mS und fällt bis zum Meßende leicht (0,1 mS) ab (Abb.14). Die Mittelwerte der Gruppe, der Cefadroxil zugegeben wurde, beginnt bei 3,2 mS und fällt linear auf 2,9 mS. Die Mittelwerte der Gruppen von Captopril und Glycyl-Glutamin beginnen auf einer Höhe von 2,6 bzw. 2,7 mS und verlaufen

während der gesamten Versuchszeit parallel zur Kontrollgruppe. Auch in diesem Fall ergab sich keine Reaktion auf die mucosale Zugabe der Substanzen.

1.1.2.1.2 Psalterepithel

Messung des Kurzschlußstroms I_{sc}

Am Psalterepithel der Kraftfutter gefütterten Tiere bleibt der I_{sc} -Mittelwert der Kontrollgruppe konstant auf einem Niveau von 1,9 μ Eq (Abb.15). Parallel dazu verläuft der I_{sc} -Mittelwert der Gruppe von Cefadroxil auf einer Höhe von 1,8 μ Eq. Die Gruppe von Captopril beginnt bei 1,85 μ Eq und fällt nach mucosaler Zugabe auf 1,75 μ Eq ab. Die Gruppe von Glycyl-Glutamin beginnt mit 2,13 μ Eq und liegt nach annähernd linearem Verlauf am Versuchsende bei 2,05 μ Eq.

Messung der Leitfähigkeit G_t

Der G_t -Mittelwert der Kontrollgruppe beginnt bei 3,65 mS und fällt stetig auf 3,5 mS. Am Ende der Messungen liegt sie deckungsgleich mit der Gruppe von Captopril, die zu Beginn Werte von 3,9 mS aufwies und bis zur Substanzzugabe einem stetigen Abfall unterworfen war (Abb.15). Die Gruppe von Cefadroxil verläuft ebenso abfallend von zu Beginn 3,65 mS bis auf 3,35 mS am Ende. Die Gruppe von Glycyl-Glutamin steigt von 3,35 auf 3,5 mS am Punkt 0 min und fällt danach auf 3,2 mS am Messungsende ab.

Weder die G_t -Mittelwerte noch die I_{sc} -Mittelwerte zeigten Veränderungen in Abhängigkeit von der Substanzzugabe.

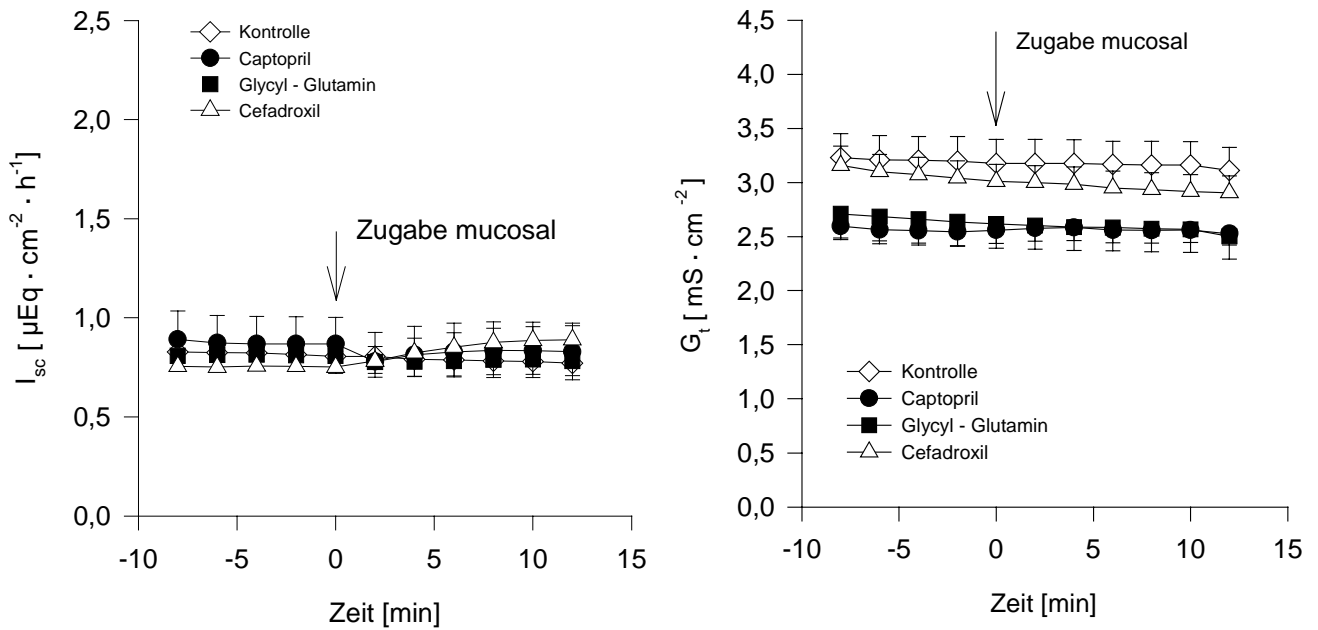


Abb. 14: Verlauf von I_{sc} und G_t am Pansenepithel (KF-Tiere), pH 7,4 mucosal (Mittelwerte und SEM).

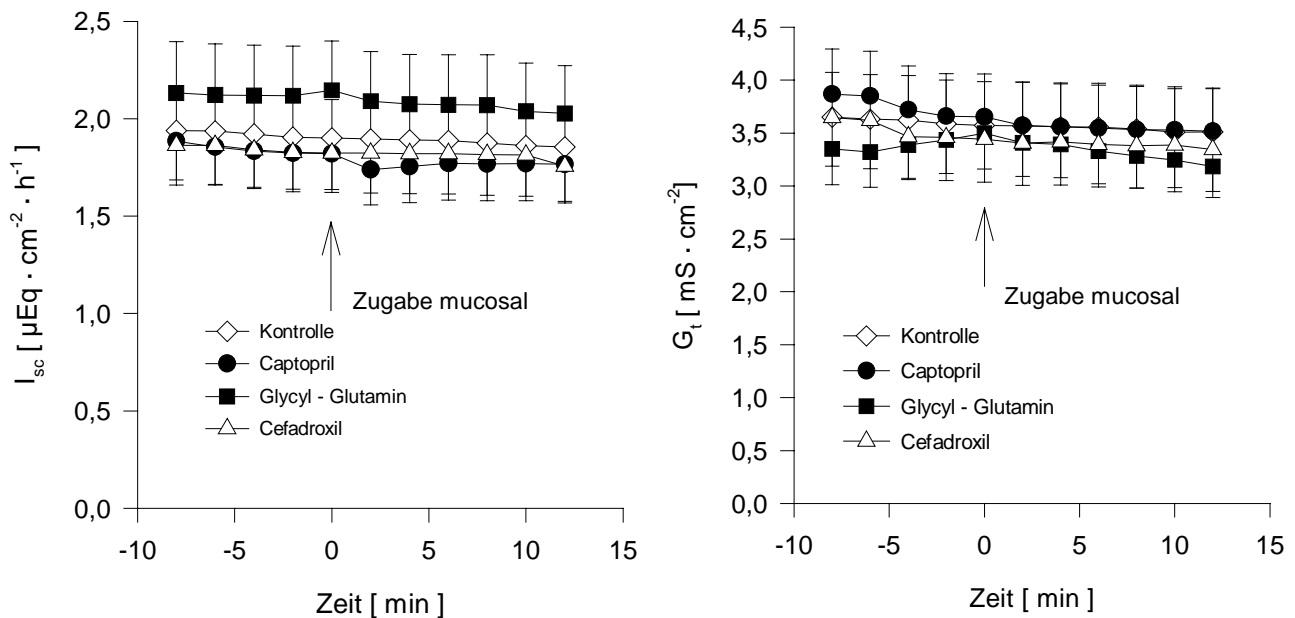


Abb. 15: Verlauf von I_{sc} und G_t am Pslalterepithel (KF-Tiere), pH 7,4 mucosal (Mittelwerte und SEM)

1.1.2.2 pH 6,4 auf der mucosalen Kammerseite

Der pH-Wert der mucosalen Seite wurde in einem zweiten Versuchsansatz erneut gesenkt, um das Protonenangebot und damit die Triebkraft des Transporters zu erhöhen.

1.1.2.2.1 Pansenepithel

Messung des Kurzschlußstroms (I_{sc})

Die Mittelwerte der I_{sc} aller Gruppen verlaufen nahezu identisch, ohne jede Veränderung auf einem konstanten Niveau von $0,95 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ (Abb.16).

Messung der Leitfähigkeit (G_t)

Die Leitfähigkeiten von Kontrolle und Cefadroxil-Gruppe verlaufen im Mittel beide so gut wie deckungsgleich zwischen 3,1 mS zu Beginn und 3,0 mS am Versuchsende (Abb.16). Darunter liegen annähernd parallel die Gruppen von Captopril und Glycyl-Glutamin anfangs 3,0 mS und am Ende 2,85 mS messen. Es konnten keine signifikanten Veränderungen nach Substanzzugabe festgestellt werden.

1.1.2.2.2 Psalterepithel

Messung des Kurzschlußstroms (I_{sc})

Die am Psalterepithel Kraftfutter gefütterter Tiere, bei pH 6,4 auf der mucosalen Kammerseite, gemessenen Kurzschlußströme, verlaufen im Mittel alle parallel zueinander und bleiben während des gesamten Versuchszeitraums auf der Anfangshöhe. Diese liegt für Captopril und Cefadroxil bei $1,75 \mu\text{Eq}$, für die Kontrolle $1,65 \mu\text{Eq}$ und für Glycyl-Glutamin bei $1,6 \mu\text{Eq}$ (Abb.17).

Messung der Leitfähigkeit (G_t)

Wie für die oben beschriebenen Kurzschlußströme gilt auch für die gemessenen Leitfähigkeiten, daß sie im Mittel alle, während des gesamten Meßzeitraums, parallel auf einem Level verlaufen (Abb.17). Die Anfangshöhen liegen hier für die Kontrolle bei 1,9 mS, die Gruppe von Glycyl-Glutamin bei 2,5, von Captopril bei 2,65 und von Cefadroxil bei 2,9 mS.

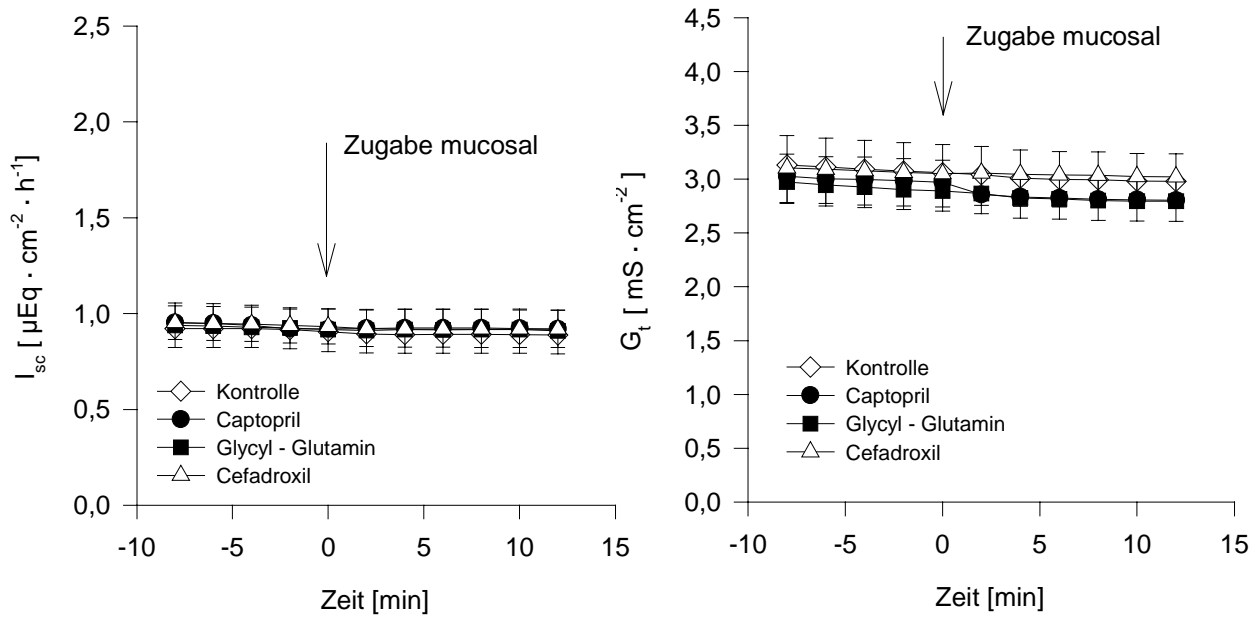


Abb. 16: Verlauf von I_{sc} und G_t am Pansenepithel (KF-Tiere), pH 6,4 mucosal (Mittelwerte und SEM).

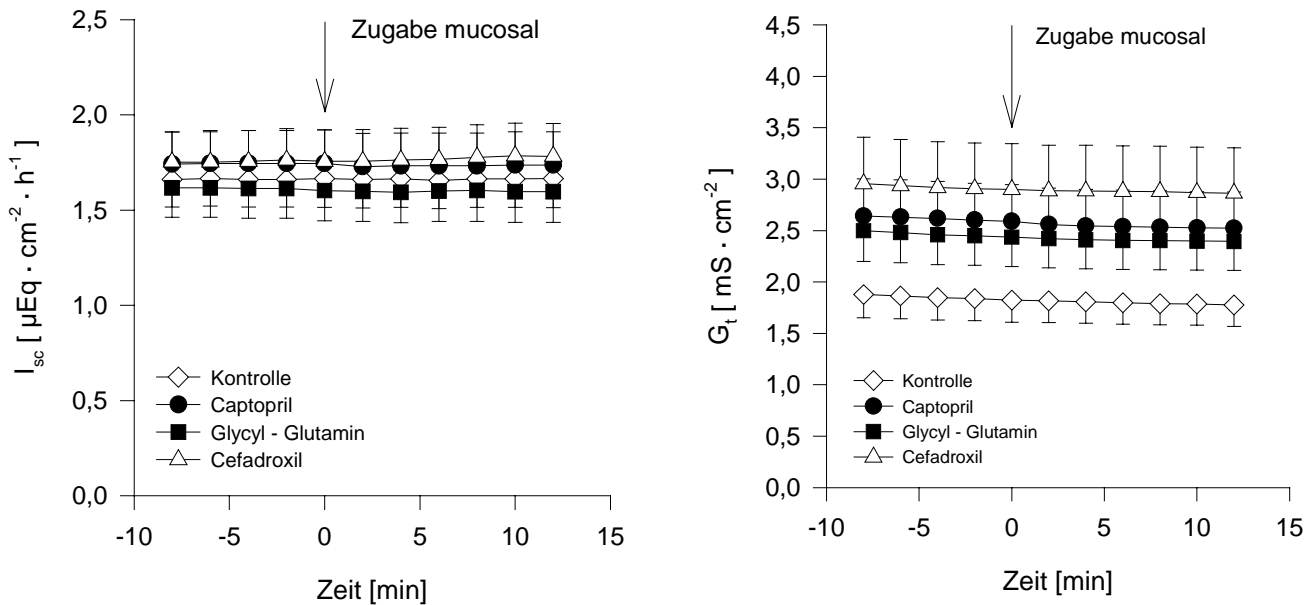


Abb. 17: Verlauf von I_{sc} und G_t am Psalterepithel (KF-Tiere), pH 6,4 mucosal (Mittelwerte und SEM).

