

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie

des Fachbereiches Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

IN VITRO UNTERSUCHUNGEN DES PANSENEPITHELS VON SCHAFEN ZUR CHARAKTERISIERUNG EINES ELEKTROGENEN, CALCIUM-SENSITIVEN NATRIUMTRANSPORTES

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

vorgelegt von
Maria Katharina Rübbelke
Tierärztin aus Lippstadt

Berlin 1998

Journal - Nr. : 2169

Gefördert durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft

Publiziert mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ. - Prof. Dr. K. Hartung

Erster Gutachter: Univ. - Prof. Dr. H. Martens

Zweiter Gutachter: Univ. - Prof. Dr. O. Simon

Tag der Promotion: 8. Mai 1998

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

1 EINLEITUNG

2 LITERATUR

2.1 Pansen

2.1.1 Natriumtransport

2.1.2 Mechanismen des Natriumtransportes

2.1.3 Kurzschlußstrom und elektrogener Natriumtransport

2.2 Elektrogener Natriumtransport anderer Epithelien

2.2.1 Allgemeines

2.2.2 Amilorid-Sensitivität

2.2.3 Amilorid-Insensitivität

2.2.4 Calcium-Sensitivität

2.2.5 Regulationsmechanismen

2.2.5.1 Natriumkonzentration

2.2.5.2 Calciumkonzentration

2.2.5.3 cAMP

2.2.5.4 Aldosteron

2.3 Zusammenfassung für die eigene Fragestellung

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere

3.2 Entnahme, Präparation und Behandlung der Gewebe

3.3 Versuchsaufbau

3.4 Elektrische Messungen

3.4.1 voltage-clamp

3.4.2 open-circuit

3.4.3 short-circuit

3.5 Versuchsablauf

3.5.1 Elektrophysiologische Messungen

3.5.2 Ionenflussmessungen

3.6 Berechnungen

3.6.1 Ionenfluxe

3.6.2 PD_t -abhängige und PD_t -unabhängige Fluxkomponenten

3.7 Lösungen und Chemikalien

3.8 Statistik

4 ERGEBNISSE

4.1 Allgemeine Vorversuche

4.1.1 Kurzschlußstrom mit und ohne Calcium in der mukosalen Lösung

4.1.2 Stabilität der elektrophysiologischen Parameter

4.2 Transport von Natrium

4.2.1 Unidirektionale Transportraten

4.2.2 Einfluß transepithelialer Potentialdifferenzen auf den Natriumtransport

4.2.3 Unidirektionale Mannittransportraten

4.3 Elektrophysiologische Messungen

4.3.1 Unterschiedliche Natriumkonzentrationen

4.3.2 Natrium und andere monovalente Kationen

4.3.3 Einfluß verschiedener divalenter Kationen

4.4 Charakterisierung des hemmenden Calciumeffektes

4.4.1 Zeitlicher Verlauf der Calcium-Hemmung

4.4.2 Konzentrationsabhängigkeit

4.4.3 Kinetik

4.5 Wirkung von Amilorid, Theophyllin und Aldosteron

4.5.1 Amiloridsensitivität

4.5.2 Theophyllin

4.5.3 Aldosteron

5 DISKUSSION

5.1 Methodenkritik

5.2 Diskussion der eigenen Ergebnisse

5.2.1 Elektrogener Na-Transport des Pansens im Vergleich zum klassischen

5.2.2 NSCC und Na-Transport am Schafpansen

5.2.2.1 NSCC in Geweben mit amiloridsensitivem Natriumtransport (Gr. I)

5.2.2.2 NSCC in Geweben mit amilorid- und divalentinsensitivem Natriumtransport (Gruppe II, III.)

5.2.3 Kurzschlußstrom (I_{sc}) und Leitfähigkeit (G_t)

5.2.4 Nicht selektive Kationenkanäle (NSCC) - Allgemeine Merkmale und Verschiedenartigkeiten

5.2.4.1 Selektivität

5.2.4.2 Divalente Kationen

5.2.4.3 Sättigung

5.2.5 Physiologische Bedeutung des NSCC im Pansenepithel

6 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

7 LITERATURVERZEICHNIS

8 ANHANG

ABKÜRZUNGEN

Der in dieser Arbeit verwendete allgemeine Begriff "Epithel" bezeichnet das untersuchte Pansenepithelgewebe mit den darunterliegenden Schichten der Mucosa, streng histologisch wurde die Pansenschleimhaut untersucht.

cAMP	=	cyclisches 3', 5'- Adenosin - Mono - Phosphat
DMSO	=	Dimethyl-Sulfoxid
EGTA	=	Ethylen-Glykol-Tetra-Essigsäure
HEPES	=	(N-[2-Hydroxyethyl] Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure])
HEEDTA	=	(N-Hydroxyethylen-Diamintriessigsäure)
G_t	=	Leitfähigkeit [$\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$]
I_{sc}	=	Kurzschlußstrom [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]
$\text{Diff} I_{sc}$	=	$(I_{sc} - Ca) - (I_{sc} + Ca)$ [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]
PD_t	=	transepitheliale Potentialdifferenz [mV]
R_t	=	transepithelialer Widerstand [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]
J_{ms}^{Na}	=	Natriumflux von mukosal nach serosal [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]
J_{sm}^{Na}	=	Natriumflux von serosal nach mukosal [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]
J_{net}^{Na}	=	Natriumnetttransport [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]
NSCC	=	Nicht - selektiver Kationenkanal (n on s elective c ation c hannel)
Pd_t	=	transepitheliale Potentialdifferenz [mV]
+ x ↓	=	Zugabezeitpunkt der Substanz x
- x ↓	=	Entzugzeitpunkt der Substanz x

1 EINLEITUNG

Der Pansen ist mit etwa 80% der größte Teil des insgesamt vierteiligen Vormagensystems der Wiederkäuer. Durch diese verdauungsphysiologische Besonderheit sind die Wiederkäuer in der Lage, z.B. Zellulose und Pektin mit Hilfe von Mikroorganismen aufzuschließen und in Form von flüchtigen Fettsäuren für ihren Energiehaushalt zur Verfügung zu stellen. Durch das mehrschichtige, verhornte Plattenepithel der Pansenwand erfolgt in diesem Vormagenbereich neben der Resorption der Fermentationsprodukte auch der Transport von Elektrolyten und Wasser.

Allgemein ermöglichen Epithelgewebe mit Hilfe der unterschiedlichsten Transportmechanismen den Transport bestimmter Stoffe und Elektrolyte. Bezüglich der Passageroute werden *parazelluläre* und *transzelluläre* Wege unterschieden.

Der einfache *parazelluläre* Weg, der sogenannte *shunt*, wird durch *tight junctions* der *Zonula occludens* über den Interzellularraum ermöglicht. Dieser Passageweg ist von großer Wichtigkeit in Epithelien, die als *leaky* bezeichnet werden, wie z. B. Dünndarm, Gallenblase oder proximaler Nierentubulus. Der sehr geringe parazelluläre elektrische Widerstand läßt Wasser und Elektrolyte durch einfache Diffusion passieren (POWELL, 1981). Neben der transepithelialen Potentialdifferenz unterliegt die Diffusion durch den *shunt* noch anderen Einflüssen, wie dem osmotischen und hydrostatischen Druck, dem *solvent drag* (Mitreißen von gelösten Stoffen beim Wassertransport) und dem chemischen Gradienten über dem Gewebe.

Transzelluläre Transportvorgänge, die an allen Epithelien in unterschiedlichen Ausmaßen nachgewiesen sind, gewinnen quantitativ gegenüber den parazellulären Passagewegen an Bedeutung in Geweben, die als mäßig dicht (*moderate tight*) oder dicht (*tight*) bezeichnet werden. Der transzelluläre Transport wird über die äußere (apikale, mukosale, lumenale) Zellmembran durch die Zelle zur inneren (basolateralen, serosalen, interstitiellen) Zellmembran mit Hilfe spezieller Transportsysteme ermöglicht. Im Hinblick auf den elektrogenen Na-Transport befinden sich in der apikalen Zellmembran Kanäle, die den Natriumeintritt in die Zelle zulassen. Auf der basolateralen Seite werden die Natriumionen mit Hilfe der Na⁺/K⁺-ATPase wieder ausgeschleust (SMITH u. BENOS, 1991). Epithelien mit fast ausschließlich transzellulären Ionenbewegungen finden sich z. B. in der Harnblase und im Nierensammelrohr. Das Pansenepithel muß als *moderate tight* angesehen werden. Der überwiegende Teil des Stofftransportes erfolgt transzellulär.

Schon in den ersten in vivo Untersuchungen über den Transport von Elektrolyten durch das Pansenepithel wird ein aktiver, in Richtung Blut gehender Natriumtransport beschrieben (DOBSON, 1959; HYDÉN, 1961; PARTHASARATHY, 1952; SPERBER u. HYDÉN, 1952). Spätere in vitro Untersuchungen bestätigen diese Beobachtungen (CHIEN u. STEVENS, 1972; FERREIRA et al., 1972; STEVENS, 1964).

Die Annahme eines elektrogenen Natriumtransportes ergab sich aus folgenden Beobachtungen: Ersatz von Natrium in der Pufferlösung eliminierte den Kurzschlußstrom (CHIEN u. STEVENS, 1972); die gleiche Veränderung zeigte sich durch die serosale Zugabe von Ouabain (FERREIRA et al., 1972). Wenn ferner die Versuchsbedingungen so gewählt wurden, daß kein Anionentransport stattfand, dann stimmte der Kurzschlußstrom (I_{sc}) mit dem Nettonatriumtransport überein (HENSELEIT, 1991).

Elektrogene Natriumtransportsysteme werden seit Jahrzehnten in der Literatur für verschiedene Spezies in verschiedenen Organsystemen beschrieben (siehe Review GARTY u. PALMER, 1997), wie z. B. an der Krötenhaut von NAGEL u. KATZ (1991), am Meerschweinchencolon von CLAUSS et al. (1985) und an Zellkulturen von LING u. EATON (1989). Diese Systeme zeichnen sich dadurch aus, daß der Natriumkanal in der apikalen Membran durch Amilorid gehemmt wird und durch Aldosteron stimuliert werden kann (GARTY u. PALMER, 1997).