Auch bei den mit Kraftfutter gefütterten Tieren wurden zusätzlich zum Verlauf der für jede Behandlungsgruppe errechneten Mittelwerte noch die zu einem Tier gehörigen Behandlungsgruppen miteinander, sowie die Versuchstiere untereinander auf signifikante Unterschiede am Zeitpunkt 0 min und 2 min nach Zugabe geprüft und die Ergebnisse in Abb. 18 und 19 dargestellt (vgl. Kap.2).

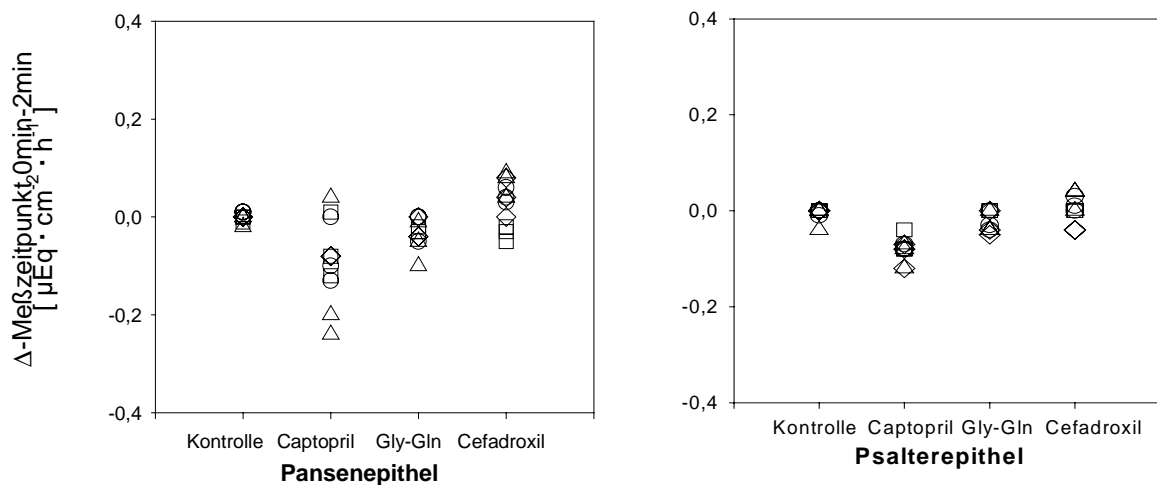


Abb. 18: Veränderung des I_{sc} zwischen Zugabe und Meßzeitpunkt 2min am Pansen- und Psalterepithel (KF-Tiere), pH 7,4 mucosal.

Pansenepithel: Zwischen den Behandlungsgruppen ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,002$), der sich durch eine relativ enge Streuung der Kontrollgruppe und das Abweichen von einzelnen Werten erklären läßt. Bei Betrachtung der Versuchstiere zueinander bestehen keine signifikanten Unterschiede ($p=0,692$).

Psalterepithel: Zwischen den Behandlungsgruppen ($p=0,024$) bestanden signifikante Unterschiede in der Differenz zwischen Zeitpunkt 0 min und Zeitpunkt 2 min, die sich durch die leichte negative Abweichung der Epithelien in der Behandlungsgruppe Captopril im Vergleich zu einer geringen Streuung der Werte der Kontrollgruppe erklären lassen. Zwischen den Versuchstieren ($p=0,652$) bestanden keine signifikanten Unterschiede.

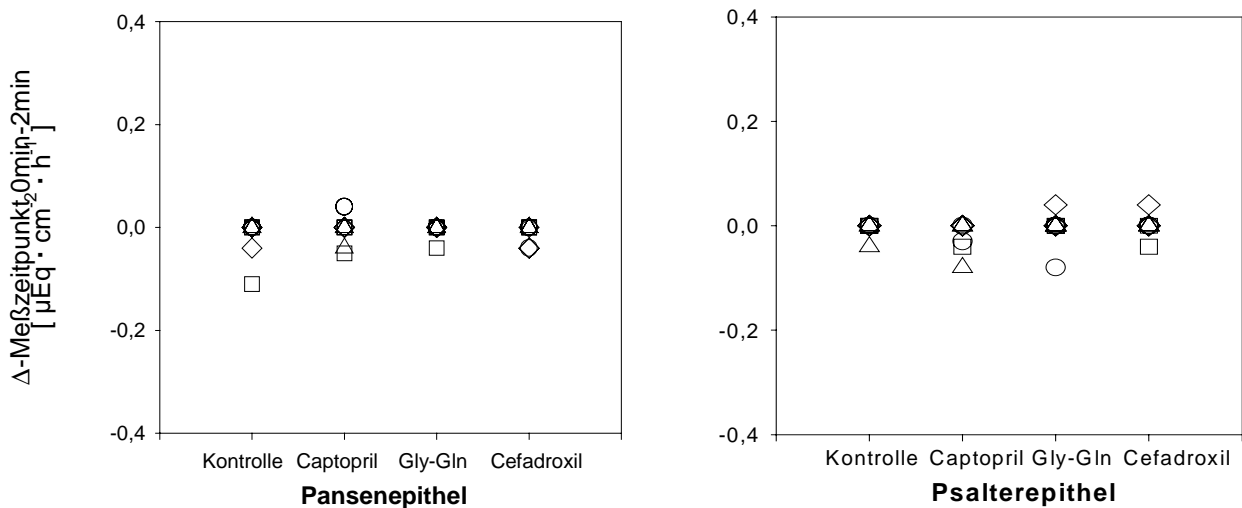


Abb. 19: Veränderung des Isc zwischen Zugabe und Meßzeitpunkt 2min am Pansen- und Psalterepithel (KF-Tiere), pH 6,4 mucosal.

Pansenepithel: Es besteht kein signifikanter Unterschied der Behandlungsgruppen zueinander ($p=0,576$), sowie zwischen den einzelnen Versuchstieren ($p=0,277$).

Psalterepithel: Auch hier ist kein signifikanter Unterschied von Kontrollgruppe zu den Gruppen, denen die Substanzen Captopril, Glycyl-Glutamin und Cefadroxil zugegeben wurden, festzustellen ($p=0,216$). Auch bei Betrachtung der Versuchstiere zueinander fielen keine signifikanten Unterschiede auf ($p=0,101$).

1.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß weder für die gemessenen Kurzschlußströme noch für die gemessenen Leitfähigkeiten nach Zugabe der verwendeten Substanzen eine signifikante Abweichung von der Kontrollgruppe auftrat. Dies gilt sowohl für Pansen als auch für Psalterepithelien von Heu und auch Kraftfutter gefütterten Tieren. Die durch die Senkung des pH-Werts hervorgerufene Verstärkung der Triebkraft des Protonen-gekoppelten Transportmechanismus äußerte sich ebenfalls bei keiner der verwendeten Epithelgruppen in einer signifikanten, meßbaren Abweichung von der Kontrollgruppe nach Zugabe der pharmakologischen Substanzen bzw. des Peptids.

1.2 Messung der Transportraten von radioaktiv markiertem Peptid

Diese Messungen erfassen jede Passage der markierten Substanz durch das Epithel, unabhängig davon, ob diese aktiv oder passiv, durch die Zelle oder auf parazellulärem Weg stattfindet. Zur Bestimmung der Peptidtransportraten wurde D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3-³H] verwendet. Aus in ihren elektrophysiologischen Parametern ähnlichen Geweben wurden Paare gebildet. Dann wurden zuerst die unidirektionalen Transportraten (J_{ms} , bzw. J_{sm}) bestimmt und anschließend der Nettoflux ($J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$) errechnet.

Nach Ermittlung von drei Fluxraten von je einer Stunde wurde in den ersten drei Versuchen die Substanz Ouabain auf der serosalen Kammerseite zugegeben und nach 20 min erneut zwei Fluxraten von jeweils einer Stunde bestimmt. Ouabain hemmt die Na/K-ATPase der basolateralen Zellmembran (HARRISON et al., 1975). Da der Protonen-gekoppelte Peptidtransporter über einen ebenfalls in der apikalen Membran lokalisierten Na/H-Austauscher indirekt an die Na/K-ATPase gekoppelt ist, müßte ein aktiver Peptidtransport durch eine Hemmung der ATPase zu beeinflussen sein (siehe auch Abb.2).

In drei weiteren Versuchen wurde nach Bestimmung von jeweils drei Fluxperioden Mannit auf der mucosalen Seite zugegeben. Es ist bekannt, daß Mannit nicht von den Zellen aufgenommen werden kann und auf parazellulärem Wege durch das Epithel transportiert wird. Durch die Mannitzugabe wird die Osmolarität der Inkubationslösung des mucosalen Kammerkompartiments erhöht und so eine Erhöhung der parazellulären Leitfähigkeit verursacht (KURKOWSKI und MARTENS, 1999). Folglich müßten auch die Transportraten für das markierte Peptid erhöht werden, wenn dieser Transport parazellulär stattfindet.

1.2.1 Peptidtransport vor Zugabe anderer Substanzen

1.2.1.1 Verlauf der elektrophysiologischen Parameter

Leitfähigkeit und Kurzschlußstrom verliefen während der Bestimmung der ersten drei Fluxperioden, die ohne Zugabe anderer Substanzen erfolgte, ohne nennenswerte Veränderungen. Zeitabhängig wurde ein geringfügiger Abfall des I_{sc} und der G_t beobachtet.

1.2.1.2 Peptidtransportraten am Pansenepithel

Für jede Transportrichtung (J_{ms} und J_{sm}) wurde aus den für die jeweils ersten drei Fluxperioden ermittelten Transportraten der Durchschnitt errechnet. Für den Transport von mucosal nach serosal ergab sich ein Mittelwert von $6,50 \pm 0,36 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, für die

Gegenrichtung (serosal nach mucosal) ein Mittelwert von $9,71 \pm 0,94 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Der aus J_{ms} und J_{sm} errechnete Nettoflux betrug im Mittel $-3,21 \pm 0,85 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Auch die elektrophysiologischen Parameter wurden als Mittelwert dargestellt, der für die G_t $2,56 \pm 0,12 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ und für den I_{sc} $0,66 \pm 0,05 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ betrug.

Tab. 2: Transportraten von D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3-³H] durch das Pansenepithel und zugehörige elektrophysiologische Parameter (Mittelwerte mit SEM).

J_{ms} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	J_{sm} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	J_{net} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	G_t [mS · cm ⁻²]	I_{sc} [μEq · cm ⁻² · h ⁻¹]	N/n
$6.50 \pm 0.36 \bullet$	$9.71 \pm 0.94 \bullet$	-3.21 ± 0.85 •	2.56 ± 0.12	0.66 ± 0.05	6/10

• = signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu 0

1.2.1.2.1 Passage von der mucosalen zur serosalen Seite des Epithels (J_{ms})

Um die Gesamtmenge an Peptid, die zu jedem Meßpunkt durch das Epithel befördert wurde, darzustellen, wurden die Fluxperioden für jedes einzelne Gewebe kumuliert und in Abhängigkeit zur Zeit dargestellt (Abb.20), am Zeitpunkt 2h ist Flux1, am Zeitpunkt 3h Flux1 + Flux2 und am Zeitpunkt 3h Flux1 + Flux2 + Flux3 dargestellt. Die ermittelten Werte entsprechen der gesamten Peptidmenge, die zu jedem Meßzeitpunkt durch das Epithel transportiert worden ist. In der Grafik ist zu erkennen, daß die transportierte Peptidmenge zum Zeitpunkt 2h zwischen 3,9 und 7,76 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ liegt. Nach drei Stunden wurden insgesamt zwischen 9,3 und 15,95 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ durch das Epithel befördert, nach vier Stunden befanden sich zwischen 12,61 und 23,63 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ auf der serosalen Kammerseite. Der Transport nahm linear mit der Zeit zu ($y = -7,07 + x \cdot 6,59$). Der Schnittpunkt mit der x-Achse ($J_{ms}=0$) ist als die Zeit anzusehen, die für die Äquilibration des Gewebes mit dem Peptid notwendig ist (steady state Bedingungen). Die gewählte Periode von 90 min vor Beginn der Bestimmung der 1. Fluxperiode ist also als ausreichend anzusehen.

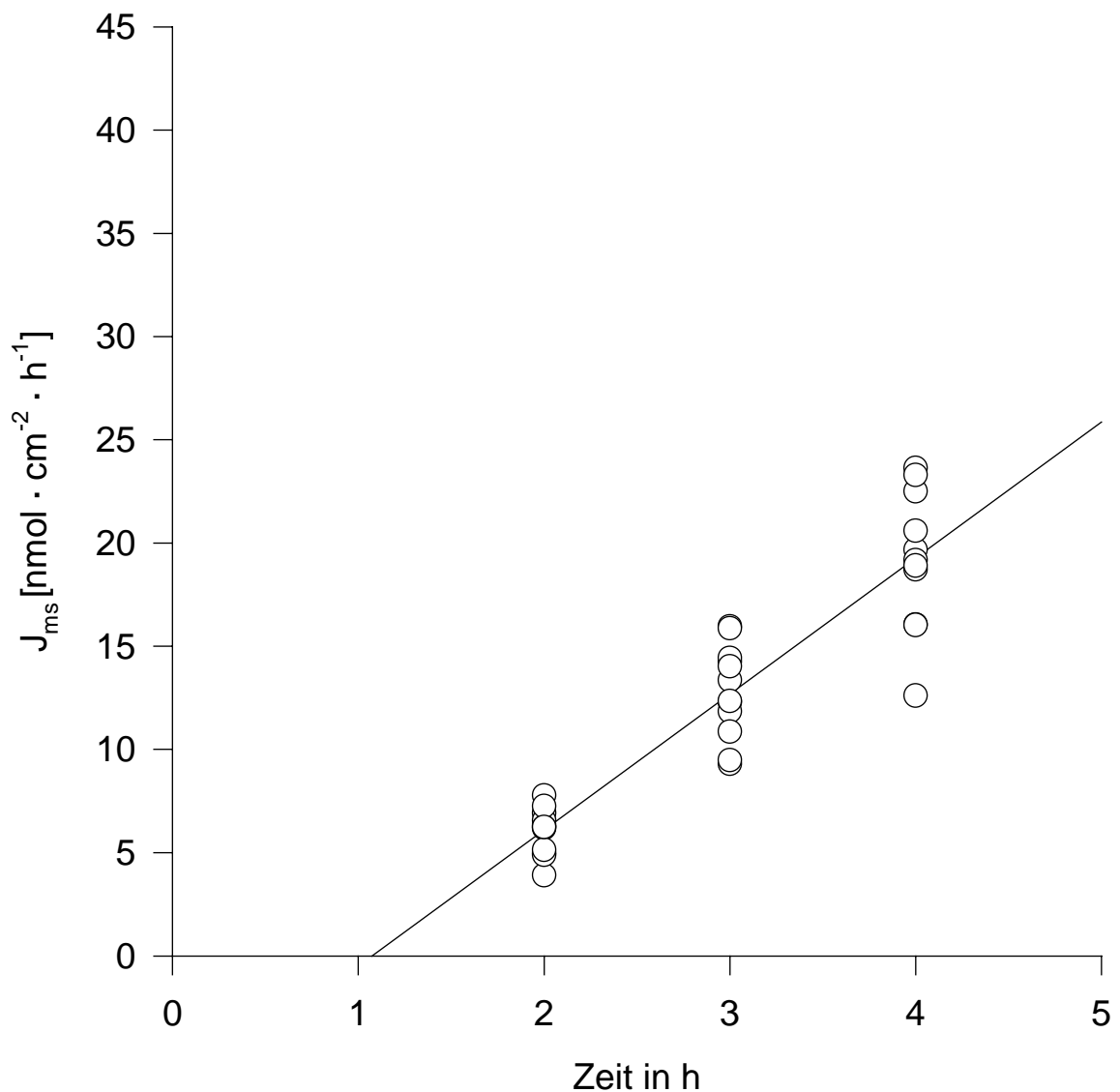


Abb. 20: Kumulativer Peptidtransport durch das Pansenepithel von mucosal nach serosal (J_{ms}) in Abhängigkeit von der Zeit. Das radioaktiv markierte Peptid (D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3,³H]) wurde zum Zeitpunkt 0 mucosal zugegeben. Nach einer Äquilibration von ca. 90 min begann die erste Fluxperiode von 60 min, d.h. 2, 3 und 4 Stunden (x-Achse) repräsentieren jeweils die erste, zweite und dritte Fluxperiode. Die dargestellten Werte entsprechen dem Gesamttransport (pro Kammer) an jedem Meßzeitpunkt. (1.-3. Fluxperiode) (N=6; n=10) (Steigung der Regressionsgeraden : $Y = -7,07 + 6,59 \cdot x$; $r^2 = 0,85$)

1.2.1.2.2 Passage von der serosalen zur mucosalen Seite des Epithels (J_{sm})

Auch für die Transportvorgänge in der Gegenrichtung wurde durch Addition der einzelnen Fluxe der Gesamttransport an jedem Meßzeitpunkt ermittelt und in Abhängigkeit von der Zeit grafisch dargestellt.

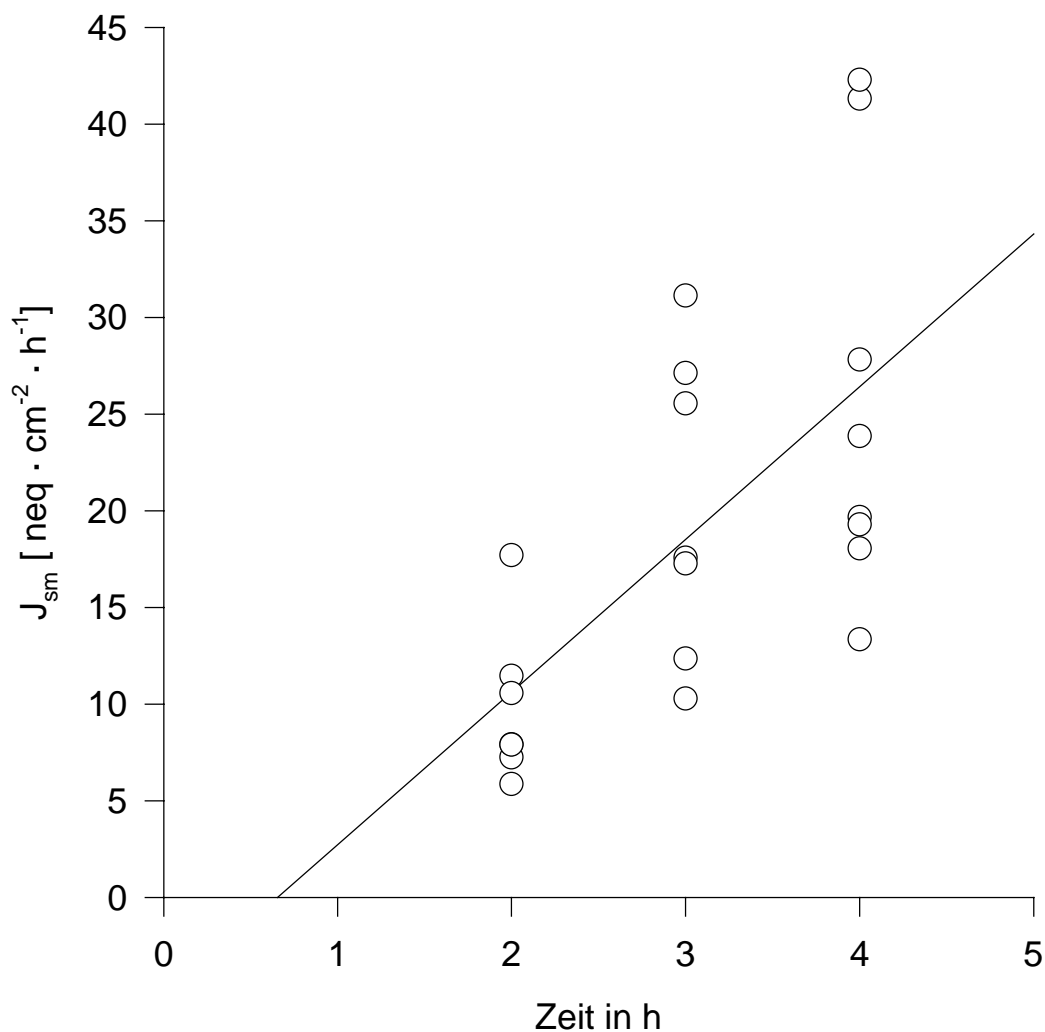


Abb. 21: Kumulative Peptidtransporte durch das Pansenepithel von serosal nach mucosal (J_{sm}) in Abhängigkeit von der Zeit. Das radioaktiv markierte Peptid (D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3- ^3H]) wurde zum Zeitpunkt 0 serosal zugegeben. Nach einer Äquilibration von ca. 90 min begann die erste Fluxperiode von 60 min, d.h. 2, 3 und 4 Stunden (x-Achse) repräsentieren jeweils die erste, zweite und dritte Fluxperiode. Dargestellt ist die Summe transportierten Peptids (Gesamttransport) an jedem Meßzeitpunkt. (1.-3. Fluxperiode), (N=6;n=10) (Steigung der Regressionsgeraden: $y = -5,16 + 7,90 \cdot x$; $r^2=0,42$)

Bei der ersten Fluxmessung nach zwei Stunden wurden Werte zwischen 5,87 und 17,69 nmol · cm⁻² · h⁻¹ ermittelt, nach drei Stunden variierten die Werte zwischen 10,28 und 31,13 nmol · cm⁻² · h⁻¹ und nach vier Stunden zwischen 13,35 und 42,29 nmol · cm⁻² · h⁻¹. Es fällt auf, daß die Werte zu den einzelnen Meßzeitpunkten in der Richtung J_{sm} breiter gestreut sind als in der Gegenrichtung.

1.2.1.3 Peptidtransportraten am Psalterepithel

Aus den für das Psalterepithel bestimmten Einzelfluxen wurden für die Transportrichtungen J_{ms} und J_{sm} 6,94 ± 0,51 nmol · cm⁻² · h⁻¹ und 8,63 ± 0,74 nmol · cm⁻² · h⁻¹ als Mittelwerte errechnet. Der Nettotransport betrug im Durchschnitt -1,68 ± 0,76 nmol · cm⁻² · h⁻¹ und war nicht signifikant von 0 verschieden (t-Test). Für die G_t wurden 2,52 ± 0,24 mS · cm⁻² und für den I_{sc} 1,57 ± 0,11 µEq · cm⁻² · h⁻¹ ermittelt.

Tab. 3: Transportraten von D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3-³H] durch das Psalterepithel und zugehörige G_t und I_{sc}. (Mittelwerte und SEM)

J _{ms} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	J _{sm} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	J _{net} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	G _t [mS · cm ⁻²]	I _{sc} [µEq · cm ⁻² · h ⁻¹]	N/n
• 6.94 ± 0.51	• 8.63 ± 0.74	-1.68 ± 0.76	2.52 ± 0.24	1.57 ± 0.11	6/11

• = signifikante Unterschiede (p<0,05) zu 0

1.2.1.3.1 Passage von der mucosalen zur serosalen Seite des Epithels (J_{ms})

Auch die Peptidbewegungen über das Psalterepithel von mucosal nach serosal wurden in ihrer Summe zu jedem Meßzeitpunkt dargestellt. Nach zwei Stunden wurden Werte zwischen 2,86 nmol und 10,72 nmol · cm⁻² · h⁻¹ ermittelt, nach drei Stunden lagen sie zwischen 9,3 und 18,88 nmol · cm⁻² · h⁻¹, nach vier Stunden zwischen 12,77 und 29,11 nmol · cm⁻² · h⁻¹. Abb.22 gibt die kumulativen Transporte wieder und zeigt, daß die transportierte Gesamtmenge an Peptid linear mit der Zeit zunimmt.

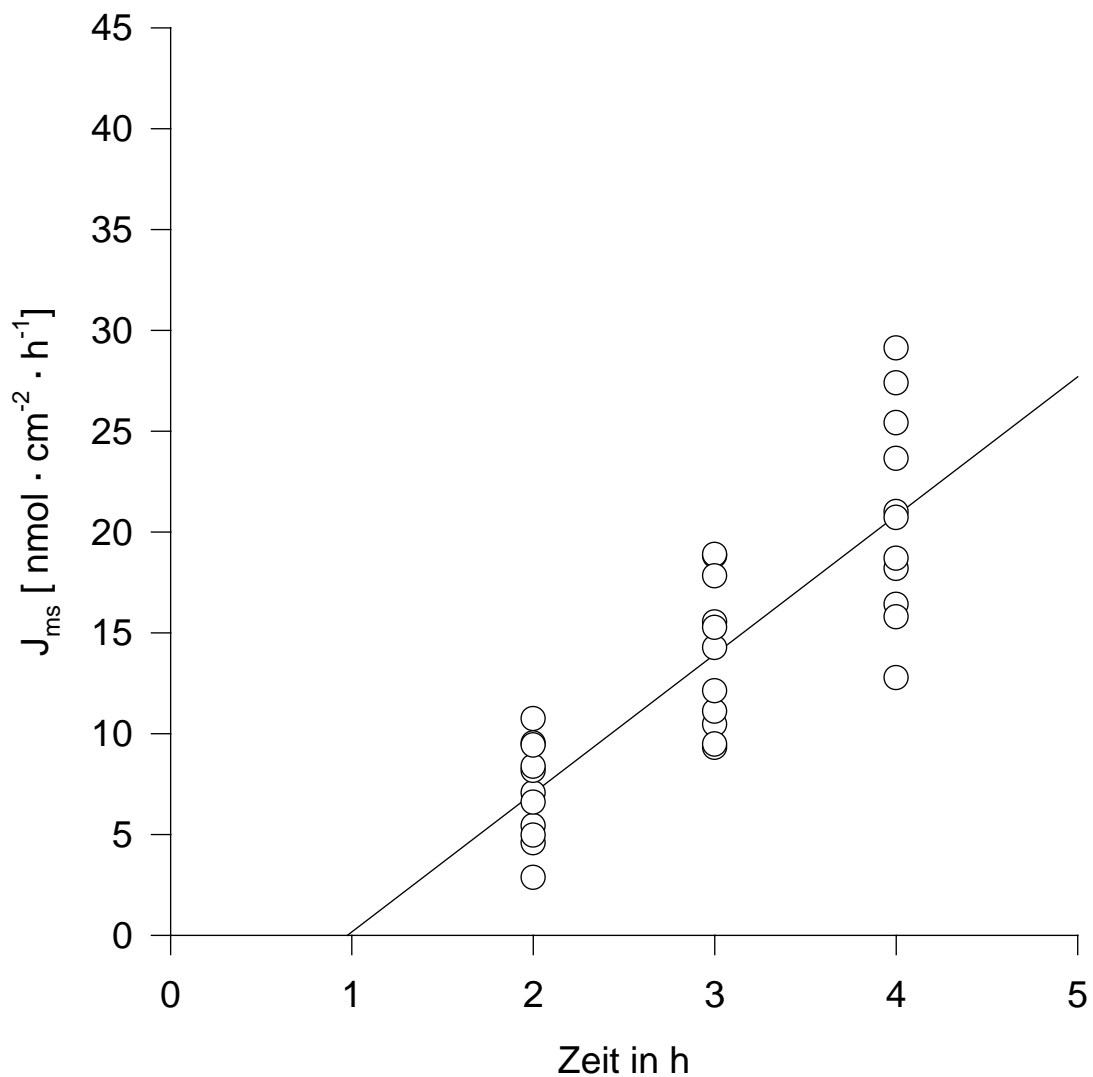


Abb. 22: Kumulativer Peptidtransport durch das Psalterepithel von mucosal nach serosal (J_{ms}) in Abhängigkeit von der Zeit. Das radioaktiv markierte Peptid (D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3,³H]) wurde zum Zeitpunkt 0 mucosal zugegeben. Nach einer Äquilibration von ca. 90 min begann die erste Fluxperiode von 60 min, d.h. 2, 3 und 4 Stunden (x-Achse) repräsentieren jeweils die erste, zweite und dritte Fluxperiode. Dargestellt ist die gesamte Menge transportierten Peptids zu jedem Meßzeitpunkt. (N=6; n=11) (Steigung der Regressionsgeraden: $y = -6,71 + 6,88 \cdot x$; $r^2=0,70$)

1.2.1.3.2 Passage von der serosalen zur mucosalen Seite des Epithels (J_{sm})

Bei den zum Zeitpunkt 2h und 3h ermittelten kumulativen Transportraten läßt sich im Vergleich zur Gegenrichtung eine größere Streuung feststellen, die nach 4h festgestellten Werte sind denen der Gegenrichtung in etwa entsprechend. Nach zweistündiger Inkubationszeit wurden Werte zwischen 4,75 und 20,76 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ermittelt, nach drei Stunden rangierten sie zwischen 11,24 und 27,51 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, nach vier Stunden zwischen 15,09 und 38,24 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ (Abb.23).