Darüber hinaus werden, unter anderem bei Van DRIESSCHE (1987), elektrogene Natriumtransportmechanismen beschrieben, die, wie HENSELEIT (1991) auch an Pansenepithelien feststellte, nicht durch Amilorid hemmbar sind. Unabhängig von diesen Beobachtungen ist bekannt, daß durch die Entfernung von Calcium und Magnesium aus der mukosalen Pufferlösung ein elektrogener Natriumtransport in verschiedenen Geweben aktiviert wird (Van DRIESSCHE, 1987). Offensichtlich existiert ein derartiges Transportsystem auch im Pansenepithel von Schafen. LEONHARD et al. (1990) beobachteten in ihren in vitro Studien mit Pansenepithelien von Schafen, daß die Entfernung von Calcium und Magnesium aus der mukosalen Pufferlösung den Kurzschlußstrom erheblich verstärkt. Erneute Zugabe von Calcium oder Magnesium blockieren diese Zunahme reversibel.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch in vitro Untersuchungen mit Hilfe der Ussing-Kammer-Methode (USSING, 1949) den calcium-sensitiven Anteil des elektrogenen Natriumtransportes am Pansenepithel von Schafen zu bestimmen und näher zu beschreiben.

2 LITERATUR

2.1 Pansen

2.1.1 Natriumtransport

Die ersten Erkenntnisse über den Natriumtransport am Pansen ergaben sich aus in vivo Untersuchungen. Ein Transport von Natrium aus dem Pansen der Ziege ins Blut wird von SPERBER u. HYDÉN (1952) beschrieben, beim Schaf einige Jahre darauf von HYDÉN (1961) veröffentlicht. PARTHASARATHY (1952) kann durch Messungen von Ionenbewegungen nachweisen, daß Natrium entgegen einem Konzentrationsgradienten resorbiert wird. In vivo Untersuchungen an anästhesierten Schafen durch DOBSEN (1959) zeigen zum ersten Mal, daß ein aktiver Natriumtransport gegen einen Konzentrations- und Potentialgradienten stattfindet. Diese Eigenschaft des Pansenepithels wurde später durch in vitro Untersuchungen mit Pansenepithelien von Kuh und Ziege (STEVENS, 1964), sowie für den Schafpansen (FERREIRA et al., 1964) bestätigt. Übereinstimmend wurde dabei festgestellt, daß Natrium auch unter Kurzschlußstrombedingungen aktiv durch das Epithel von der mukosalen zur serosalen Seite transportiert wird. Neuere in vitro Untersuchungen bestätigen diese Eigenschaften (MARTENS u. GÄBEL, 1988; SCHARRER et al., 1983 und STROZYK, 1987). Diese und neuere Arbeiten von HENSELEIT (1991) und VOGLER (1991) lassen die Differenzierung des Natriumtransportes in einen elektroneutralen und einen elektrogenen Anteil zu. Aus den Ergebnissen ist zu ersehen, daß unter physiologischen Bedingungen die weitaus größte Menge des Natriums elektroneutral mit Hilfe eines Na^+/H^+ -Austauschsystems transportiert wird. Nur ein geringer Anteil der Ionenbewegung erfolgt elektrogen über das Pansenepithel.

2.1.2 Mechanismen des Natriumtransports

Für die nähere Beschreibung der Natriumtransportmechanismen wurden Ionenersatzexperimente durchgeführt. Danach scheint Natrium apikal zum größten Teil elektroneutral in die Zelle zu gelangen. Das bestätigten CHIEN u. STEVENS (1972), FERREIRA et al. (1972) und MARTENS et al. (1987), indem sie feststellten, daß der Natriumnettotransport deutlich höher ist als der Kurzschlußstrom. STEVENS (1964) schlußfolgerte aufgrund der Berechnungen der partiellen Natriumleitfähigkeit, daß ein Teil des Natriums durch Cotransporte oder durch Austauschsysteme transportiert werden muß. Dies bedeutet, daß für den Ausgleich der Ladungen zusätzlich Anionen resorbiert oder Kationen sezerniert werden müssen. Diese Schlußfolgerung wird durch Versuche unterstützt, in denen Anionen ersetzt werden.

CHIEN u. STEVENS (1972) sowie STROZYK (1987) wiesen durch den Ersatz von Chloridionen (Cl^-), Bicarbonat (HCO_3^-) oder den Austausch beider Anionen deutlich verminderte Natriumtransportraten nach. Wenn, wie bei CHIEN u. STEVENS (1972) und HARRISON (1971), Natrium ersetzt wird, kommt es zu einer starken Absenkung des Chloridtransportes.

Anhand dieser Befunde, die die Wechselwirkungen zwischen dem Natrium- und dem Anionentransport aufzeigen, beschreibt STEVENS (1973) ein Modell, das entweder einen Na^+/Cl^- Cotransport oder ein Na^+/H^+ - und ein $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschsystem beinhaltet.

MARTENS u. GÄBEL (1988) schlossen einen direkten Na^+/Cl^- -Cotransport aus, weil Hemmstoffe dieser Transportsysteme ohne Wirkung blieben. Da Amilorid in einer Konzentration von 1 mM den Natriumtransport signifikant hemmte, kommen MARTENS et al. (1991) zu dem Schluß, daß der elektroneutrale Natriumtransport durch ein Na^+/H^+ - Austauschsystem in der luminalen Membran vermittelt wird, das wahrscheinlich mit einem Anionenaustauscher ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$)gekoppelt ist.

In anderen Experimenten mit dem Na^+/K^+ -ATPase-Hemmer Ouabain wurde durch HARRISON et al.

(1975) festgestellt, daß ein Teil des Chloridtransportes mit Natrium verbunden ist. Durch die serosale bzw. basolaterale Zugabe von Ouabain wurde der Natriumnetttransport aufgehoben. Dagegen hatte die mukosale bzw. apikale Ouabain-Zugabe keinerlei Effekt auf den Natriumtransport. Dies bestätigte die Annahme, daß im Pansen, wie auch bei anderen Epithelien, an der basolateralen Seite Natrium durch die Na^+/K^+ -ATPase aus der Zelle herausgepumpt wird.

2.1.3 Kurzschlußstrom und elektrogener Natriumtransport

Neben dem elektroneutralen Anteil des Natriumtransportes existiert ein elektrogener Anteil. Schon in den ersten in vitro Untersuchungen unter Kurzschlußstrombedingungen bei STEVENS (1964) wurde ein positiver Strom beobachtet, der aber immer geringer war als der gleichzeitig gemessene Natriumtransport. Die Stromwerte entsprachen der Gesamtrate der aktiv in Richtung Blut transportierten Kationen bzw. den in Lumenrichtung transportierten Anionen. In Ionenersatzversuchen von CHIEN u. STEVENS (1972) wurde eine fast völlige Abhängigkeit des Kurzschlußstromes von der Anwesenheit von Natrium festgestellt. In Versuchen mit Pufferlösungen, in denen Natrium durch Cholin bzw. Kalium ersetzt worden war, sank der Kurzschlußstrom auf Null (K^+) oder nahe Null (Cholin). Wurde Cl^- oder Cl^- und HCO_3^- durch SO_4^{2-} ersetzt, entsprach der Natriumtransport annähernd dem Kurzschlußstrom, während der Ersatz von Chlorid durch Acetat zu einer Differenz zwischen gemessenem Kurzschlußstrom und der Natriumnetttransportrate führte. Auch bei FERREIRA et al. (1972) ergab sich mit dem Ersatz von Chlorid durch Sulfat eine Differenz zwischen den Stromwerten und den Natriumtransportraten. STROZYK (1987) machte deutlich, daß sowohl bei Chloridersatz als auch bei Bicarbonatersatz der Natriumnetttransport sank, ohne den Kurzschlußstrom zu verändern. Auch der Austausch beider Ionen erbrachte keine Transportraten, die den Stromwerten entsprochen hätten. GÄBEL (1988) und MARTENS u. GÄBEL (1988) arbeiteten mit Pufferlösungen, denen sowohl die permeablen Anionen Cl^- und HCO_3^- als auch die kurzkettigen Fettsäuren entzogen waren und stellten damit beim Vergleich von Natriumnetttransport und Kurzschlußstrom annähernd gleiche Werte fest (s. **Tab. 1**).

Der elektrogene Natriumtransport wird offensichtlich über einen amiloridinsensitiven Natriumkanal vermittelt. Bei HENSELEIT (1991), MARTENS et al. (1987) und MARTENS u. GÄBEL (1988) zeigten sich bei den sonst hemmend wirkenden Konzentrationen von 1 mM Amilorid auf den Na^+/H^+ -Austauscher bzw. 0,1 mM Amilorid auf Natriumkanäle keine Auswirkungen auf die Natriumnetttransportrate (BENOS, 1982).

Tab.1 Werte für Na^+ - Nettotransport ($J_{\text{Na}_{\text{net}}}$) und Kurzschlußstrom (I_{sc}) nach Austausch verschiedener Substanzen

$J_{\text{Na}_{\text{net}}}$	I_{sc}	Austausch	Autoren
0.7	0.8	Cl I	CHIEN u. STEVENS, 1972
0.8	0.56	Cl II	CHIEN u. STEVENS, 1972
1.10	0.57	Cl I	FERREIRA et al., 1972
2.11	1.09	Cl III	STROZYK, 1987
1.0	0.5	HCO_3^-	CHIEN u. STEVENS, 1972
3.48	0.79		STROZYK, 1987

2.18	0.96	SCFA	GÄBEL, 1988
0.6	0.64	Cl ⁻ + HCO ₃ ⁻	CHIEN u. STEVENS, 1972
2.42	1.30		STROZYK, 1987
0.64	0.82	Cl ⁻ + HCO ₃ ⁻	GÄBEL, 1988
0.60	0.54	SCFA	MARTENS u. GÄBEL, 1988

Kurzschlußstrom- und Fluxwerte [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$], I = mit SO₄²⁻, II = mit Acetat, III = mit Gluconat

Modellvorschlag für den Na-Transport im Pansenepithel:

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich am besten mit der Annahme von zwei Transportmechanismen, elektroneutral und elektrogen, für Natrium vereinbaren. Natrium gelangt überwiegend elektroneutral (> 62% des Natriumnettotransportes; GÄBEL, 1988), über einen Na⁺/H⁺- Austausch in die Zelle und wird basolateral durch eine Na⁺/K⁺-ATPase wieder ausgeschleust. Ein kleinerer Teil des Natriums gelangt auf der apikalen Seite durch einen elektrogenen, für Amilorid unempfindlichen Natriumkanal in die Epithelzelle. Dieser Transport wird offensichtlich durch die Entfernung divalenter Kationen (Ca²⁺ und Mg²⁺) verstärkt aktiviert.