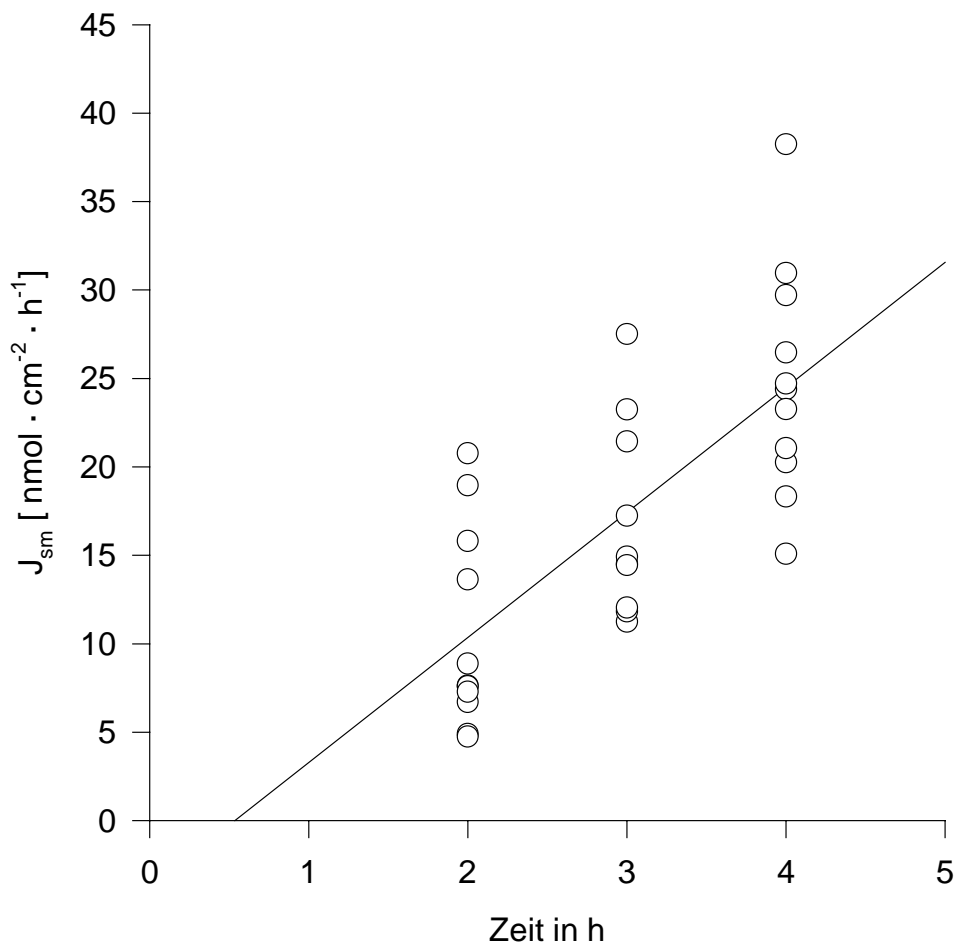


Abb. 23: Kumulativer Peptidtransport durch das Psalterepithel von serosal nach mucosal (J_{sm}) in Abhängigkeit von der Zeit. Das radioaktiv markierte Peptid (D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3, ^3H]) wurde zum Zeitpunkt 0 serosal zugegeben. Nach einer Äquilibration von ca. 90 min begann die erste Fluxperiode von 60 min, d.h. 2,3 und 4 Stunden (x-Achse) repräsentieren jeweils die erste, zweite und dritte Fluxperiode. Dargestellt ist die gesamte Menge transportierten Peptids zu jedem Meßzeitpunkt. (Steigung der Regressionsgeraden: $y = -3,79 + 7,07 \cdot x$; $r^2=0,52$)

1.2.2 Peptidtransport nach Zugabe von Ouabain

Nach Bestimmung von drei Fluxperioden wurde auf der serosalen Epithelseite 0,1mmol/l Ouabain zugegeben. Anschließend wurden zwei weitere Fluxperioden ermittelt, um zu untersuchen, ob sich der Peptidtransport durch Hemmung der an die Na/K-ATPase gekoppelten aktiven Prozesse beeinflussen läßt.

1.2.2.1 Verlauf der elektrophysiologischen Parameter

Die Leitfähigkeiten (G_t) verliefen während der gesamten Versuchsdauer am Pansen und am Psalterepithel, sowohl vor als auch nach der Zugabe von Ouabain, ohne nennenswerte Veränderungen und sind durch ihre Mittelwerte dargestellt (Tab.4 und 5). Für den Kurzschlußstrom (I_{sc}) war am Pansenepithel (Tab.4) wie auch am Psalterepithel (Tab.5) ein signifikanter Abfall nach Ouabainzugabe festzustellen (t-Test).

1.2.2.2 Peptidtransportraten am Pansenepithel

Für die einzelnen Transportrichtungen und für den Nettotransport wurden aus den jeweils gemessenen Werten aller untersuchten Epithelien vor und nach der Ouabain Zugabe Gesamt-Mittelwerte errechnet.

Tab. 4: Transportraten von D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3-³H] durch das Pansenepithel vor und nach Zugabe von Ouabain und zugehörige G_t und I_{sc} (Mittelwerte mit SEM).

	J_{ms} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	J_{sm} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	J_{net} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	G_t [mS · cm ⁻²]	I_{sc} [μEq · cm ⁻² · h ⁻¹]	N/n
Kontroll e	5.74 ± 0.44	9.76 ± 1.51	-4.02 ± 1.31	2.48 ± 0.12	0,67 ± 0.01	3/5
Ouabai n	8.66 ± 1.16	10.54 ± 0.75	-3.29 ± 0.95	2.93 ± 0.30	• 0.35 ± 0.06	3/5

•= signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppe

Die in Tab.4 aufgeführten Werte für die Transportraten vor und nach Ouabainzugabe unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (t-Test). Durch die Zugabe von Ouabain wurden am Pansenepithel weder die Transportraten noch die Leitfähigkeit signifikant beeinflusst. Der I_{sc} unterlag einem signifikanten Abfall nach der Pharmakazugabe.

Aufgrund der relativ geringen Anzahl an Versuchen ergaben sich für die Richtung J_{sm} , sowie für den Nettotransport signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen der einzelnen Versuche (Versuchstiere), die sich bei Betrachtung des gesamten Mittelwertes (Tab.4) in einer Vergrößerung der Streuung bemerkbar machen und den Vergleich der Kontrollgruppen

zueinander (die Betrachtung der Kontrollen als eine Gruppe) einschränken. Deswegen wurden in Abb. 24-26 die drei, bzw. zwei gemessenen Fluxraten an jedem einzelnen Epithel durch ihre jeweiligen Mittelwerte dargestellt. Es wird noch einmal genauer ersichtlich, dass für jedes einzelne Epithel kein signifikanter Unterschied vor und nach Ouabainzugabe festzustellen ist.

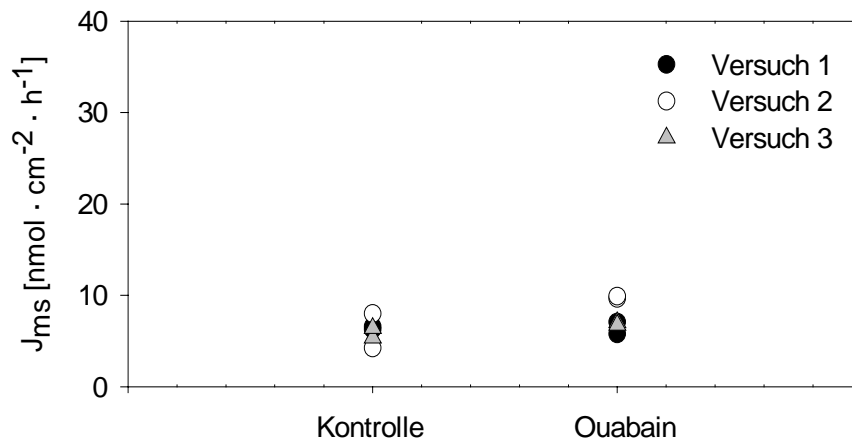


Abb. 24: Transportrichtung J_{ms} am Pansenepithel vor und nach Ouabainzugabe (Versuch 1-3). Die an jedem Epithel gemessenen Fluxraten vor und nach Zugabe sind durch ihre Mittelwerte dargestellt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchen ($p=0,206$), zwischen den zwei in jedem Versuch verwendeten Epithelien ($p=0,317$), sowie vor und nach Zugabe von Ouabain ($p=0,286$).

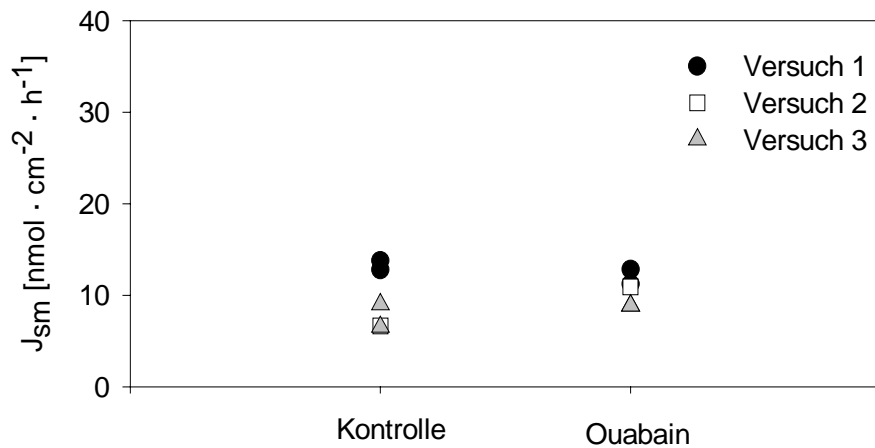


Abb. 25: Transportrichtung J_{sm} am Pansenepithel vor und nach Ouabainzugabe (Versuch 1-3). Die an jedem Epithel gemessenen Fluxraten vor und nach Zugabe sind durch ihre Mittelwerte dargestellt. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchstieren ($p=0,010$). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den in jedem Versuch für jede Richtung verwendeten zwei Epithelien ($p=0,983$), sowie kein Unterschied für die einzelnen Epithelien vor und nach Zugabe von Ouabain ($p=0,451$).

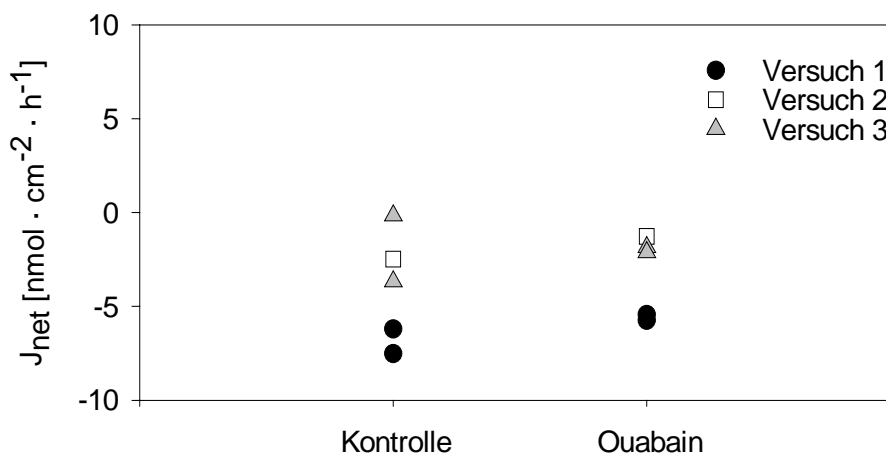


Abb. 26: Nettofluxe am Pansenepithel, vor und nach Ouabainzugabe (Versuch 1-3). Dargestellt sind die aus den Mittelwerten jedes Einzelepithels errechneten Nettofluxe. Es besteht kein signifikanter Unterschied vor und nach Ouabainzugabe ($p=0,219$). Es wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren ($p=0,019$) festgestellt.

1.2.2.3 Peptidtransportraten am Psalterepithel

In gleicher Weise wurden für das Psalterepithel die Gesamt-Mittelwerte für die einzelnen Transportrichtungen, für den Nettotransport, für die Leitfähigkeit (G_t) und den Kurzschlußstrom (I_{sc}) errechnet und tabellarisch dargestellt (Tab.5). Die Fluxe von mucosal nach serosal (J_{ms}) stiegen nach der Ouabainzugabe signifikant an (t-Test). Die G_t erhöhte sich nicht signifikant, während der I_{sc} nach Substanzzugabe signifikant abfiel. Für die Fluxe von serosal nach mucosal (J_{sm}), sowie für den Nettoflux (J_{net}) ergaben sich keine signifikanten Veränderungen nach der Zugabe von Ouabain.

Tab. 5: Transportraten von D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3-³H] durch das Psalterepithel vor und nach Zugabe von Ouabain und zugehörige G_t und I_{sc} (Mittelwerte mit SEM).

	J_{ms} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	J_{sm} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	J_{net} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	G_t [mS · cm ⁻²]	I_{sc} [μEq · cm ⁻² · h ⁻¹]	N/n
Kontroll e	5.71 ± 0.38	8.29 ± 1.04	-2.57 ± 0.95	1.97 ± 0.23	1.53 ± 0.12	3/6
Ouabai n	•8.76 ± 1.0	9.35 ± 1.42	-0.59 ± 0.79	2.98 ± 0.42	• 0.18 ± 0.08	3/6

• = signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppe

In Abb. 27-29 wurden, wie beim Pansen die drei, bzw. zwei gemessenen Fluxraten an jedem einzelnen Epithel durch ihre jeweiligen Mittelwerte dargestellt. Für das Psalterepithel waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren feststellbar. In der Transportrichtung J_{ms} zeigt sich in dieser Darstellungsform kein Anstieg nach Ouabainzugabe, für die Richtung J_{sm} und für J_{net} sind ebenfalls keine signifikanten Veränderungen festzustellen.

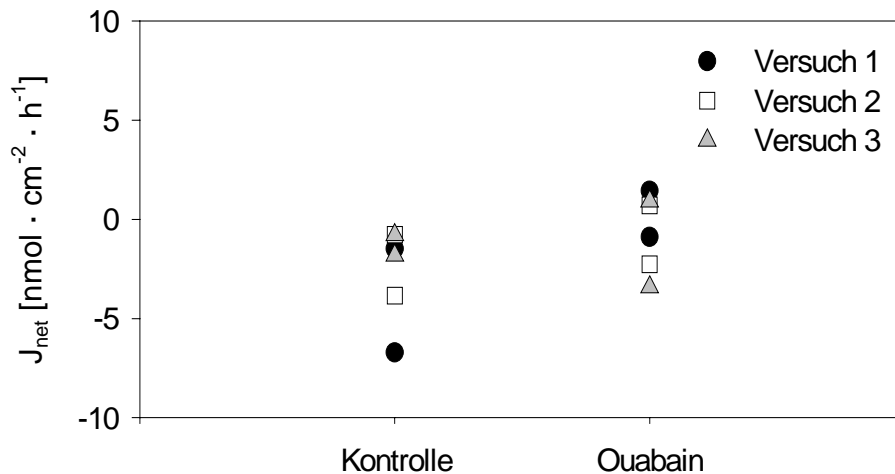


Abb. 27: Transportrichtung J_{ms} am Psalterepithel vor und nach Ouabainzugabe (Versuch 1-3). Die an jedem Epithel gemessenen Fluxraten vor und nach Zugabe sind durch ihre Mittelwerte dargestellt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchstieren ($p=0,111$), zwischen den zwei in jedem Versuch verwendeten Epithelien ($p=0,450$), sowie vor und nach Zugabe von Ouabain ($p=0,228$).

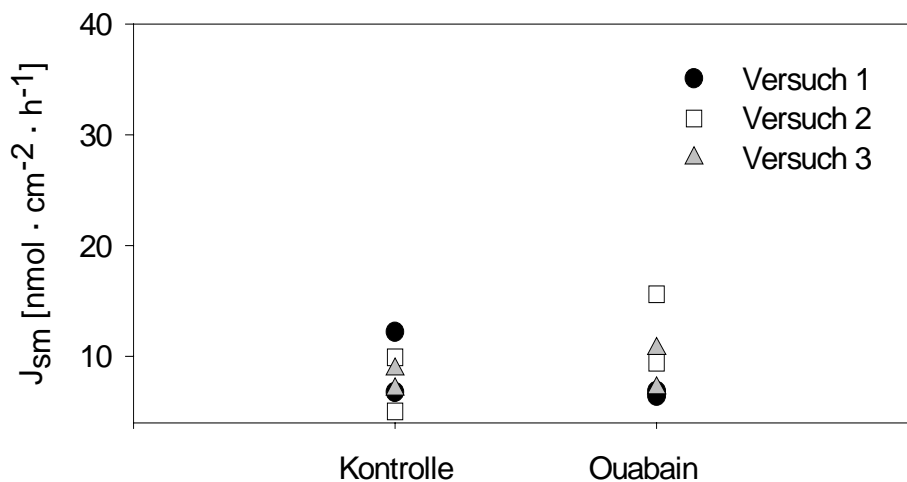


Abb. 28: Transportrichtung J_{sm} am Psalterepithel vor und nach Ouabainzugabe (Versuch 1-3). Die an jedem Epithel gemessenen Fluxraten vor und nach Zugabe sind durch ihre Mittelwerte dargestellt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchstieren ($p=0,645$), zwischen den in jedem Versuch für jede Richtung verwendeten zwei Epithelien ($p=0,270$), sowie kein Unterschied für die einzelnen Epithelien vor und nach Zugabe von Ouabain ($p=0,687$).

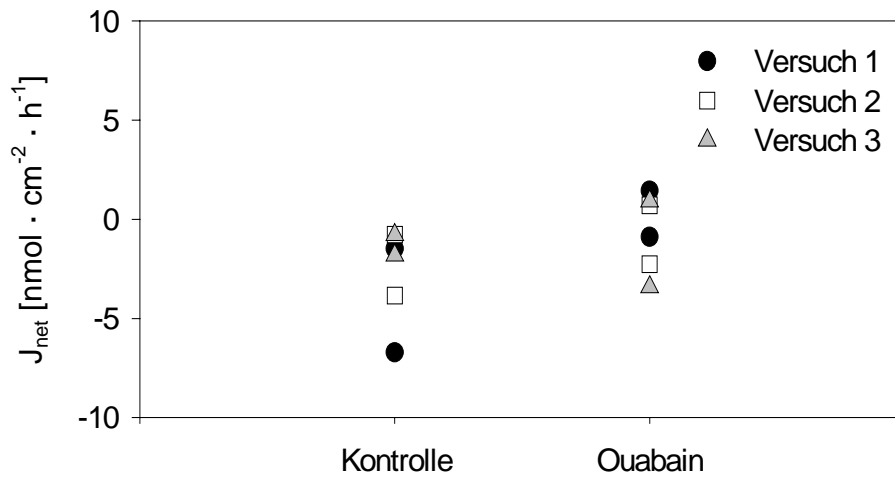


Abb. 29: Nettofluxe am Psalterepithel, vor und nach Ouabainzugabe (Versuch 1-3). Dargestellt sind die aus den Mittelwerten jedes Einzelepithels errechneten Nettofluxe. Es besteht kein signifikanter Unterschied vor und nach Ouabainzugabe ($p=0,259$). Es wurden keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren ($p=0,935$) festgestellt.

1.2.3 Peptidtransport nach Zugabe von Mannit

Die bisher erhaltenen Versuchsergebnisse unterstützen nicht die Annahme eines Protonengekoppelten Peptidtransporters. Die geringen Transportraten lassen vielmehr vermuten, daß eine passive, sehr wahrscheinlich parazelluläre Passage stattfindet. Wenn diese Hypothese zutrifft, müßte sich der Peptidtransport durch Veränderungen der parazellulären Leitfähigkeit beeinflussen lassen. Aus diesem Grunde wurde in drei weiteren Versuchen nach der Ermittlung von drei Fluxperioden (Kontrolle) auf der mucosalen Seite Mannit zugegeben, um die parazelluläre Leitfähigkeit zu erhöhen (KURKOWSKI und MARTENS, 1999) und die sich daraus ergebenden Konsequenzen für den Peptidtransport zu untersuchen. Wie in den Versuchen mit Ouabainzugabe wurden danach zwei weitere Fluxperioden ermittelt.

1.2.3.1 Verlauf der elektrophysiologischen Parameter

In den folgenden Grafiken sind der Kurzschlußstrom und die Leitfähigkeit ab 20 min vor der Zugabe von Mannit bis 120 min danach an Pansen und Psalterepithel dargestellt.

Der I_{sc} steigt im Mittel kurz nach der Mannitzugabe am Psalterepithel signifikant ($p=0,02$; t-Test) von $1,55 \pm 0,15$ auf $3,56 \pm 0,53 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ an, befindet sich 20 min nach Zugabe wieder ungefähr auf dem Ausgangsniveau und fällt danach langsam auf $0,9 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ am Ende des Meßzeitraums. Am Pansenepithel erfolgt nach Mannitzugabe ein geringer, nicht signifikanter ($p=0,53$) Anstieg von $0,5$ auf $0,75 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Danach fällt der I_{sc} wieder leicht, um in Folge erneut etwas anzusteigen.

Die Leitfähigkeit des Psalterepithels steigt im Mittel nach Zugabe von Mannit signifikant von $3,7 \pm 0,51$ auf $8,74 \pm 0,86 \text{ mS cm}^{-2}$ ($p=0,007$) und fällt danach auf $8,2 \pm 0,67 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$. Der Mittelwert der G_t des Pansenepithels steigt signifikant von $2,9 \pm 0,29$ auf $6,11 \pm 0,74 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ ($p=0,016$) und fällt danach nur geringfügig auf $5,8 \pm 0,48 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ (t-Test).

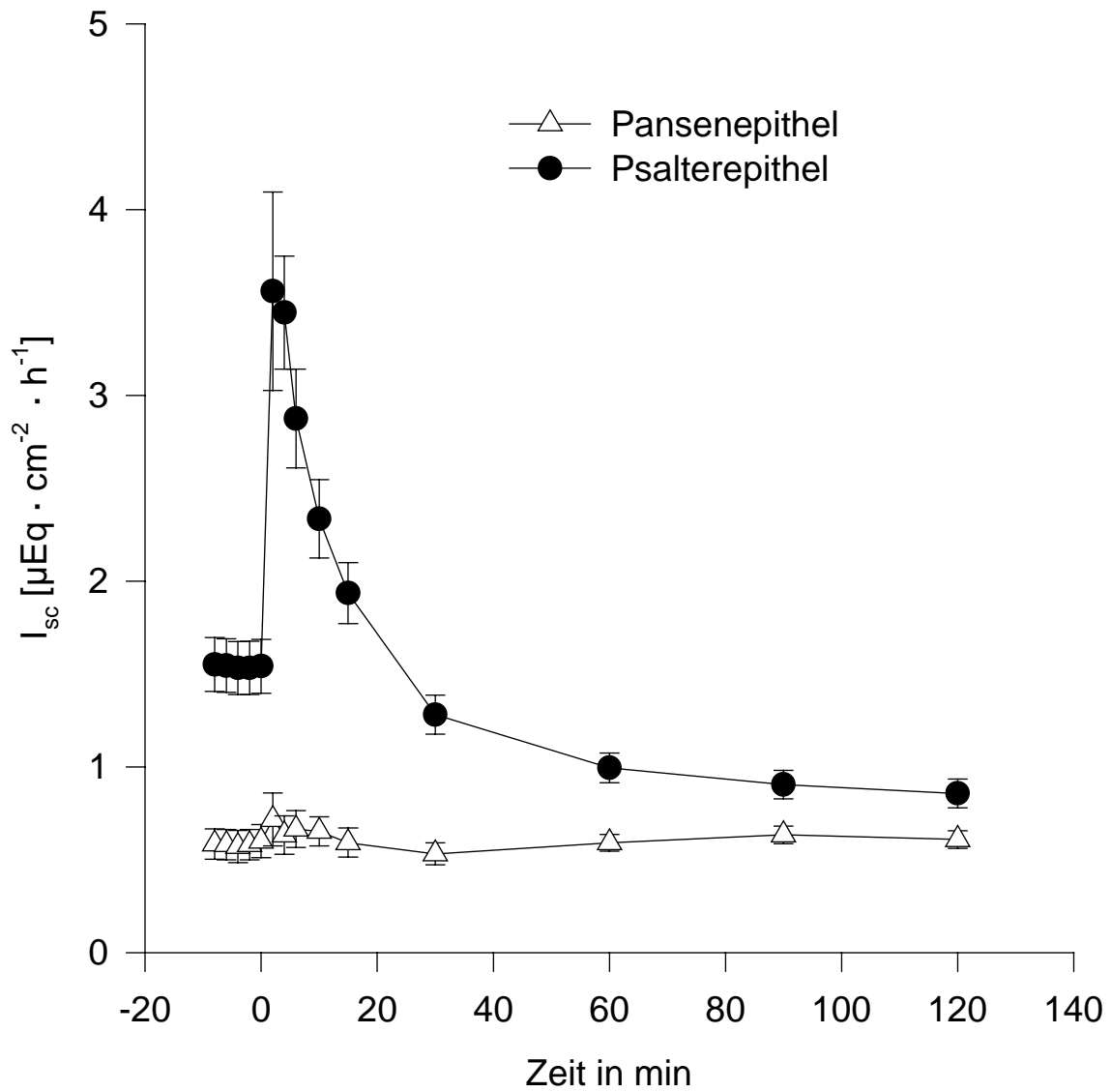


Abb. 30: Verlauf des Kurzschlußstroms (I_{sc}) nach mucosaler Zugabe von Mannit. Der osmotische Druck wurde durch die Mannitzugabe in der mukosalen Lösung auf 500 mosmol/l erhöht (Mittelwert \pm SEM).

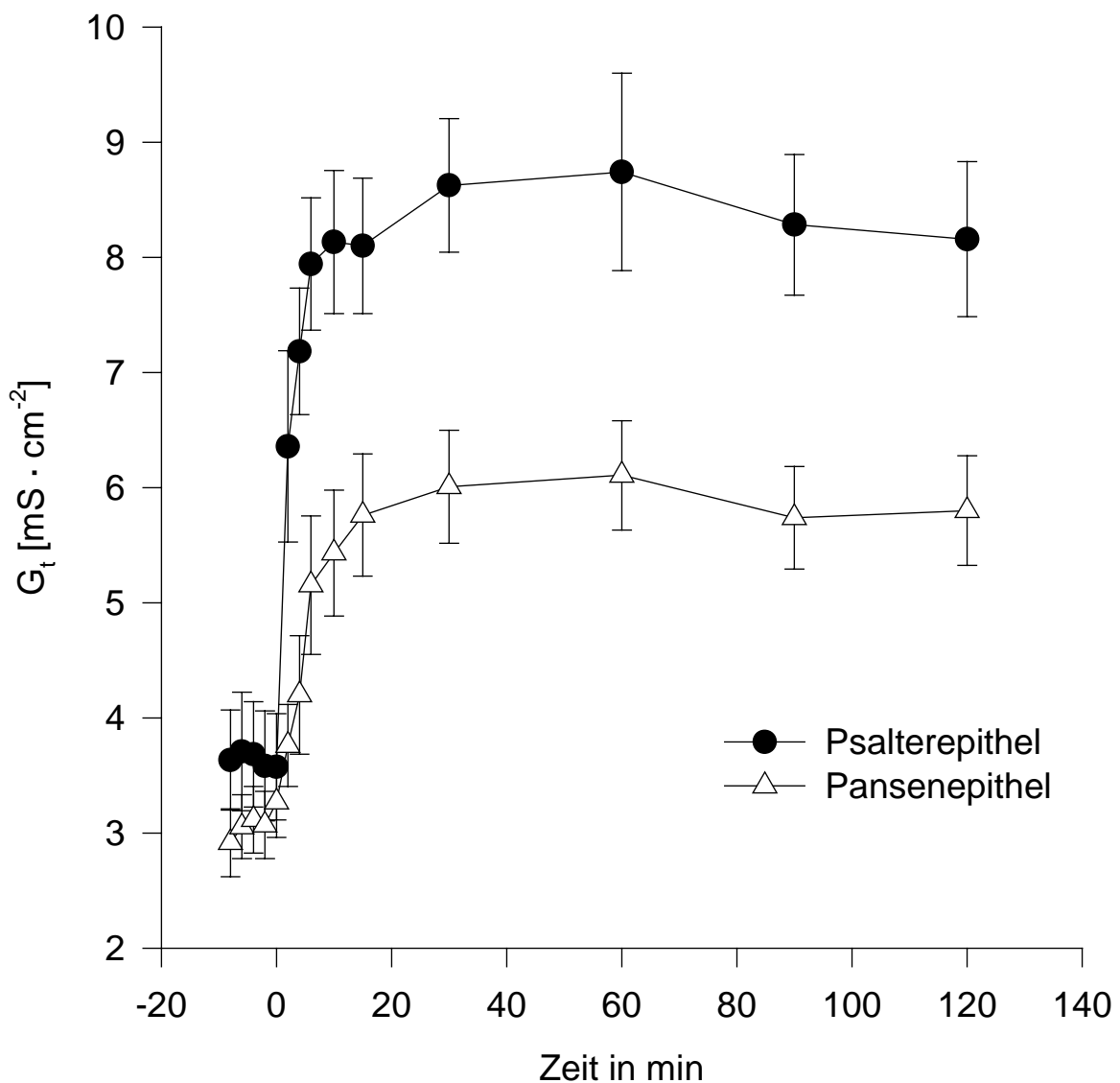


Abb. 31: Verlauf der Leitfähigkeit (G_t) nach Zugabe von Mannit. Der osmotische Druck wurde durch die Mannitzugabe in der mukosalen Lösung auf 500 mosmol/l erhöht (Mittelwert \pm SEM).

1.2.3.2 Peptidtransportraten am Pansenepithel

Die Transportraten vor und nach Mannitzugabe sind (wie in den vorangegangenen Kap.) in Tab.6 durch Mittelwerte aus den Transportraten aller Versuche dargestellt, ebenso der errechnete Nettoflux und die elektrophysiologischen Parameter G_t und I_{sc} .

Die Transporte von mucosal nach serosal und in Gegenrichtung sind nach Zugabe signifikant angestiegen. Das gleiche gilt für die Leitfähigkeit (G_t), die ebenfalls einen signifikanten

Anstieg zeigt. Der aus J_{ms} und J_{sm} errechnete Nettoflux (J_{net}) unterscheidet sich nach Mannitzugabe nicht signifikant von der Kontrollgruppe vor Zugabe. Ebenso verhält sich der Kurzschlußstrom: I_{sc} der Kontrolle und I_{sc} nach Zugabe von Mannit unterscheiden sich nicht signifikant.

Tab. 6: Transportraten von D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3-³H] durch das Pansenepithel vor und nach Zugabe von Mannit und zugehörige G_t und I_{sc} (Mittelwerte mit SEM).