2.2 Elektrogener Natriumtransport anderer Epithelien

2.2.1 Allgemeines

An dichten und mäßig dichten Geweben werden Natriumionen elektrogen resorbiert. Diese nach POWELL (1981) als *tight* bzw. *moderately tight* bezeichneten Epithelien haben, wie bei SCHULTZ (1986) beschrieben, an der apikalen Membran einen sehr viel größeren elektrischen Widerstand als an der basolateralen Membran. Damit werden die apikal in die Zelle eintretenden Natriumionen zum limitierenden Faktor im gesamten transzellulären Ionentransport. Epithelien mit elektrogenem Na-Transport finden sich z. B. bei Kaninchen in der Harnblase (LEWIS u. DIAMOND, 1976) und im Colon (FRIZZELL et al., 1976), in der Haut des Frosches (MacKNIGHT et al., 1980; NAGEL, 1976) sowie in der Harnblase der Kröte (PALMER et al., 1982), dem Hühnercolon (CLAUSS u. SKADHAUGE, 1988) und dem Colon bei Fröschen der Gattung *Rana* (KRATTENMACHER u. CLAUSS, 1988).

Bereits USSING (1949) gelang der Nachweis eines aktiven Natriumtransportes durch die Froschhaut. In der nach ihm benannten Ussing-Kammer war es möglich, den Na-Transport unabhängig von elektrischen und chemischen Gradienten nachzuweisen. So konnte gezeigt werden, daß am Gewebe ein Strom entstand, der unter bestimmten Bedingungen mit dem Natriumtransport übereinstimmte. Dieses Modell hat nach wie vor seine Gültigkeit (KOEFOED-JOHNSEN u. USSING, 1958). Demnach folgt Natrium auf der apikalen Seite einem elektrochemischen Gradienten und gelangt passiv in die Zelle, da die Natriumkonzentration intrazellulär geringer ist als extrazellulär und das Innere der Zelle gegenüber außen negativ geladen ist. Auf der basolateralen Seite werden die Natriumionen aktiv unter Verbrauch von ATP (Adenosintriphosphat) mittels der Na⁺/K⁺-ATPase in Richtung Blut ausgeschleust. Insgesamt kommt es zu einer Ladungsverschiebung über dem Epithel. Dadurch baut sich eine elektrische Potentialdifferenz auf, wodurch die serosale Seite gegenüber der mukosalen Seite positiver wird. Es besteht kein Zweifel, daß ein

elektrogener Natriumtransport in dieser Form an vielen anderen Geweben existiert. Man findet sie nicht nur bei Amphibien, sondern auch in distalen Verdauungsabschnitten (Colon) und in der Niere (Sammelrohr) von Säugetieren. Durch Fluktuationsanalysen wurden bei LINDEMANN u. Van DRIESSCHE (1977) die in die Zelle gerichteten Natriumbewegungen als kanalgeleitete Prozesse identifiziert. Der bei BEAUWENS et al. (1990) durch Proteinkanäle mit hoher Leitfähigkeit als Elektrodiffusion bezeichnete passive Einstrom von Ionen an der apikalen Membran dichter Gewebe wurde bei THOMPSON et al. (1982) durch Erstellen von Strom-/Spannungs-Kurven nachgewiesen. Je nach Sensibilität gegenüber dem Diuretikum Amilorid, das spezifisch Natriumkanäle blockiert, werden amilorid-sensitive und amilorid-insensitive Kanäle unterschieden.

Es sei der Vollständigkeit halber erwähnt, daß in der apikalen Membran auch an Natrium gekoppelte Transportmechanismen vorkommen, die z. B. Glucose und Natrium (auch elektrogen) transportieren (KIMMICH, 1990).

2.2.2 Amilorid-Sensitivität

Amilorid ist ein reversibler, schneller Kanalblocker des epithelialen Natriumkanals, der in seiner Anwesenheit die durchschnittliche Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals herabsetzt (SMITH u. BENOS, 1991).

Die Froschhaut zeigt das klassische Modell eines Gewebes, das durch Amilorid hemmbare Natriumkanäle aufweist (LINDEMANN u. Van DRIESSCHE, 1977). Die folgende Aufstellung gibt eine Übersicht weiterer Gewebe mit dieser Eigenschaft (nicht vollständig).

Amphibien

- Froschhaut (FUCHS et al., 1977)
- Nekturusblase (FRÖMTER u. GEBLER, 1977)
- Krötenblase (LEVINE et al., 1981)
- Krötenhaut (NAGEL u. KATZ, 1991)
- Krötenlunge (FISCHER et al., 1989)

Säugetiere

- Meerschweincolon (CLAUSS et al., 1985)
- Kaninchensammelrohr (FLEMMER et al., 1993)
- distales Rattencolon (FOSTER et al., 1986)
- Kaninchenblase (LEWIS u. WILLS, 1983)
- Humanes Colon (SANDLE, 1989)
- Kaninchenniere (SHIMIZU et al., 1993)
- Kaninchencolon (TURNHEIM et al., 1978)

Zellkulturen

- A6-Froschniere, *Xenopus laevis* (LING u. EATON, 1989)
- LLC-PK1-Rattenniere (MOHRMANN et al., 1987)

Für amilorid-sensitive Natriumkanäle lassen sich folgende Eigenschaften zusammenfassen:

- Kontrolle durch Hormone bzw. Metaboliten (BENOS, 1982)

- Na⁺- Selektivität (GARTY u. BENOS, 1988)
- hohe Amiloridaffinität (SMITH u. BENOS, 1991)
- Na⁺- Transportsättigung möglich (TURNHEIM, 1991)
- Hemmbarkeit durch Pharmaka (TURNHEIM, 1991)

Die Amilorid-Sensitivität war bei den Geweben zum Teil nur durch Induktion des Natriumtransportes mit Aldosteron nachweisbar. Die folgende Liste gibt Beispiele von Geweben mit diesem Kopplungsmechanismus an:

- Coprodaeum des Huhnes (BINDSLEV, 1979)
- Rattencolon (FOSTER et al., 1983)
- Kaninchencolon (FRIZZELL u. SCHULTZ, 1978)
- Krötenblase (GARTY u. EDELMANN, 1983)
- Humanes Colon (SANDLE, 1989)

2.2.3 Amilorid-Insensitivität

Zeigt sich unter Anwendung von Amilorid bei Konzentrationen im sitivität

Bisherige Untersuchungen des calcium-sensitiven Natriumtransportes haben ergeben, daß die Transportrate bzw. der Stromfluß über diese Kanäle weitgehend von der Calciumkonzentration in der apikalen Lösung abhängt (AELVOET et al., 1988; DAS u. PALMER; 1989, Van DRIESSCHE u. ZEISKE, 1985; Van DRIESSCHE et al., 1987). Dabei war festzustellen, daß nicht nur Calcium, sondern auch andere divalente Kationen, wie Magnesium, Barium und Cadmium bereits in mikromolaren Konzentrationen den Durchfluß monovalenter Kationen blockierten. Außer Natrium konnten unter anderem auch die monovalenten Kationen Kalium, Rubidium, Cäsium, Thallium und das Ammoniumion durch diesen Kanal transportiert werden. Dies bedeutet, daß der Kanal weder selektiv noch sensitiv spezifisch ist. Im Gegensatz zur Froschhaut konnten bei der Krötenblase auch Lithiumionen den Kanal passieren (Van DRIESSCHE et al., 1987). Außerdem konnte an der Froschhaut der Kurzschlußstrom durch Oxytocin und cAMP stimuliert werden (Van DRIESSCHE u. ZEISKE, 1985).

Es wird angenommen, daß dieser für Amilorid insensitive, aber für Calcium sensitive Kationenkanal neben dem klassischen amilorid-sensitiven Natriumkanal existiert. In der Arbeit von Van DRIESSCHE (1987) über Calcium-Kanäle in der apikalen Membran der Krötenblase werden Ähnlichkeiten mit Calcium-Kanälen erregbarer Strukturen festgestellt. Wurden apikal die monovalenten Ionen entfernt und waren Silberionen in nanomolarer Konzentration vorhanden, so konnten Calciumionen diesen Kanal passieren. Dies führte zur Annahme eines Calciumkanals, der an der Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration beteiligt ist.

In den jüngsten Untersuchungen mittels der Rauschanalyse (Van DRIESSCHE et al., 1993) konnte der Kanal weiter differenziert werden. Demnach besteht er aus einem F-Teil mit schneller Öffnungs- und Schließkinetik und einen S-Teil mit langsamer Öffnungs- und Schließkinetik. Sie unterscheiden sich in ihrer Affinität gegenüber Blockern (Be⁺, Tetracain), in ihrer Selektivität und in ihrer Aktivierbarkeit durch cAMP. Während sich in der Froschhaut beide Varianten finden, existiert in der Krötenblase, in A6-Zellen und in Froschenterozyten nur die F-Ausführung. Interessanterweise entdeckten DESMEDT et al. (1991) in 8-16 Tagen alten A6-Zellkulturen weder die schnelle noch die langsame Ausführung des Kanals, während Van DRIESSCHE et al. (1994) an A6-Zellen einen calcium-sensitiven Na-Kanal beschreiben, der nach 10 Tagen Kulturwachstum nicht mehr festzustellen ist. Das würde früher postulierte Erklärungen unterstützen. Schon von COX u. ALVARANDO (1979) wurde an Ochsen-froschlarven ein elektrogener, durch Amilorid nicht

zu hemmender Natriumtransport durch einen unspezifischen Kationenkanal beschrieben.