	J_{ms} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	J_{sm} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	J_{net} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	G_t [mS · cm ⁻²]	I_{sc} [μEq · cm ⁻² · h ⁻¹]	N/n
Kontroll e	7.26 ± 0.30	9.66 ± 1.30	-2.40 ± 1.09	2.65 ± 0.22	0.71 ± 0.10	3/5
Mannit	•17.85 ± 0.97	•17.10 ± 1.12	-0.95 ± 1.43	• 5.81 ± 0.60	0.60 ± 0.04	3/5

•= signifikante (p<0,05) Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppe.

In Abb.32-34 sind, entsprechend den Versuchen mit Ouabainzugabe, die gemessenen Einzelflüsse pro Epithel als Mittelwert dargestellt. Der signifikante Anstieg der Transportraten in Richtung J_{ms} und J_{sm} nach Mannitzugabe ist deutlich zu erkennen.

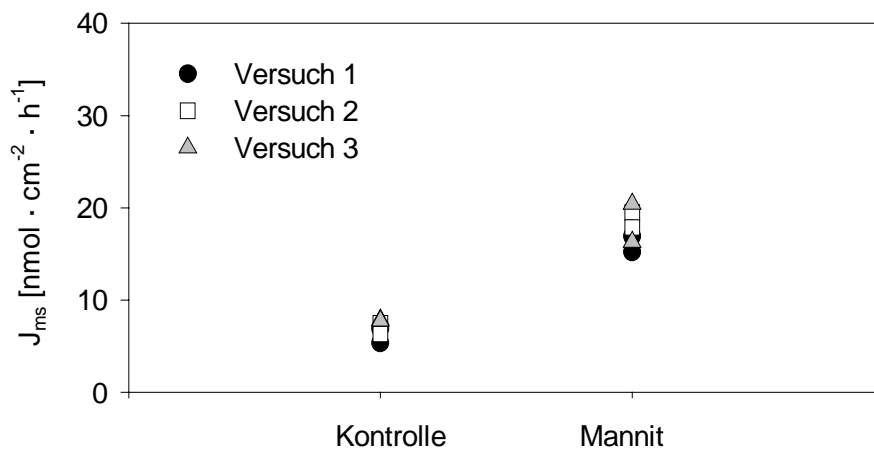


Abb. 32: Transportrichtung J_{ms} am Pansenepithel vor und nach Mannitzugabe (Versuch 4-6). Die an jedem Epithel gemessenen Fluxraten vor und nach Zugabe sind durch ihre Mittelwerte dargestellt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchstieren ($p=0,164$), zwischen den zwei in jedem Versuch verwendeten Epithelien ($p=0,078$). Es besteht ein signifikanter Unterschied vor und nach Zugabe von Mannit ($p=0,002$).

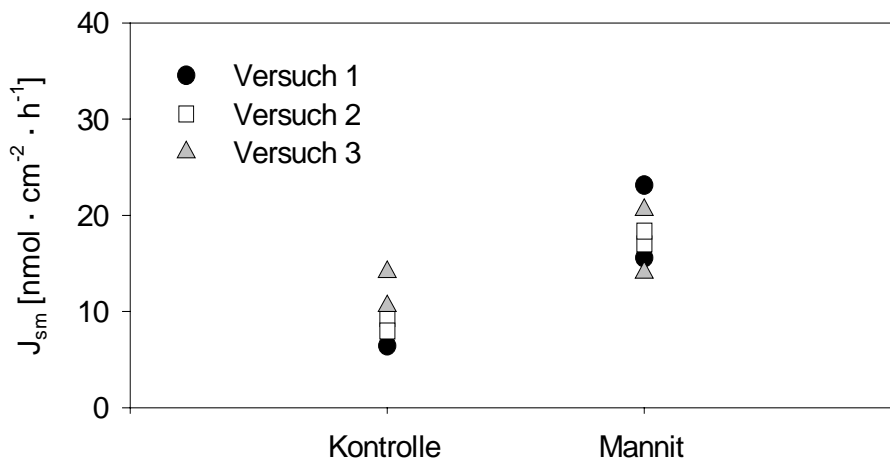


Abb. 33: Transportrichtung J_{sm} am Pansenepithel vor und nach Mannitzugabe (Versuch 4-6). Die an jedem Epithel gemessenen Fluxraten vor und nach Zugabe sind durch ihre Mittelwerte dargestellt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchstieren ($p=0,906$), sowie zwischen den in jedem Versuch für jede Richtung verwendeten zwei Epithelien ($p=0,123$). Es besteht kein Unterschied für die einzelnen Epithelien vor und nach Zugabe von Mannit ($p=0,053$).

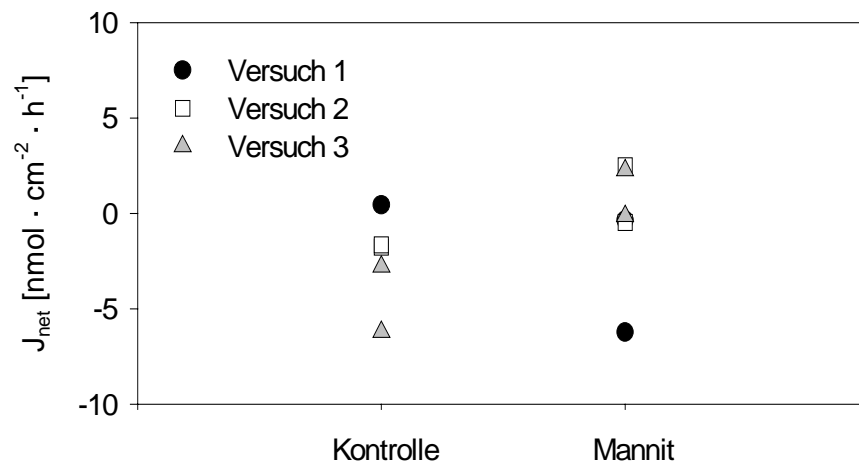


Abb. 34: Nettofluxe am Pansenepithel, vor und nach Mannitzugabe (Versuch 4-6). Dargestellt sind die aus den Mittelwerten jedes Einzelepithels errechneten Nettofluxe. Es besteht kein signifikanter Unterschied vor und nach Mannitzugabe ($p=0,618$). Es wurden keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren ($p=0,730$) festgestellt.

1.2.3.3 Peptidtransportraten am Psalterepithel

Auch die Transportraten des Psalterepithels und die zugehörigen elektrophysiologischen Parameter wurden analog zum Pansen durch ihre Gesamt-Mittelwerte in Tab.7 dargestellt. In diesem Fall sind die Transporte J_{ms} , J_{sm} und der Nettotransport J_{net} , sowie die Leitfähigkeit (G_t) nach Mannitzugabe signifikant angestiegen, der Kurzschlußstrom (I_{sc}) ist, über den gesamten Untersuchungszeitraums betrachtet, im Mittel signifikant gefallen.

Tab. 7: Transportraten von D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3-³H] durch das Psalterepithel vor und nach Zugabe von Mannit und zugehörige G_t und I_{sc} (Mittelwerte mit SEM).

	J_{ms} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	J_{sm} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	J_{net} [nmol · cm ⁻² · h ⁻¹]	G_t [mS · cm ⁻²]	I_{sc} [μEq · cm ⁻² · h ⁻¹]	N/n
Kontroll e	8.42 ± 0.49	9.03 ± 1.15	-0.62 ± 1.13	3.19 ± 0.38	1.96 ± 0.17	3/5
Mannit	•25.79 ± 2.66	•20.52 ± 1.76	• 5.27 ± 1.43	•8.07 ± 0.50	• 0.95 ± 0.09	3/5

• = signifikante (p<0,05) Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppe.

Die Darstellung der Mittelwerte für jedes einzelne Epithel vor und nach Zugabe zeigt deutlich die Anstiege der Transportraten (Abb.35-37). Für die Transportrichtung J_{ms} sowie für den Nettotransport wurden signifikante Unterschiede zwischen den in jedem Versuch verwendeten zwei Epithelien (Kontrollgruppe) festgestellt, die die Betrachtung der Kontrollgruppe als Gesamtheit einschränken.

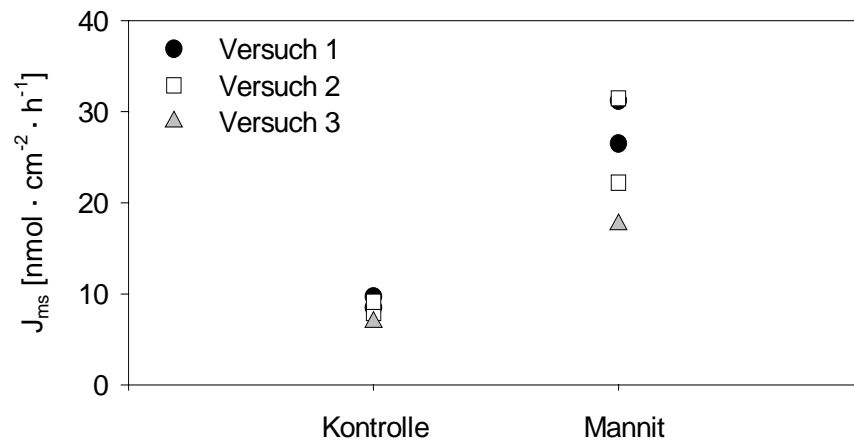


Abb. 35: Transportrichtung J_{ms} am Psalterepithel vor und nach Mannitzugabe (Versuch 4-6). Die an jedem Epithel gemessenen Fluxraten vor und nach Zugabe sind durch ihre Mittelwerte dargestellt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchstieren ($p=0,177$). Es besteht ein Unterschied zwischen den zwei in jedem Versuch verwendeten Epithelien ($p=0,003$), sowie vor und nach Zugabe von Mannit ($p=0,017$).

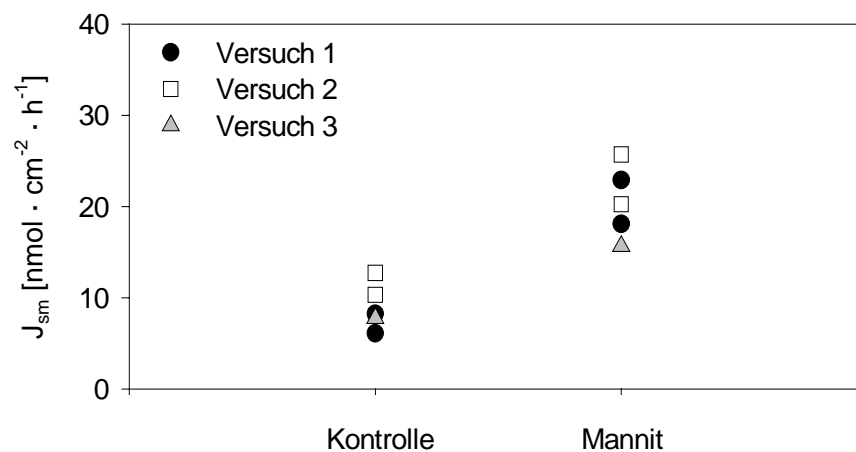


Abb. 36: Transportrichtung J_{sm} am Psalterepithel vor und nach Mannitzugabe (Versuch 4-6). Die an jedem Epithel gemessenen Fluxraten vor und nach Zugabe sind durch ihre Mittelwerte dargestellt. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchstieren ($p=0,135$), sowie zwischen den in jedem Versuch für jede Richtung verwendeten zwei Epithelien ($p=0,109$). Es besteht ein Unterschied für die einzelnen Epithelien vor und nach Zugabe von Mannit ($p=0,010$).

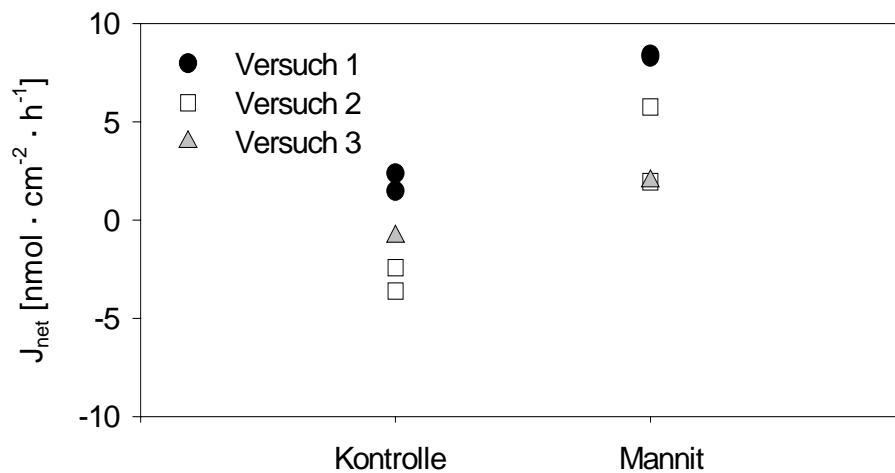


Abb. 37: Nettofluxe am Psalterepithel, vor und nach Mannitzugabe (Versuch 4-6). Dargestellt sind die aus den Mittelwerten jedes Einzelepithels errechneten Nettofluxe. Es besteht ein signifikanter Unterschied vor und nach Mannitzugabe ($p=0,035$). Es wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren ($p=0,019$) festgestellt.

1.2.4 Darstellung der Transportraten in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit (G_t)

Die durch die Mannitzugabe veränderte parazelluläre Leitfähigkeit verursachte sowohl im Pansen als auch im Psalterepithel einen signifikanten Anstieg der Peptidtransportraten. Wenn die Vermutung zutrifft, daß die geringen Transporte für das Peptid überwiegend passiv und sehr wahrscheinlich parazellulär erfolgen, müßten sich Korrelationen zwischen den Transportraten und der G_t ergeben. Daher wurden die Transportraten der Kontrollgruppen, der Gruppen mit Ouabainzugabe und mit Mannitzugabe in Abhängigkeit zur Leitfähigkeit dargestellt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Anstieg der G_t und Anstieg des Transportes darzustellen.

Die Grafiken wurden nach den Transportrichtungen (J_{ms} und J_{sm}) und Gewebearten (Pansen und Psalterepithel) getrennt erstellt.

1.2.4.1 Transport am Pansenepithel von mucosal nach serosal (J_{ms})

Die Kontrollgruppe weist für die Leitfähigkeit Werte zwischen 1,83 und 3,68 $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ auf, die zugehörigen Transportraten liegen zwischen 4,2 und 7,88 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ (Abb.38). Die Gruppe, der die Substanz Ouabain zugegeben wurde, rangiert mit Leitfähigkeiten von 1,87 bis 5,03 $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ und Transportraten zwischen 5,77 und 9,64 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ in einem vergleichbaren Bereich. Höhere Transportraten ergeben sich in der Gruppe, der Mannit zugegeben wurde: Ihre Leitfähigkeiten liegen zwischen 4,6 und 7,73 $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$, die zugehörigen Transportraten zwischen 15,21 und 20,41 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$.

1.2.4.2 Transport am Pansenepithel von serosal nach mucosal (J_{sm})

Die Leitfähigkeiten der Kontrollgruppe variieren sowohl für die niedrigsten Transportraten, die um 6,5 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ betragen, als auch für die höchsten Transporte um 13 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ zwischen 2 und 3 $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ (Abb.39). Die mit Ouabain behandelten Gewebe weisen mit Leitfähigkeiten zwischen 2 und 4 $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ und zugehörigen Transporten von 6,4 bis 12,81 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ vergleichbare Werte auf. Durch die mucosale Zugabe von Mannit erhöhte sich die Gewebeleitfähigkeit (G_t zwischen 4,6 und 7,8 $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$) und entsprechend die Transportraten (zwischen 15,57 und 20,6 $\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$).

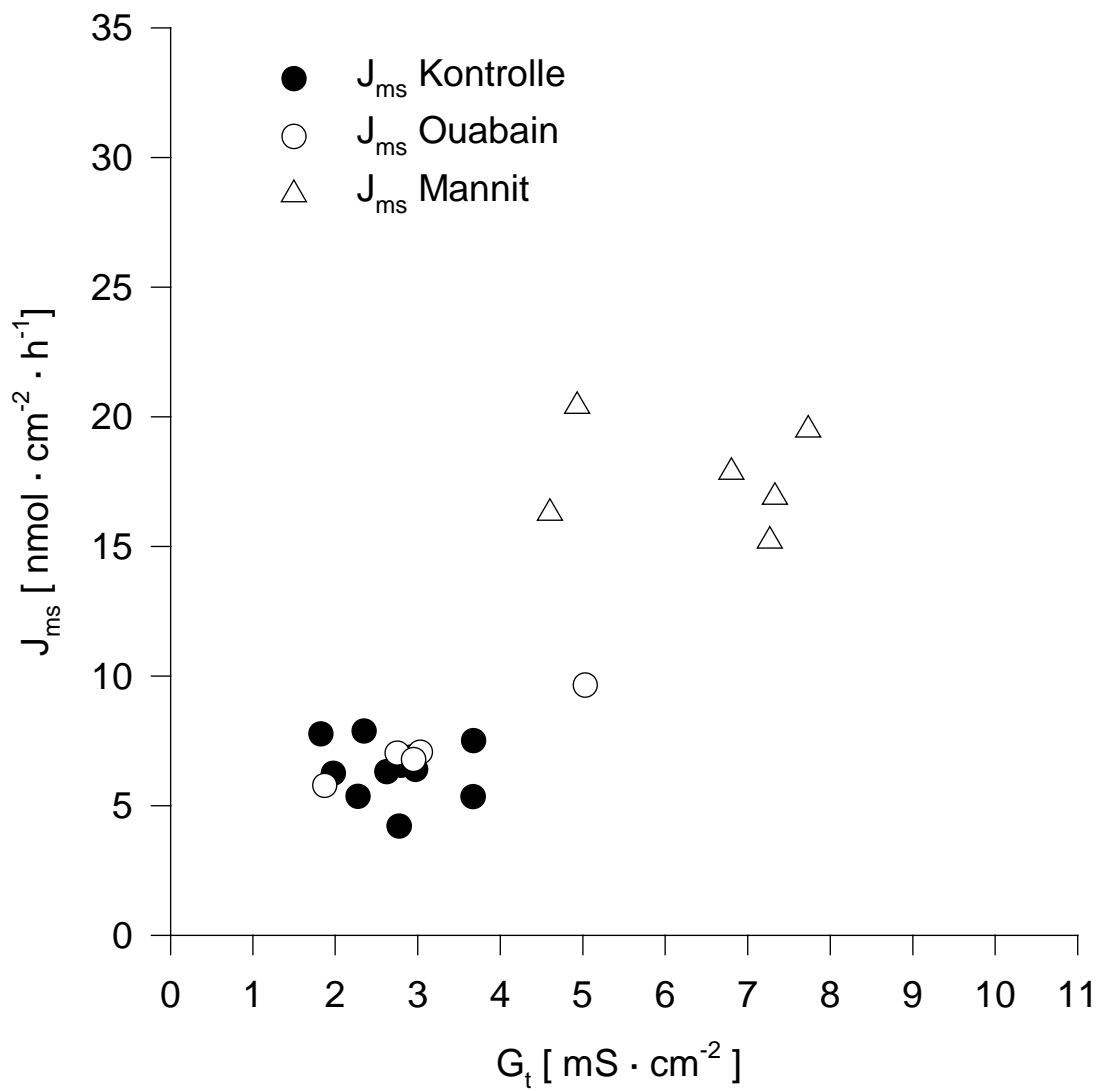


Abb. 38: Darstellung der Transportraten von D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3-³H] durch das Pansenepithel von mucosal nach serosal (J_{ms}) in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit (G_t).

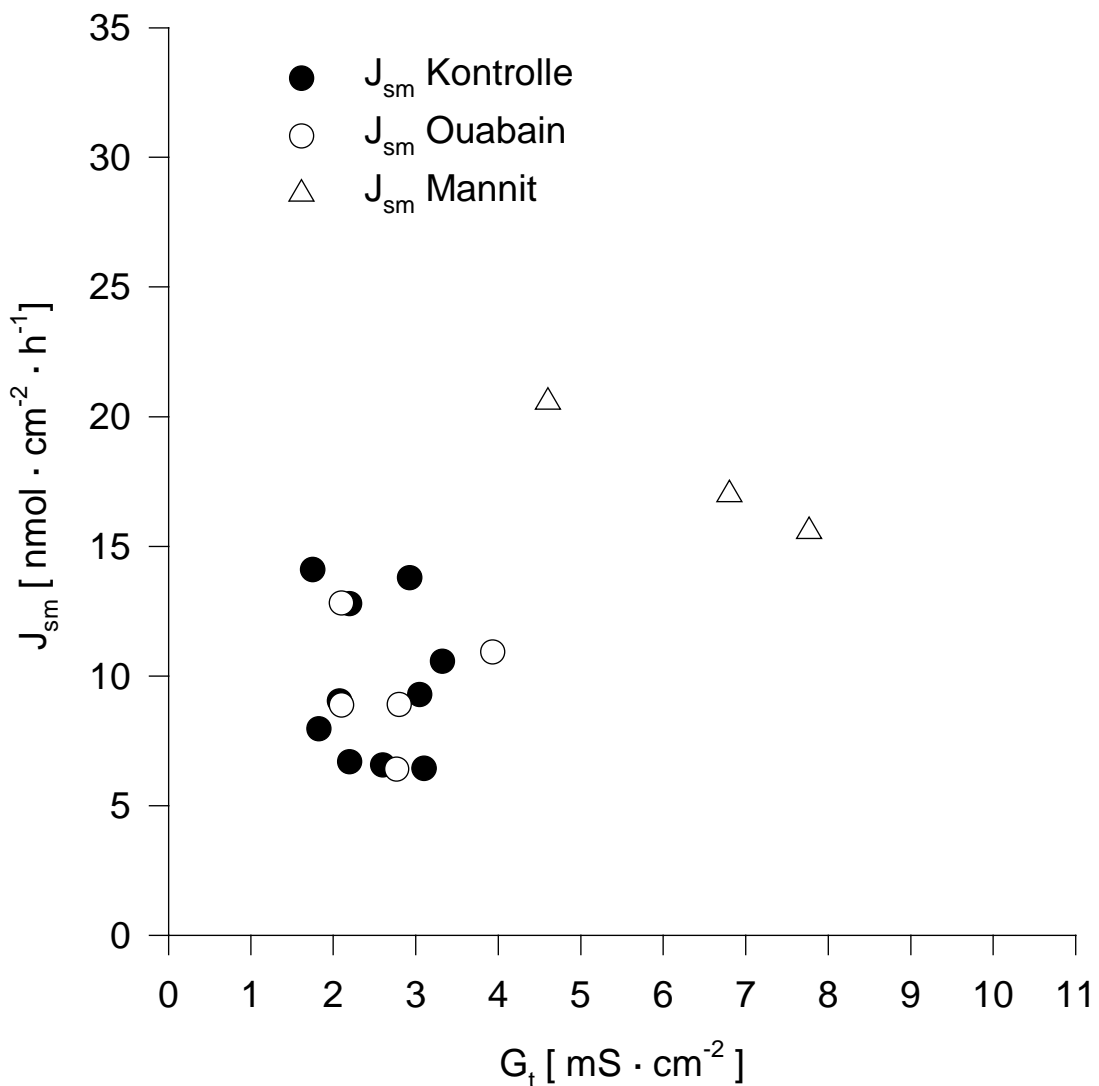


Abb. 39: Darstellung der Transportraten von D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3-³H] durch das Pansenepithel von serosal nach mucosal (J_{sm}) in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit (G_t).

1.2.4.3 Transport am Psalterepithel von mucosal nach serosal (J_{ms})

Die G_t der Kontrollgruppe variieren (bis auf eine Ausnahme von $6,6 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$) zwischen 1 und $3,6 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$, die Transportraten zwischen $4,3$ und $9,7 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ (Abb.40). Nach Zugabe von Ouabain ergaben sich G_t Werte zwischen 2 und $5,4 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$, die Transporte lagen zwischen $5,5$ und $13,3 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Die Mannit-Gruppe ist erneut deutlich erhöht, mit Leitfähigkeiten, die zwischen $7,4$ und $9,6 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ und Transporten deren niedrigster Wert $17,6 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ und höchster Wert $31,2 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ beträgt.

1.2.4.4 Transport am Psalterepithel von serosal nach mucosal (J_{sm})

Die kleinste G_t der Kontrollgruppe mißt $1,1 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$, die größte $3,6 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ (Abb.41). Der geringste Transport liegt bei $5,03 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, der höchste bei $12,75 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Fast entsprechende Werte ergaben sich in der Ouabain-Gruppe mit Leitfähigkeiten zwischen $1,65$ und $5,33 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ und Transporten zwischen $6,4$ und $15,6 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Wiederholt weist die Mannit-Gruppe erhöhte Werte für Leitfähigkeiten und Transporte auf: Für die G_t wurden Werte zwischen $6,43$ und $10,2 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ ermittelt, für die Transportraten ergaben sich Werte zwischen $15,75$ und $22,9 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$.

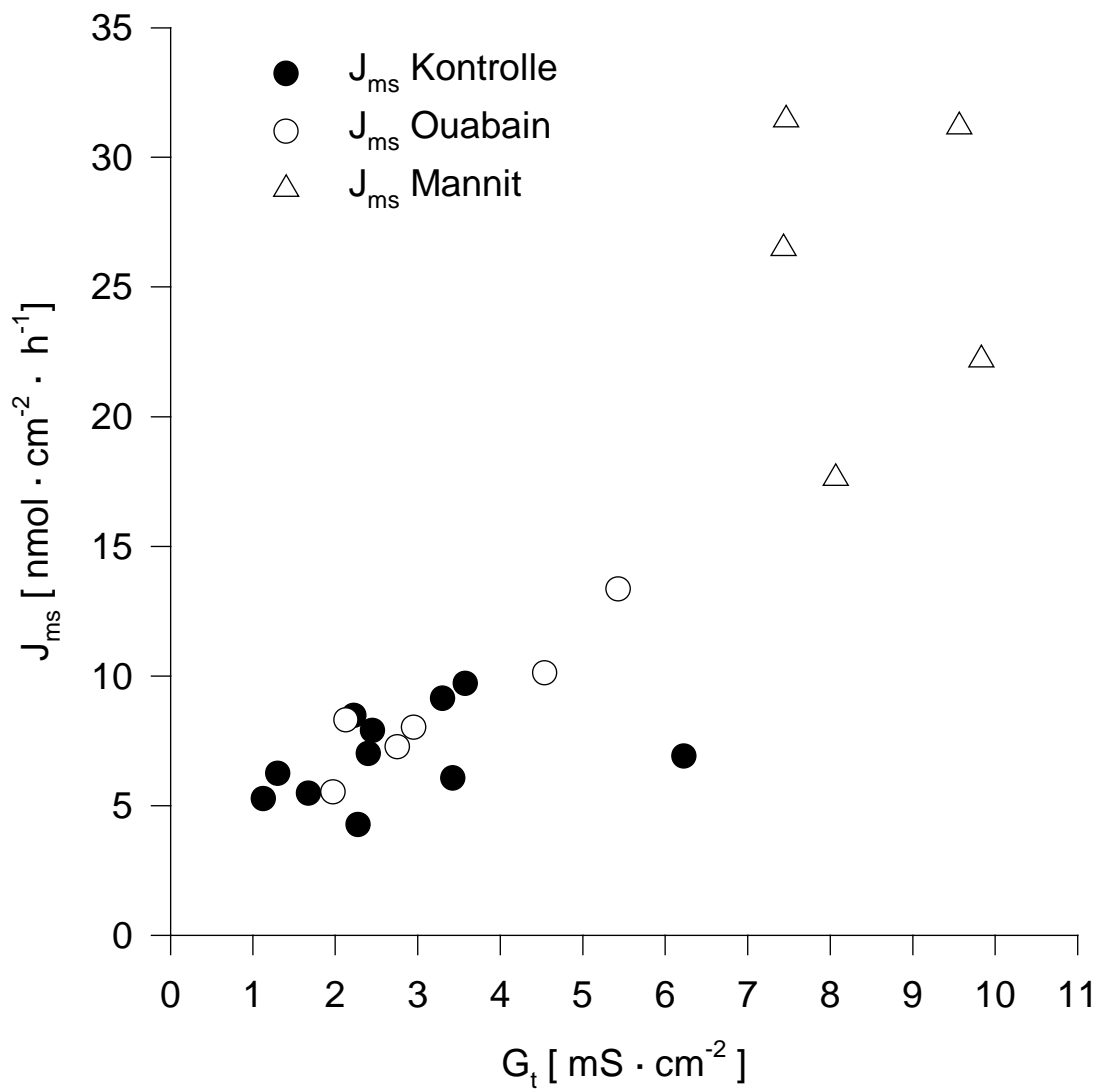


Abb. 40: Darstellung der Transportraten von D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3-³H] durch das Psalterepithel von mucosal nach serosal (J_{ms}) in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit (G_t).