Auch HILLYARD et al. (1982) untersuchten wenig selektive Kationenkanäle in der Haut von Froschlarven. Sie nahmen an, daß sich der Natriumtransport, wie er in der Haut adulter Frösche beschrieben wurde, erst entwickeln muß und die untersuchten Kationenkanäle ein Entwicklungsstadium des spezifischen amilorid-sensitiven Natriumkanals sind.

Calcium-Sensitivität des elektrogenen Natriumtransportes zeigte sich auch in Colon-enterozyten des Frosches (KRATTENMACHER et al., 1991). Weitere Untersuchungen von HEINZ et al. (1991) am Geflügelcoprodeum, bei SELLIN u. DUBINSKY (1994) am Kaninchencaecum und von SCHULTHEISS (1995) am Schafsalter wiesen calcium-sensitive Kationenkanäle nach.

Insgesamt zeigen calcium-sensitive Kationenkanäle folgende Eigenschaften: sie sind amilorid-insensitiv, bereits im mikromol-Bereich calcium-sensitiv und nur wenig selektiv für monovalente Kationen.

2.2.5 Regulationsmechanismen

Welchen Einflußgrößen und Steuerungsmechanismen der elektrogene Natriumtransport unterliegt, ist bisher überwiegend an amilorid-sensitiven Geweben untersucht worden. Bei näherer Betrachtung der Untersuchungen ist festzustellen, daß sich diese Ergebnisse zum Teil auch auf amilorid-insensitive bzw. calcium-sensitive Kanäle übertragen lassen.

In der nachfolgenden Betrachtung werden ohne Anspruch auf Vollständigkeit einige dieser vergleichbaren Eigenschaften im Hinblick auf die Einflußgrößen von Natrium- und Calciumkonzentrationen und die Wirkung von cAMP und Aldosteron besprochen.

2.2.5.1 Natriumkonzentration

Schon Untersuchungen an isolierter Froschhaut von USSING (1949) zeigten, daß mit steigenden Natriumkonzentrationen auf der luminalen Seite eine Sättigung des Transportes erreicht wurde. Folgeuntersuchungen mit Epithelien von Amphibien (FRAZIER et al., 1962; LI et al., 1982; MULLEN u. BIBER, 1978), von Säugetieren (CLAUSS et al., 1989; SELLIN et al., 1988; THOMPSON u. SELLIN, 1986) und vom Menschen (SANDLE, 1989) bestätigten diesen Zusammenhang. Zunächst schlossen BIBER u. SANDERS (1973) aus der Beobachtung, daß die Sättigung auch potentialabhängig war, daß Natrium mittels Carrier in die Zelle gelangt. Doch FUCHS et al. (1977) zeigten mit ihrer "fast-flow-Kammer", daß bei schnellem Pufferwechsel der Kurzschlußstrom anfänglich ansteigt und anschließend auf ein Plateau abfällt, welches der Sättigungsebene gleicht. Aus diesem Grunde wurde eine direkte Sättigung ausgeschlossen und ein Hemmechanismus am Ort des Natriumeintritts diskutiert.

Durch Fluktuationsanalysen an der Froschhaut konnten Van DRIESSCHE u. LINDEMANN (1979) nachweisen, daß Natrium durch Kanalporen in die Zelle gelangt und die Sättigung eine Folge der natriumkonzentrationsabhängigen Minderung der Kanaldichte ist. LING u. EATON (1989) fanden an A6-Zellen mit Hilfe von Patch-Clamp-Untersuchungen das gleiche Regelmuster und stellten dazu eine konzentrationsabhängige Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeit der Kanäle fest. Die Abhängigkeit zwischen mukosaler Natriumkonzentration und Permeabilität wird als Selbst-Hemmung oder "self-inhibition" bezeichnet. Laut TURNHEIM (1991) findet sich der Mechanismus aber nur an amilorid-sensitiven Kanälen und fehlt laut AELVOET et al. (1988) und SELLIN u. DUBINSKY (1994) bei calcium-sensitiven Kanälen.

Im Gegensatz zu FUCHS et al. (1977) stellten sowohl LING u. EATON (1989) als auch THOMAS et al.

(1983) und THOMPSON u. SELLIN (1986) bei Selbst-Hemmung mit Änderung der extrazellulären Natriumkonzentration auch eine Verschiebung der intrazellulären Natriumkonzentration fest.

Bei der Feedback-Hemmung wird die Konzentrationsveränderung innerhalb der Zellen durch Mediatoren hervorgerufen, wobei sich gleichzeitig die Natriumpermeabilität verändert. In den Studien von CHASE u. AL-AWQATI (1981), GRINSTEIN u. ERLIJ (1978) und LING u. EATON (1989) wurden aber keine oder nur geringe direkte Auswirkungen von intrazellulärer Natriumkonzentration auf die Natriumpermeabilität gefunden. Deshalb ist es wahrscheinlich, daß diese Einflüsse durch Mediatoren vermittelt werden. In Frage kämen hierbei das G-Protein, cAMP/cGMP, Proteinkinasen oder Lipoxygenasen, aber auch Zytoskelettinteraktionen, intrazellulärer pH-Wert und intrazelluläre Ca-Konzentration.

Selbst- und Feedback-Hemmung werden als sogenannte "Zelleigen-Hemmung" zusammengefaßt. Insgesamt ist festzustellen, daß der Einfluß der Na-Konzentration auf den Na-Transport sowohl extra- als auch intrazellulär nur indirekt vermittelt wird.

(Einzelheiten siehe Review von TURNHEIM, 1994 und GARTY u. PALMER, 1997)

2.2.5.2 Calciumkonzentration

Untersuchungen an der Krötenharnblase zeigten, daß nach der Hemmung des amilorid-sensitiven Natriumkanals der Stromfluß durch die apikalen Ionenkanäle hauptsächlich durch die Calciumkonzentration in der extrazellulären, apikalen Lösung reguliert wird (DAS u. PALMER, 1989; Van DRIESSCHE u. ZEISKE, 1985; Van DRIESSCHE et al., 1987). Dabei konnte der Ionenstrom schon durch mikromolare Konzentrationen von Calcium blockiert werden. Halbmaximale Hemmung trat bereits bei 2,5 μ M ein. Das ist eine charakteristische Eigenschaft für calcium-sensitive Kanäle. Neben Natrium konnten bei Calciumabwesenheit auch andere monovalente Ionen den Kanal passieren. Die Blockade ließ sich auch mit den divalenten Kationen Magnesium und Strontium, in Konzentrationen zwischen 10-58 μ M herbeiführen. Van DRIESSCHE (1987) schloß nicht aus, daß die Hemmung über die Konzentrationsänderung des intrazellulären Calciums vermittelt wird.

Nach ARMSTRONG u. LOPEZ-BARNEO (1987) finden sich solche Reaktionen in Verbindung mit einer Veränderung der Kanalkinetik auch in erregbaren Gewebestrukturen. Gleiches fanden ALMERS et al. (1988) an Calcium-Kanälen im Froschmuskel.

So wie ein Korken eine Flasche verschließt, so blockiert die Bindung von impermeablen Calciumionen innerhalb des elektrischen Feldes den Natriumkanal (PALMER, 1987). Andere polyvalente Ionen verhalten sich an dieser Stelle genauso. Eine ähnliche Blockade von Calcium-Kanälen durch die Bindung eines Kations im Kanal wurde von HESS u. TSIEN (1984) beschrieben. Die Bindung erfolgte allerdings an einer anderen Stelle mit anderer Affinität. Durch die starke Interaktion der Calciumionen mit der Bindungsstelle tritt die Hemmung schon im mikromolaren Bereich ein.

Calciumionen sind als *second messenger* an vielen zellvermittelten Vorgängen beteiligt. Ihre intrazelluläre Konzentration liegt bei 10^{-7} mol/l. Dieses relativ niedrige Niveau wird durch die verschiedensten Mechanismen konstant gehalten. Die Abgabe und Aufnahme kann kurzfristig von Mitochondrien, vom endoplasmatischen Retikulum und durch calciumbindende Proteine gesteuert werden. Langfristig wird in erregbaren Zellen die intrazelluläre Calciumkonzentration durch $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und Calciumpumpen in der Zellmembran aufrecht erhalten (BLAUSTEIN, 1977; MULLINS, 1977).

Diese $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, die jeweils drei Natriumionen gegen ein Calciumion tauschen, sind auch in der basolateralen Zellmembran epithelialer Zellen nachgewiesen worden (TAYLOR u. EICH, 1978).

CHASE u. AL-AWQATI (1981) zeigten an Vesikeln der Krötenblase, daß nicht die intrazelluläre Natriumkonzentration, sondern die Calciumkonzentration in der Zelle die Natriumpermeabilität entscheidend beeinflußt und bestätigten damit die Befunde von GRINSTEIN u. ERLIJ (1978).

LING u. EATON (1989) konnten an A6 - Zellkulturen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik, bei mukosal niedriger Natriumkonzentration, durch den Zusatz von Calcimycin (A 23187) eine Steigerung der Natrium-Kanalaktivität verhindern. Trotzdem schlossen sie einen direkten Zusammenhang zwischen intrazellulärer Calciumkonzentration und Natriumpermeabilität aus.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der epitheliale Natriumtransport durch mukosales Calcium direkt beeinflußt wird. Intrazelluläres Calcium scheint dagegen nur indirekt zu wirken.

2.2.5.3 cAMP

Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist z. B. *second messenger* für ADH (Antidiuretisches Hormon oder auch Vasopressin). Dieses Peptidhormon wirkt auf die tubuläre Wasserresorption und den Natriumtransport. Die Wirkung wird über Rezeptorenbindung in der Zellmembran und Aktivierung des Adenylatcyclase-Systems vermittelt. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle, das wiederum regt die Phosphorylierung durch Proteinkinasen an.

cAMP wird als *second messenger* für die Aktivierung einiger epithelialer Transportvorgänge verantwortlich gemacht. Wie bei LEVITAN (1985) beschrieben, wird die Wirkung über eine Proteinkinase vermittelt, die die Phosphorylierung des Kanalproteins katalysiert.