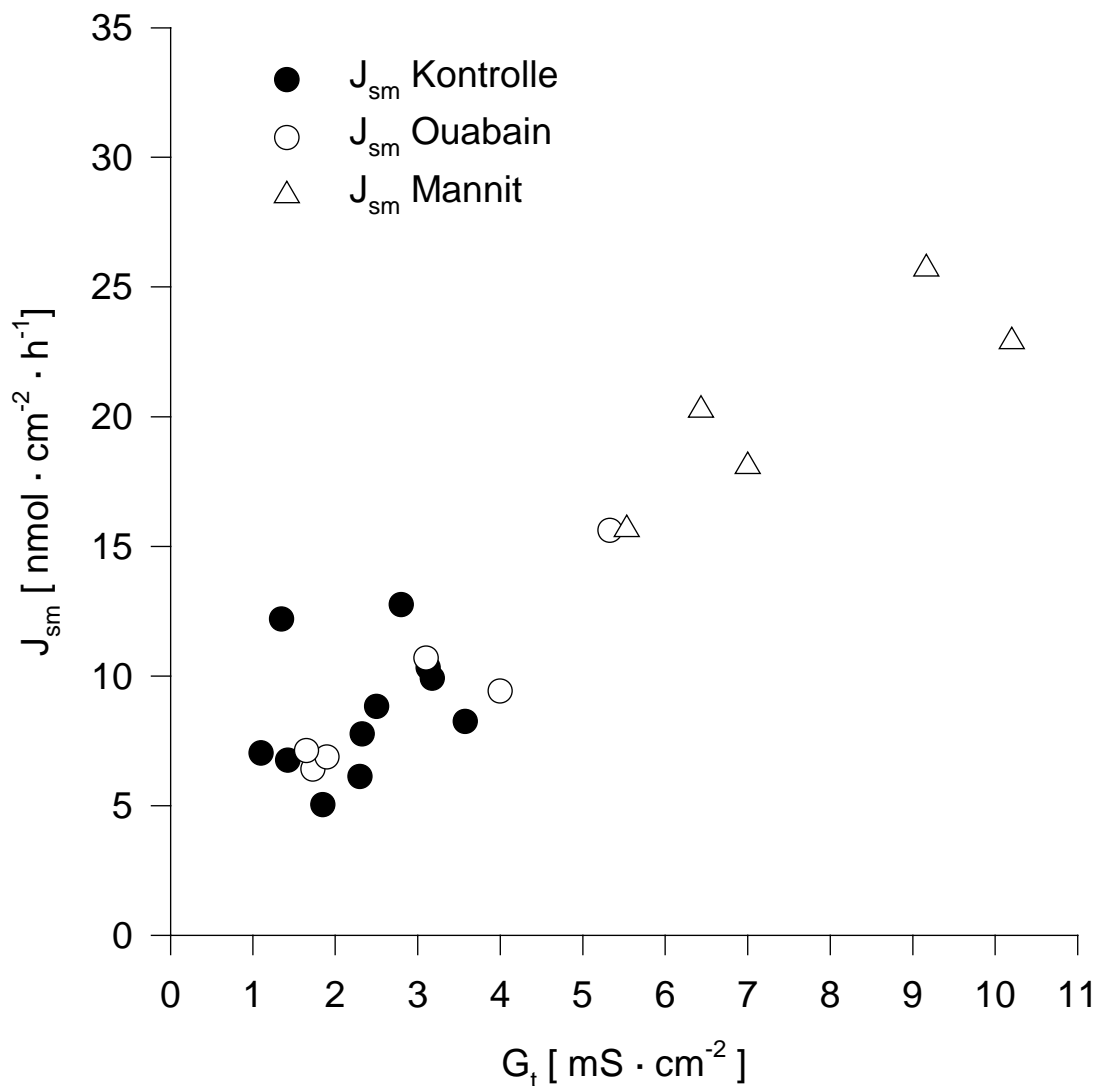


Abb. 41: Darstellung der Transportraten von D-Phenylalanyl-L-Alanin [2,3-³H] durch das Psalterepithel von serosal nach mucosal (J_{sm}) in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit (G_t).

1.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Messung der Transportraten von radioaktiv markiertem Peptid

Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß ein Peptidtransport sowohl von mucosal nach serosal als auch von serosal nach mucosal stattgefunden hat. Der aus beiden Transportrichtungen errechnete Nettoflux besaß in den Untersuchungen ohne Zugabe von Ouabain oder Mannit am Pansen wie auch am Psalterepithel ein negatives Vorzeichen (Tab.2

und 3). Das bedeutet, daß die Transportrichtung J_{sm} überwiegt, entspräche also dem Vorgang der Sekretion.

Die Darstellung der durch Addition ermittelten Gesamttransporte zu den verschiedenen Meßzeitpunkten zeigte einen größeren Streuungsbereich der Werte der Richtung J_{sm} als für die Gegenrichtung J_{ms} . Dies war sowohl am Pansen als auch am Psalterepithel der Fall (Abb.20-23).

Nach Ouabainzugabe zeigte sich am Psalterepithel ein signifikanter Abfall des I_{sc} , sonst blieb die Elektrophysiologie unverändert. Es kam nach Ouabainzugabe am Pansenepithel (Tab.4) zu keiner signifikanten Veränderung der Transporte in Richtung J_{ms} und J_{sm} sowie des Nettotransportes. Am Psalterepithel wurde J_{ms} nach Zugabe leicht erhöht, J_{sm} und J_{net} unterlagen keiner signifikanten Veränderung (Tab.5).

Durch die mucosale Zugabe von Mannit erhöhte sich am Pansenepithel die Leitfähigkeit und am Psalterepithel G_t und I_{sc} (Abb.30 und 31). Beide Gewebearten wiesen nach Mannitzugabe eine signifikante Erhöhung der unidirektionalen Transportraten (J_{ms} und J_{sm}) auf, der Nettotransport (J_{net}) wurde dagegen nur am Psalterepithel erhöht (Tab. 6 und 7).

Die Darstellung der Transportraten in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit zeigt deutlich den Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Leitfähigkeit durch Mannitzugabe und steigenden Transportraten für das Peptid (Abb.38-41).

1.3 Messung des intrazellulären pH (pH_i) an isolierten Zellen des Panseneithels

Der in Epithelzellen von Dünndarm und Niere nachgewiesene Peptidtransporter bewirkt bei der Substrataufnahme durch die Kopplung des Transports an Protonen eine Erhöhung der intrazellulären H^+ -Ionen Konzentration. Damit kommt es zu einer Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes. An Zellen des Dünndarms wurde in zahlreichen Versuchen ein Absinken des intrazellulären pH-Wertes nach Zugabe von Peptiden zu einem umgebenden Medium nachgewiesen (siehe Kap.1.). STEWART et al. (1999) führten Untersuchungen über den intrazellulären pH-Abfall an Mäuseenterocyten durch. Phenylalanyl-Alanin wurde in verschiedenen Konzentrationen (0,1-20 mmol/l) zugegeben, die ein unterschiedlich starkes Absinken des pH_i zur Folge hatten. Die Zugabe von 1mmol/l Peptid führte zu einem Abfall des intrazellulären pH von 7,36 auf 7,25 (Mittelwerte). 0,5 mmol/l ließen den pH_i von 7,37 auf 7,32 sinken. Nach Zugabe von 10 mmol/l fiel der pH_i um $0,16 \pm 0,09$ pH Einheiten.

Die Untersuchungen des Peptidtransport an BCEFC gefärbten Monolayern der humanen Darmzelllinie Caco-2 ergaben einen Abfall des intrazellulären pH von 7,4 auf 7,1 nach Zugabe von 20 mmol/l Gly-Sar bei einem extrazellulären pH von 6,0 auf der apikalen Seite der Zellen. Bei einem extrazellulären pH von 7,4 verringerte sich der pH_i nach Zugabe von Gly-Gln um ca. 0,05 pH Einheiten (THWAITES et al., 1993).

Simultane Messungen des Membranpotentials und des intrazellulären pH-Wertes an *Xenopus leavis* Oocyten mit exprimiertem pepT2-Transportprotein zeigten, daß nach Zugabe von 2,5 mmol/l Cefadroxil bei einem extrazellulären pH von 6,5 zuerst eine Depolarisation der Zellmembran und danach ein Abfall des intrazellulären pH-Wertes um 0,5 pH-Einheiten erfolgten (BOLL et al.1994,).

Auch in den Versuchen von MATTHEWS, et al.(1996), die ein exprimiertes Transportprotein in *X.l.*-Oocyten untersuchen, erzeugt Peptidzugabe zu einem umgebenden Medium einen Abfall des intrazellulären pH.

1.3.1 Messung des pH_i bei einem Umgebungs pH von 7,4

Die Messungen wurden zuerst bei einem pH von 7,4 des umgebenden Mediums über einen Zeitraum von 10 min durchgeführt, um osmotische Effekte auf die isolierten Panseneithelzellen ausschließen zu können.

Nach 5min (300sec) wurde der Pufferlösung das Peptid in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Abb.42 zeigt den Verlauf des mittleren pH_i vor und nach Zugabe von Peptid (MW und SEM).

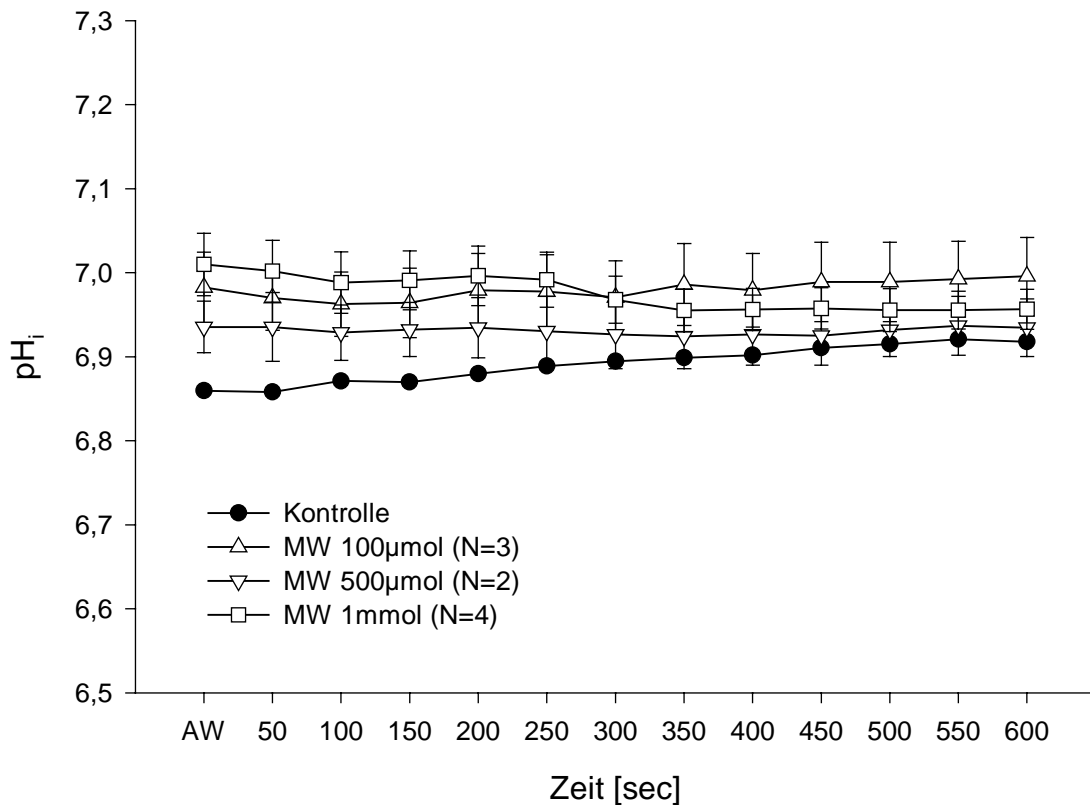


Abb. 42: Verlauf des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) nach Zugabe verschiedener Peptidkonzentrationen zu einem umgebenden Medium mit dem pH 7,4 (Mittelwerte und SEM).

Nach der Zugabe von 100µmol/l fiel der mittlere pH_i von $6,97 \pm 0,04$ auf $6,99 \pm 0,05$ am Meßzeitpunkt 350 sec., nach Zugabe von 500µmol/l erfolgt ein Abfall von $6,93 \pm 0,04$ auf $6,92 \pm 0,04$. Wurde der Pufferlösung 1 mmol/l Peptid zugefügt fiel der pH_i von $6,97 \pm 0,03$ auf $6,95 \pm 0,03$ am nächsten Meßzeitpunkt. Keine der erfolgten Veränderungen des pH_i ist von signifikanter Größe.

1.3.2 Messung des pH_i bei einem Umgebungs pH von 6,4

Um den zum Zellinneren gerichteten Protonengradienten zu erhöhen und damit die Triebkraft des Transportprozesses zu verstärken, wurde der pH-Wert der umgebenden Pufferlösung kurz

vor Beginn der Messung auf 6,4 gesenkt. Die Peptidzugabe erfolgte zum Zeitpunkt 300 sec in Konzentrationen von jeweils 100 $\mu\text{mol/l}$, 500 $\mu\text{mol/l}$ und 1 mmol/l . In Abb.43 ist zu erkennen, daß kein Abfall des mittleren pH_i nach Zugabe von Peptid erfolgt, sondern der intrazelluläre pH stetig über den gesamten Meßzeitraum fällt.

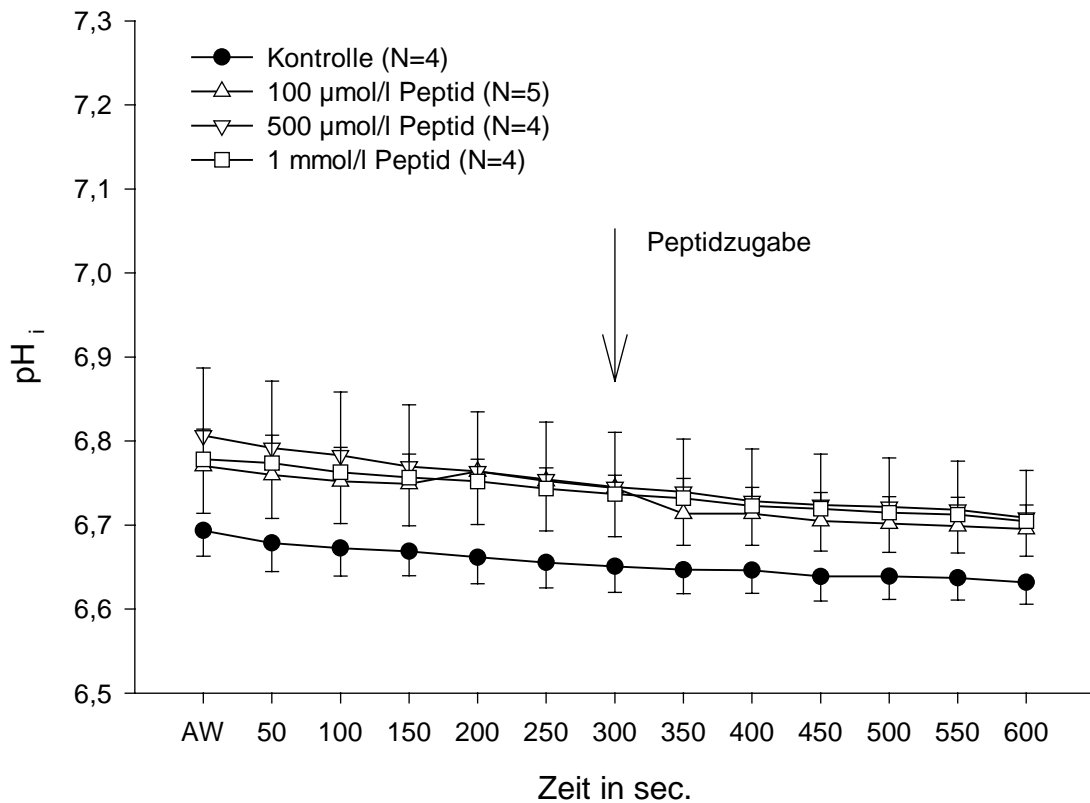


Abb. 43: Verlauf des intrazellulären pH-Wertes (pH_i) nach Zugabe verschiedener Peptidkonzentrationen zu einem umgebenden Medium mit dem pH 6,4 (Mittelwerte und SEM).