Sowohl bei amilorid-sensitiven als auch bei calcium-sensitiven Geweben konnte mit einem erhöhten cAMP-Spiegel eine Steigerung des Kurzschlußstromes erzielt werden. An der Froschhaut wurde von KATZ u. Van DRIESSCHE (1987) bei einer, durch den Phosphodiesterasehemmer Theophyllin erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentration eine Steigerung des ausschließlich elektrogenen Natriumtransportes gemessen. Gleiches stellten AELVOET et al. (1988) und GARTY u. BENOS (1988) an der Krötenblase fest. Sie nahmen an, daß die Anzahl der leitenden Kanäle erhöht wurde. Den gleichen Effekt erzielten LI et al. (1982) an der Krötenblase mit ADH (Antidiuretisches Hormon) und gaben an, daß zwar die Anzahl der Kanäle erhöht wurde, aber nicht deren Öffnungswahrscheinlichkeit.

Bei einigen anderen Epithelien mit elektrogenem Natriumtransport, läßt sich durch Theophyllin und cAMP-Erhöhung kein Effekt erzielen (SELLIN u. De SOIGNIE, 1987; SELLIN et al., 1988). Ebenso zeigte der ADH - Einsatz an Froschenterozyten (KRATTENMACHER et al., 1989) und der Theophyllineinsatz beim durch Aldosteron induzierten elektrogenen Natriumtransport am Rattencolon keine Änderung (FOSTER et al., 1983).

In den Versuchsreihen von WOLFRAM et al. (1989) am Schafpansen konnte mit Theophyllin sowohl der Kurzschlußstrom als auch die Natriumtransportrate gesenkt werden. Die signifikanten Unterschiede wurden durch serosale Zugabe von 10 mM Theophyllin erreicht. Sie vermuteten eine durch cAMP vermittelte Hemmung des elektrogenen und des elektroneutralen Natriumtransportes.

2.2.5.4 Aldosteron

Das Mineralocorticoid Aldosteron gehört zu den Hormonen, die auf den elektrogenen Natriumtransport regulierend wirken können. Dieses Steroidhormon wird in der *Zonula granulosa* der Nebennierenrinde gebildet und reguliert unter anderem den Natriumhaushalt. Wie alle Steroide wirkt es durch Beeinflussung

der Proteinsynthese, indem es bedingt durch seine Struktur mit hoher Lipidlöslichkeit gut durch die Zellmembran in die Zelle gelangt und dort mit Hilfe von spezifischen Rezeptoren rezeptorvermittelt in den Zellkern eindringt. Dort wird innerhalb von ca. 15 Minuten die Transkriptionsrate bestimmter Gene angeregt, wodurch die Proteinsynthese ansteigt. Der Anstieg ist aber erst nach ca. 3 Stunden nachzuweisen. Auswirkungen auf den Elektrolythaushalt werden erst in der sogenannten späten Wirkungsphase sichtbar.

Mit Aldosteron läßt sich an einigen Geweben die Natriumtransportrate steigern, wie bei LEWIS u. WILLS (1983) an der Kaninchenblase, bei NAGEL u. KATZ (1991) an der Krötenhaut und bei HALM u. HALM (1994) am Colon des Meerschweinchens beschrieben wurde. Nach der intrazellulären Bindung an einen zytoplasmatischen Rezeptor wird das Hormon in den Zellkern transportiert (GARTY, 1986), wo es die mRNA- und Proteinsynthese anregt. Es werden zwei Wirkungsphasen beschrieben, wobei es erst in der zweiten Phase zur Steigerung des Kurzschlußstromes kommt. In neueren Untersuchungen von KEMENDY et al. (1992) wird davon ausgegangen, daß sowohl die Steigerung der Kanalanzahl als auch die Änderung der Öffnungswahrscheinlichkeit den Kurzschlußstrom ansteigen läßt.

Aldosteron wirkt nicht nur auf die apikale Membran der Zellen, sondern auch auf der basolateralen Seite. TURNHEIM et al. (1986) beschreiben die Wirkung an der basolateralen Membran als eine gesteigerte Aktivierung der Oberflächenmoleküle der Na⁺/K⁺-ATPase und Zunahme bzw. Anzahl der Pumpeinheiten.

In der Literatur ist ein Einfluß von Aldosteron auf calcium-sensitive Kationenkanäle in Epithelien nicht beschrieben worden.

Tab. 2 Übersicht über die Sensitivität der Gewebe gegenüber Amilorid, Calcium und Aldosteron (nicht vollständig)

Gewebe	amilorid-		calcium-sensitiv	Aldosteron	Bemerkungen	Literatur
	sensitiv	insensitiv				
Froschhaut	x	x	x	x	2. Kanal	FUCHS et al., 1977 VOÚTE et al., 1969 Van DRIESSCHE u. ZEISKE, 1985
Krötenhaut	x	x	x	x	2. Kanal	NAGEL u. KATZ, 1991 NAGEL u. KATZ, 1991
Krötenblase	x	x	x	x		CRABBÉ, 1963 LEVINE et al., 1981 Van DRIESSCHE, 1987 DAS u. PALMER, 1989
Nekturusblase	x					FRÖMTER u. GEBLER, 1977

Froschenterozyt		x	x			KRATTENMACHER et al., 1990
Humanes Colon		x			proximal	SELLIN u. DESOIGNIE, 1987
Meerschweinchencolon	x			x		CLAUSS et al., 1985 HALM u. HALM, 1994
Kaninchencolon	x			x		TURNHEIM et al., 1978/1986
Kaninchencäcum		x	x			CLAUSS et al., 1989 SELLIN u. DUBINSKY, 1994
Kaninchenblase	x			x		LEWIS u. WILLS, 1983
Kaninchenniere	x					SHIMIZU et al., 1993
Rattencolon	x	x		x	distal proximal	FOSTER et al., 1986 FOSTER et al., 1986
Schafpansen		x	x			MARTENS et al., 1989/1990
A6-Zellen	x	x	x	x	Froschniere junge Zellen	LING u. EATON, 1989 KEMENDY et al., 1992 Van DRIESSCHE et al., 1994
LLC-PK1 Zellen	x				Rattenniere	MOHRMANN et al., 1987

2.3 Zusammenfassung für die eigene Fragestellung

Aus den bisher veröffentlichten Arbeiten über den Natriumtransport am Pansenepithel geht hervor, daß die Natriumresorption überwiegend aktiven Transportmechanismen unterliegt. Dabei wird der größte Teil mit dem elektroneutralen Na^+/H^+ -Austauscher abgedeckt. Einen wesentlich kleineren Teil übernimmt der elektrogene Natrium-transport. HENSELEIT (1991) stellte unter anderem fest, daß bei bestimmten Versuchsanordnungen ein elektrogener und amilorid-insensitiver Kurzschlußstrom gemessen wird. LEONHARD et al. (1990) beobachteten, daß die Entfernung divalenter Kationen (Mg^{2+} und Ca^{2+}) aus der mukosalen Lösung den Kurzschlußstrom des isolierten Pansenepithels erheblich erhöht. Die Veränderung

war nach erneuter Zugabe von der entsprechenden Kationen reversibel.

Ziel dieser Arbeit war es, diesen calcium-sensitiven Anteil des elektrogenen Natriumtransportes näher zu beschreiben. Dazu werden im ersten Teil nach einer Reihe von Vorversuchen durch den Einsatz von mono- und divalenten Ionen Verhalten, Kinetik und andere Eigenschaften der Kurzschlußstromänderungen untersucht. Im zweiten Teil werden Natriumtransportraten mit Hilfe von radioaktiv markierten Substanzen bestimmt. Im dritten Teil wird die Calciumhemmung und seine Kinetik näher beschrieben. Im vierten Teil werden die Wirkungen von Amilorid, Aldosteron und Theophyllin d. h. cAMP überprüft.

Aufgrund der bisherigen Untersuchungsergebnisse läßt sich folgende Hypothese für den elektrogenen Natriumtransport über das Pansenepithel aufstellen:

Natrium gelangt von der luminalen Seite über die apikale Membran entlang eines elektrochemischen Gradienten passiv durch einen nicht selektiven Kationenkanal in die Zelle hinein. Auf der basolateralen Membran wird Natrium aktiv wieder ausgeschleust.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Pansenschleimhäute von Schafen unterschiedlicher Herkunft verwendet. Die Schlachtung der Tiere erfolgte entweder im Schlachthof Berlin oder im Schlachthaus des Fachbereiches Agrarwissenschaften der Technischen Universität Berlin. Daneben standen noch Pansenschleimhäute von Schafen zur Verfügung, die im Institut für Experimentelle Chirurgie im Klinikum Charlottenburg des Fachbereiches Humanmedizin der Freien Universität Berlin getötet wurden. Über das Alter, Geschlecht und Rassenzugehörigkeit der Schafe, ebenso über Fütterung und Haltung können keine Angaben gemacht werden.

Für diese Arbeit kamen aus 55 Schafpansen die Versuchsergebnisse von insgesamt 175 Epithelstücken zur Auswertung.

3.2 Entnahme, Präparation und Behandlung der Gewebe

Die Schlachttiere wurden nach Bolzenschuß-Betäubung durch Entbluten getötet. Nach 3-4 Minuten konnten dem ausgeweideten Vormagenkonvolut Pansenstücke entnommen werden. Im Institut für Experimentelle Chirurgie erfolgte der Tod der Schafe im Anschluß an eine Barbiturat-Narkose durch eine Überdosis Pentobarbital. Kurz nach dem Eintritt des Todes wurde die Leibeshöhle eröffnet und der Vormagentrakt entnommen. Nach der Eröffnung und Entleerung des Pansens wurde ein möglichst großes Stück des ventralen Pansensackes entnommen. Prinzipiell kamen nur Schleimhautareale in Frage, die hell, wenig verhornt und nur mäßig mit kurzen Zotten besetzt waren. Die Pansenstücke wurden zunächst durch mehrmaliges Spülen in 38°C warmer, auf pH 7,4 eingestellter und mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂, Messer-Griesheim, Berlin) begaster Pufferlösung (Standardpuffer, siehe Anhang) von Futterresten gereinigt und dann zum Präparieren in frische Pufferlösung gelegt. Manuell konnte sodann die Muskelschicht (*Tunica muscularis*) von der eigentlichen Schleimhaut getrennt werden. Der Transport des so gewonnenen Epithels

mit dem darunterliegenden Bindegewebe erfolgte in einem mit 3-4 l Standardpuffer gefüllten Thermogefäß (DEWAR) unter ständiger Carbogenbegasung. Die Transportzeiten zum Untersuchungslabor lagen bei 15 - 25 Minuten. Im Labor wurden die für die Versuchsreihe bestimmten Epithelstücke in Ca-freien Puffer (Grundpuffer, siehe Anhang) gelegt. Dieser Grundpuffer diente als Standard und Grundlage für sämtliche Puffervarianten. Um das noch freie und das sich aus dem Gewebe freisetzende Calcium abzufangen, wurde dem Grundpuffer EGTA (Ethylen-Glykol-Tetra-Essigsäure) zugesetzt und das Gewebe darin 10 Minuten inkubiert. Nachdem die 3 x 3cm großen Stücke zugeschnitten waren, erfolgte das Einspannen der Epithelien in die USSING-Kammern und das Einsetzen und Anschließen an die mit Pufferlösung vorbereiteten Apparaturen. Erst nach einer Äquilibrierungszeit von 15 Minuten wurden Manipulationen vorgenommen.

3.3 Versuchsaufbau

Die verwendete Untersuchungsmethode ist eine Technik, mit deren Hilfe in vitro Untersuchungen an isolierten Geweben möglich ist (USSING, 1949). Zentraler Bestandteil der Untersuchungsanlage ist eine Kammer aus Plexiglas, die sogenannte USSING-Kammer. Diese Methode wurde mehrfach für den Pansen und andere Vormagenepithelien modifiziert (FERREIRA et al., 1966; STEVENS, 1964). Die Kammer besteht aus zwei gleich großen Hälften, zwischen die das zu untersuchende Gewebe gespannt wird, wodurch der Innenraum in zwei gleich große Hohlräume aufgeteilt wird. So kann das Epithel von beiden Seiten (luminal = apikal = mukosal und Blutseite = basolateral = serosal) umspült werden. Um Quetschungen der Geweberänder sog. "*edge damage*" und damit eine Beeinflussung der Meßergebnisse zu vermeiden, wurden zwischen Epithel und Kammerhälften passend zugeschnittene Silikonringe eingelegt. Der freie Durchmesser der Kammern betrug in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen 2 cm, die dem Inkubationsmedium ausgesetzte Epithelfläche hatte folglich eine Oberfläche von 3,14 cm².

Direkt im Anschluß an das Einspannen wurden beide Kammerräume mit den für den jeweiligen Versuch notwendigen Pufferlösungen gefüllt und mit Sauerstoff begast, um die Belastung für das Epithel so gering wie möglich zu halten. Beide Kammern waren über kurze Tygonschläuche (Kronlab, Sinsheim) mit 16 ml Puffer gefüllten, doppelwandigen Glassäulen (Landgraf, Hannover) verbunden. Während im äußeren Mantel ein 38°C warmes Wasserbad die Temperatur der Puffer konstant hielt, wurde die Pufferzirkulation durch ein Gasliftsystem in Gang gehalten, wodurch gleichzeitig die Versorgung mit reinem Sauerstoff (Messer-Grießheim, Berlin) gewährleistet war.

Die Messung der elektrischen Parameter erfolgte über 3%-ige Agarbrücken (Sigma-Chemie, München) und zwei Kalomelelektroden (Ingold, Steinbach/TS), die über eine 3-molare KCL-Lösung in Kontakt gebracht wurden. Über die gewebe nahen Agarbrücken (Abstand < 3mm) wurden die Potentiale gemessen und über die gewebe ferneren (Abstand > 2cm) konnte der Strom eingespeist werden.

Die gesamte Datenerfassung wurde mit einer *Voltage-Clamp*-Anlage (SCHEFFLER, 1984) gesteuert, die aus dem Mikrocomputersystem (AIM 65), einem Interface (Copy AG) und einem Matrixdrucker besteht. Diese mikrocomputergesteuerten Strom- und Spannungsklemmeinrichtung (AC Microclamp, f + p Datensysteme, Aachen) ist damit in der Lage, die elektrophysiologischen Parameter der transepithelialen Potentialdifferenz (PD), der Gewebeleitfähigkeit (G_i) und des Kurzschlußstroms (I_{sc}) zu beeinflussen und die Werte kontinuierlich in bestimmten Zeitabständen aufzuzeichnen und auszudrucken.

3.4 Elektrische Messungen

3.4.1 voltage-clamp

Diese Spannungsklemmentchnik ermöglicht es, die elektrischen Parameter Potentialdifferenz (PD),

Kurzschlußstrom (I_{sc}) und Gewebeleitfähigkeit (G_t) zu ermitteln, wobei G_t der reziproke Wert des Widerstandes ist. Die Potentialdifferenz wird direkt gemessen, Widerstand (R_t) bzw. Leitfähigkeit müssen nach dem Ohm'schen Gesetz errechnet werden. Deshalb werden in regelmäßigen Zeitabständen Stromimpulse definierter Größe und Dauer über das Gewebe geschickt. Die resultierende Änderung der Potentialdifferenz ist die Berechnungsgrundlage. Mit Hilfe dieser Technik kann durch externe Stromzufuhr die transepitheliale PD_t auf einen bestimmten Wert "geklemmt" werden, damit werden die elektrophysiologischen Voraussetzungen für den Ionentransport verändert. Genaue Meßtechnik und Anlagenprinzip sind bei SCHEFFLER (1984) beschrieben.

3.4.2 open-circuit

Bei diesem "offenen" Meßverfahren bleibt die Potentialdifferenz im Prinzip unbeeinflusst. Um aber Gewebeleitfähigkeit (G_t) und Kurzschlußstrom (I_{sc}) errechnen zu können, müssen kurze, alternierende Strompulse von 1 Sekunde bei plus oder minus ($100\mu A$) gegeben werden. Aus der kurzzeitigen Potentialänderung am Epithel kann dann nach dem Ohm'schen Gesetz der Widerstand berechnet werden. Aus diesem Widerstandswert und der unter offenen Bedingungen, also ohne Strompuls, gemessenen Potentialdifferenz (PD_t) wird der Kurzschlußstrom (I_{sc}) errechnet. Der reziproke Wert des Widerstandes ergibt die Gewebeleitfähigkeit (G_t). Der Gewebestrom wird wiederum mit Hilfe des Ohm'schen Gesetz errechnet, indem die PD_t (vor dem Strompuls) durch den errechneten Widerstand (R_t) geteilt wird. Unter open-circuit-Bedingungen wurde jeder Versuch gestartet.

3.4.3 short-circuit

Diese Kurzschlußstromtechnik ist eine Sonderform der Spannungsklemme. Dabei wird die transepitheliale Potentialdifferenz (PD_t) durch externe Stromeinspeisung auf 0 mV "geklemmt". Unter diesen Bedingungen entspricht der I_{sc} in seiner Größe genau der Summe aller elektrogenen Ionenbewegungen durch das Gewebe. Der über dem Gewebe bestehende elektrische Gradient ist aufgehoben. Wird nun noch auf beiden Seiten des Gewebes mit gleicher Pufferlösung gearbeitet, ist auch der chemische Gradient aufgehoben. Wird bei dieser Voraussetzung ein Nettotransport eines Ions festgestellt, ist der Transportmechanismus dieses Ions als aktiv oder sekundär aktiv anzusehen. Die Gewebeleitfähigkeit wird wie unter open-circuit-Bedingungen ermittelt.

3.5 Versuchsablauf

Alle Versuche liefen mit einer Anpassungszeit von ca. 15 Minuten an. Wie aus vielen anderen Versuchsreihen mit Pansenepithelien bekannt, stellen sich dann relativ stabile Werte ein. Es kamen nur Epithelien zum Einsatz, deren Leitfähigkeit (G_t) nicht höher war als $10 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ und bei denen die Werte für den Kurzschlußstrom (I_{sc}) nicht unter $1\mu \text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ lagen. Unter diesen Bedingungen konnte erfahrungsgemäß von einer relativ langanhaltenden Stabilität der Gewebe ausgegangen werden. Werte darunter bzw. darüber deuteten auf eventuelle Gewebeschädigungen hin. Werteunterschiede zwischen den Gewebestücken bis zu 25% wurden akzeptiert. Für die einzelnen Versuchsanordnungen wurden Epithelien mit möglichst ähnlichen Werten ausgewählt um die Streuung gering zu halten.

Um für alle Versuchsreihen gleiche Ausgangsbedingungen zu haben, wurden die ausgewählten Epithelstücke vor dem Einspannen in die Apparatur ca. 15 Minuten in calciumfreiem Puffer mit 1mM EGTA inkubiert. In einer Vielzahl von Vorversuchen war festgestellt worden, daß sich je nach Dicke der Hornschicht und Zottenlänge kontinuierlich ionisiertes Calcium in der umgebenden Pufferlösung

anreicherte. Durch die Inkubation wurde das freigewordene ionisierte Calcium gebunden und für alle Versuche nahezu gleiche Voraussetzungen geschaffen.

Aufgrund der an den Elektroden auftretenden Diffusionspotentiale wurde zur genaueren Datenerfassung die Elektrodeneigenpotentialdifferenz bestimmt und eingegeben. Dazu wurden an der Apparatur, die mit der jeweiligen Pufferlösung gefüllt, begast und auf 38°C temperiert war, vom Mikrocomputer 64 Einzelwerte der Potentialdifferenz gemessen, aufsummiert und der Mittelwert gebildet.

Da die transepitheliale Potentialdifferenz nicht direkt am Gewebe abgegriffen werden kann, sondern über die dazwischen liegende Flüssigkeit der Pufferlösung gemessen wurde, mußte auch noch der Flüssigkeitswiderstand, der für den jeweiligen Versuch benutzten Pufferlösung, in die Messung mit einbezogen werden. Von den durch Strompulse von 0 bis 250 µA entstandenen Potentialdifferenzen wurden 16 Wertepaare aufgenommen und im Mikrocomputer mit Hilfe einer linearen Regression in eine Strom-Spannungs-Kennlinie, die Steigung einer Geraden, umgerechnet.

3.5.1 Elektrophysiologische Messungen

In diesen Versuchsreihen wurden die Pansenepithelien nach der Äquilibrierungszeit mit verschiedenen Pufferlösungen und Wirkstoffen behandelt. Um die Volumenveränderung so gering wie möglich zu halten, wurden die Wirkstoffe hochkonzentriert Gegenseite.

Nach 15 Minuten wurde auf der "heißen Seite" eine Probe entnommen, um die spezifische Aktivität zu bestimmen. In bestimmten Zeitabständen folgten zur Ermittlung der Fluxraten Probenentnahmen auf der Gegenseite. Nach den Probenentnahmen wurde das Puffervolumen in den Glassäulen mit der dem Probenvolumen entsprechenden Puffermenge wieder aufgefüllt. Die Bestimmung der ²²Na-Probe erfolgte mit Hilfe eines Gammazählers (Berthold). Die ¹⁴C-Proben wurden mit einem Betazähler (Packard) bestimmt. Aus der Subtraktion der Fluxraten von J_{ms} und von J_{sm} konnten die Nettofluxraten (J_{net}) errechnet werden.

3.6 Berechnungen

3.6.1 Ionenfluxe

Berechnung der spezifischen Radioaktivität für den jeweiligen Versuch aus der auf der "heißen" Seite entnommenen Probe:

$$\text{spez. Aktiv.} = \frac{\text{cpm}}{\text{Ion}}$$

cpm = counts pro Minute für die Radioaktivität / ml Probevolumen

Ion = Konzentration des radioaktiven Ions im Puffer in µmol/ml

Die unidirektional transportierte Ionenmenge (J) pro Zeiteinheit und Fläche wird als J_{ms} für mukosal nach serosal, als J_{sm} für serosal nach mukosal und als J_{net} für die sich daraus ergebende Nettofluxrate bezeichnet. Sie errechnete sich aus der auf der "kalten" Seite gezogenen Probe nach folgender Formel:

$$J = \frac{P_2 \cdot V_0 / V_P - (P_1 \cdot (V_0 - V_P) / V_P)}{A \cdot t} \quad [\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}]$$

J	=	Ionenflux
P ₁	=	cpm = counts pro Minute zum Zeitpunkt 1 (Beginn der Fluxperiode)
P ₂	=	cpm = counts pro Minute zum Zeitpunkt 2 (Ende der Fluxperiode)
V ₀	=	Puffervolumen gesamt (16 ml)
V _P	=	Puffervolumen Probe (2 ml)
Ak _{spez.}	=	Spezifische Aktivität in cpm/μM
A	=	Freie Kammerfläche (3,14 cm ²)
t	=	Dauer der Fluxperiode (h)

Der Nettoflux (J_{net}) ergab sich wie folgt aus den unidirektionalen Fluxraten:

$$J_{ms} - J_{sm} = J_{net} \text{ [} \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1} \text{]}$$

J_{ms} = Ionenflux von mukosal nach serosal

J_{sm} = Ionenflux von serosal nach mukosal

J_{net} = Nettoionenflux

3.6.2 PD_t-abhängige und PD_t- unabhängige Fluxkomponenten

Der berechnete unidirektionale Ionenflux konnte mit Hilfe eines Modells von FRIZZELL u. SCHULTZ (1972) modifiziert nach JACKSON u. NORRIS (1985) in elektrogene, potentialabhängige und elektroneutrale, potentialunabhängige Komponenten zerlegt werden, die sich wie folgt berechnen lassen:

$$J = J_d \cdot \xi + J_m \quad \xi = \frac{z \cdot F \cdot PD_t / R \cdot T}{e (z \cdot F \cdot Pd_t / R \cdot T) - 1}$$

J = Gesamtflux eines Ions in die untersuchte Richtung

J_d · ξ = diffusibler Fluxanteil - potentialabhängig

J_m = elektroneutraler Fluxanteil - potentialunabhängig

z = Wertigkeit des untersuchten Ions

PD_t = Potentialdifferenz über dem Epithel in dieser Richtung [mV]

F = Faraday-Konstante (96478 C · mol⁻¹)

R = allgemeine Gaskonstante (8,3143 J · K⁻¹ · mol⁻¹)

T = absolute Temperatur in Kelvin (38 °C = 311 K)

3.7 Lösungen und Chemikalien

Zur Herstellung aller Pufferlösungen wurden Chemikalien mit p.A. Qualität (Fa. Merck, Darmstadt oder Fa. Sigma, München) verwendet. Grundlage dafür war doppelt deionisiertes Wasser. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte bei allen Ansätzen die Einstellung auf einen pH-Wert von 7,4 ± 0,1 (Knick pH-Meter, Knauer, Berlin) bei 38°C und Sauerstoffbegasung (O₂, Messer-Griesheim, Berlin) und anschließend wird die

Einstellung der Osmolalität nach dem Prinzip der Gefrierpunktserniedrigung gemessen und auf 290 ± 10 mosm/kg eingestellt (Roebing, Berlin). Nur der Transportpuffer wurde mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂, Messer-Griesheim, Berlin) begast.

Zur Herstellung des calciumfreien Grundpuffers wurde der Calciumchelatbildner Etylenglykoltetraessigsäure (EGTA) eingesetzt. Für die Pufferreihe mit bestimmten Konzentrationen an freiem (ionisiertem) Calcium kam auch N-Hydroxyethylen-diamintriessigsäure (HEEDTA) zum Einsatz. Diese Reihe wurde zusätzlich mit dem organischen Puffer N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N-2-Ethansulfonsäure (HEPES) abgepuffert.

Für die Versuche mit anderen divalenten Ionen wurden Calciumionen durch die entsprechende Menge an Magnesium-, Barium- oder Strontiumionen ersetzt. Die Pufferlösungen der Reihe mit anderen monovalenten Ionen enthielten statt Natriumionen die entsprechende Menge Kalium-, Rubidium-, Caesium- oder Lithium.

Zwischen Ansatz und Verwendung der neu angesetzten Puffer lagen maximal drei Tage. In dieser Zeit wurden sie bei 4°C in entsprechenden Kühleinrichtungen gelagert. Die unterschiedlichen Zusammensetzungen der verwendeten Lösungsansätze einschließlich pH-Wert und Osmolarität sind den Tabellen des Anhangs zu entnehmen.

Wirkstoffe, die bei den verschiedenen Versuchsansätzen zugegeben wurden, sind jeweils vor Versuchsbeginn als sogenannte Stammlösungen frisch hergestellt worden. Dabei wurde mit maximalen Konzentrationen gearbeitet, um durch die Zugabe des Puffervolumen während des Versuches so wenig wie möglich verändern zu müssen.

Mit Ausnahme von Theophyllin, das in pulverisierter Form zugegeben wurde, kamen alle Substanzen in flüssigen Lösungen zum Einsatz.

Die verwendeten Substanzen mit Angaben zu deren Lösungsmitteln, Konzentrationen und Zugabevolumina sind ebenfalls dem Anhang zu entnehmen.

3.8 Statistik

Die ermittelten Werte der Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel der Einzelwerte \pm S.E.M. (standard error of mean) angegeben. "N" gibt die Anzahl der Versuchstiere an und "n" die Anzahl der untersuchten Gewebestücke. Um signifikante Unterschiede feststellen zu können, wurden die Mittelwerte bei Tests an verschiedenen Geweben im gleichen Versuchsaufbau mit Hilfe des *ungepaarten t-Tests* verglichen, dem gegenüber wurde bei den Tests am gleichen Gewebe im gleichen Versuchsaufbau mit dem *gepaarten t-Tests nach Student* (HAIGER, 1982) gearbeitet. Die statistischen Werte wurden mit dem Statistikprogramm *Sigma Stat 1.0* ermittelt. Auf Normalverteilung wurde automatisch geprüft; wenn keine Normalverteilung vorlag, kam der *Mann-Whitney Rank Sum Test* zur Anwendung. Lineare Zusammenhänge wurden mittels Regressionsanalyse überprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 5\%$ festgelegt und in der üblichen Weise angegeben: * = $p < 0,05$.

4 ERGEBNISSE

4.1 Allgemeine Vorversuche

4.1.1 Kurzschlußstrom mit und ohne Calcium in der mukosalen Lösung

In den Untersuchungen von LEONHARD et al. (1990) ist gezeigt worden, daß der Kurzschlußstrom (I_{sc}) durch Calcium- und Magnesiumentzug auf der mukosalen Seite reversibel erheblich zu steigern ist. Wird der I_{sc} des isolierten Pansenepithels unter Standardbedingungen mit Hilfe der USSING - Kammer - Apparatur gemessen, liegt er zwischen $0,3 - 0,8 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Nach Entzug von Calcium und Magnesium werden je nach Epithel 5 - 10fache Steigerungen auf $1,5 - 3,5 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ beobachtet, wird Calcium und Magnesium wieder zugegeben, fallen die Meßwerte annähernd auf das Ausgangsniveau zurück. Die erste Versuchsreihe diente der Charakterisierung und der Standardisierung dieser Beobachtungen.

In einer Reihe von 8 Vorversuchen wurden die eingespannten Pansenepithelstücke auf beiden Seiten mit calcium- und magnesiumhaltigem Grundpuffer (siehe Anhang) inkubiert. Nach der unter Kurzschlußstrombedingungen laufenden Äquilibrierungszeit von 10 - 15 Minuten und nach Wechsel auf der mukosalen Seite zu calcium- und magnesiumfreien Grundpuffer (siehe Anhang) stiegen I_{sc} und Gewebeleitfähigkeit (G_t) rapide an. Ausgehend von einem I_{sc} im Mittel von $0,41 \pm 0,07 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ und einer G_t im Mittel von $2,57 \pm 0,30 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ erreichten beide Werte innerhalb von 8 - 10 Minuten wieder ein mittleres *steady state* bei $I_{sc} = 2,19 \pm 0,22 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ und $G_t = 3,45 \pm 0,22 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$. Nach erneuter Zugabe von 2 mM Calcium auf der mukosalen Seite fielen die Werte auf das Ausgangsniveau und erreichten für I_{sc} einen Mittelwert von $0,29 \pm 0,22 \mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ und für G_t einen Mittelwert von $2,50 \pm 0,29 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$. Auffällig ist hierbei, daß sich I_{sc} und G_t fast gleichzeitig und auch fast gleich schnell ändern.

Während der ersten Versuche zeigte sich, daß trotz Zugabe von EGTA auf der mukosalen Seite der Kurzschlußstrom immer wieder abfiel, obwohl in keiner Weise manipuliert wurde. Das führte zu Meßwerten mit sehr breiter Streuung, so daß kaum verwertbaren Ergebnisse für die Fragestellungen zu erwarten waren. Diese Schwankungen konnten erheblich reduziert werden, indem die zu verwendenden Epithelstücke schon vor dem eigentlichen Versuchsbeginn 20 Minuten in calciumfreier Grundpufferlösung mit 1 mM EGTA inkubiert wurden. Um gleiche Ausgangsbedingungen zu haben, sind deshalb alle weiteren Versuchsreihen mit einer calciumfreien Lösung begonnen worden. Nach dem Einspannen und einer Äquilibrierungszeit von 15 Minuten wurde mit entsprechenden Manipulationen begonnen.

Es konnte beobachtet werden, daß das oben beschriebene Phänomen insbesondere bei stark verhornten, langzottigen Gewebestücken auftrat, so daß die Vermutung naheliegt, daß aus der mehr oder weniger starken Hornschicht Calcium freigesetzt wird und so den Natriumstrom hemmt. Nachfolgend kamen daher schwach verhornte Epithelstücke mit kurzen Zotten zum Einsatz.

4.1.2 Stabilität der elektrophysiologischen Parameter

Für eine gesicherte statistische Auswertung der Ergebnisse war die Stabilität der Gewebe unter nicht physiologischen Bedingungen, also ohne Calcium, eine wichtige Voraussetzung. Deshalb wurde in den Vorversuchen die unter Versuchsbedingungen mögliche Überlebenszeit, d.h. die Stabilität der Epithelien getestet. Auch hier zeigten die kurzzottigen, schwach verhornten Gewebestücke die höchste Stabilität. **Abb. 2** zeigt den zeitlichen Verlauf von G_t und I_{sc} des Pansenepithels über 60 Minuten. Insgesamt zeigten die Epithelien stabile Werte für I_{sc} und G_t bis zu 5 Stunden. Ausschlaggebendes Kriterium für die Intaktheit der Gewebe war die Gewebeleitfähigkeit. Ab einer $G_t = 12,00 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ wurden die Versuchsergebnisse als nicht mehr auswertbar angesehen.

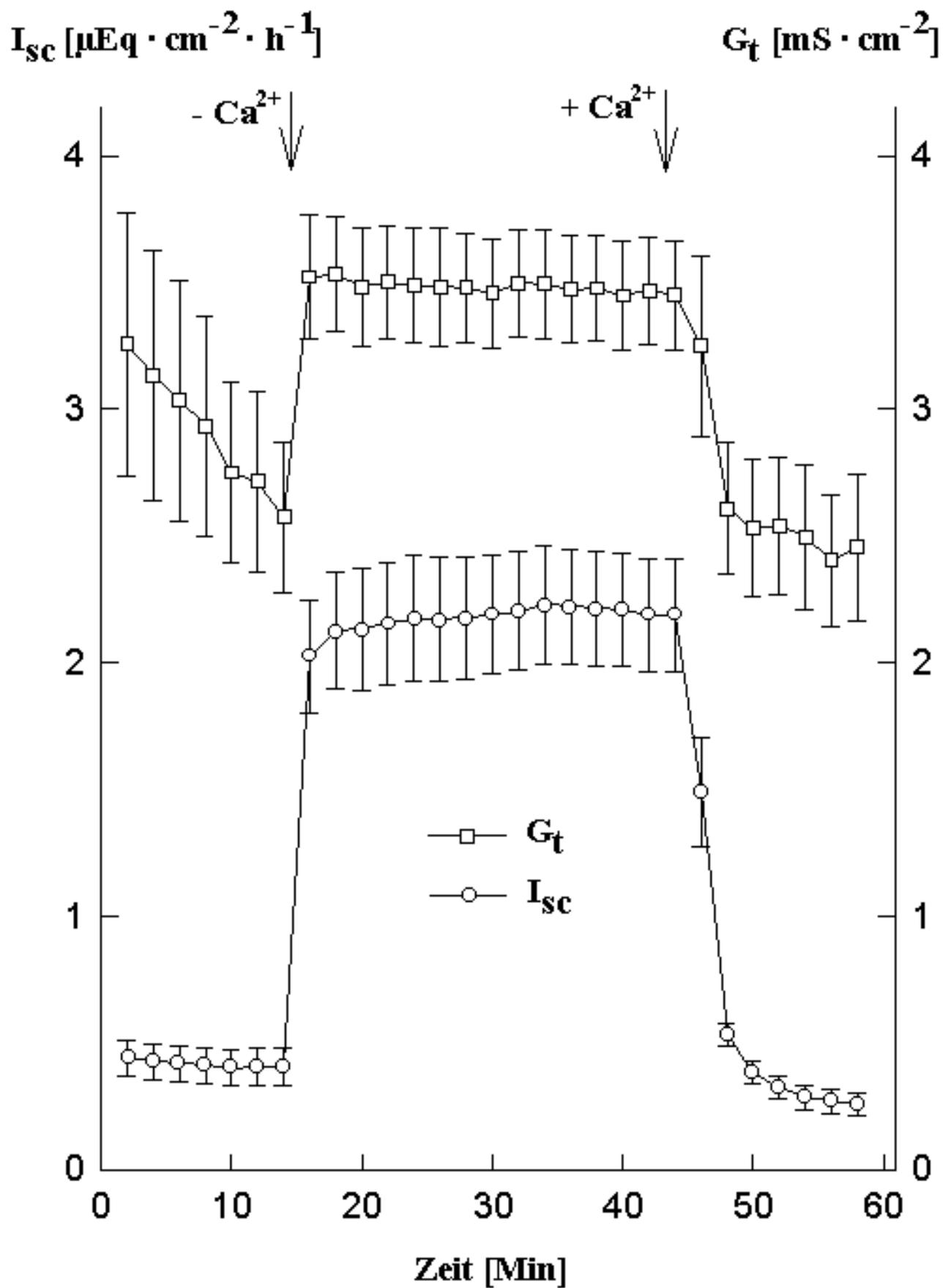


Abb. 1: Verlauf von Kurzschlußstrom (I_{sc}) und Gewebeleitfähigkeit (G_t) mit und ohne Calcium in der mukosalen Lösung; N/n = 4/11

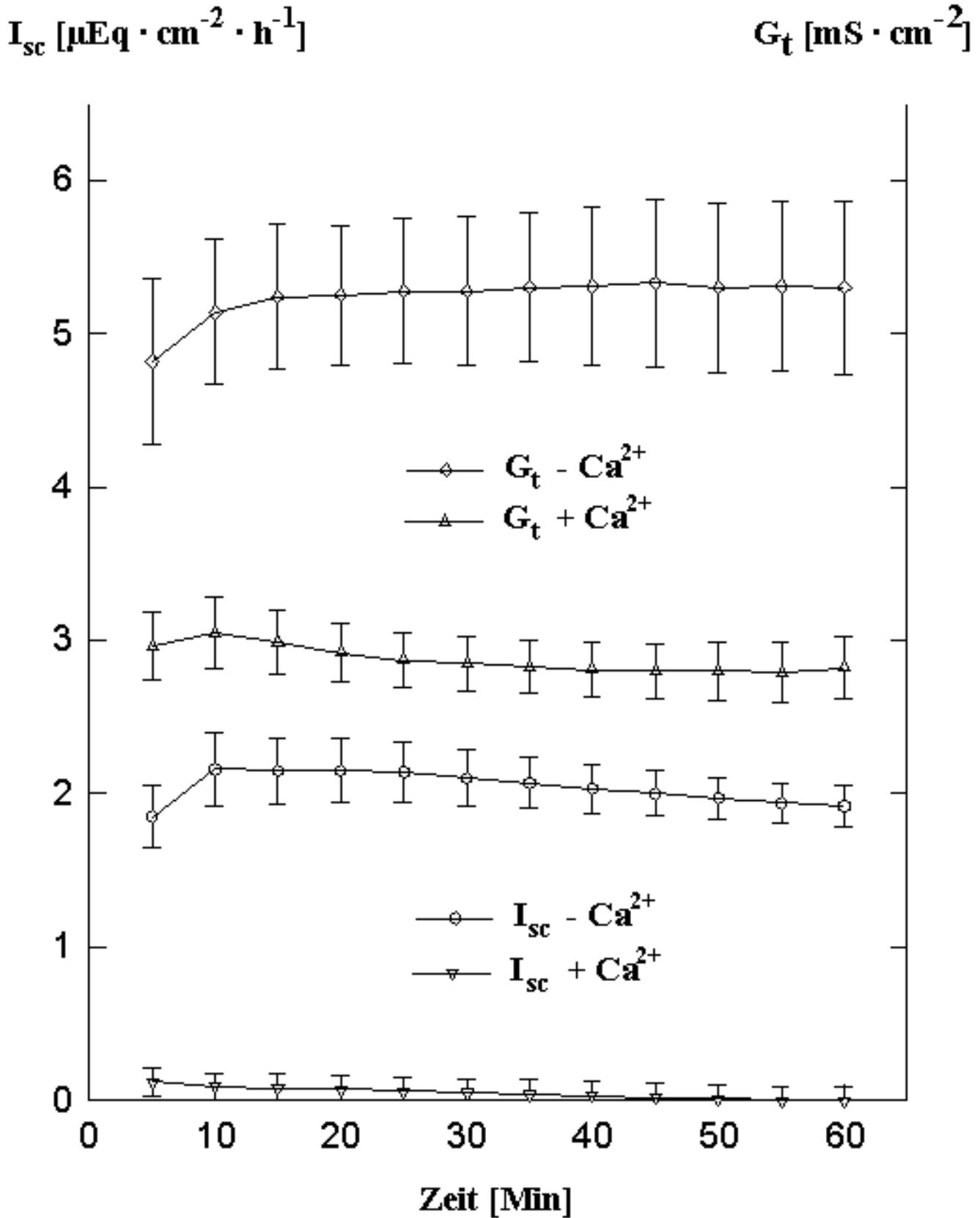


Abb. 2: Stabilität im zeitlichen Verlauf von I_{sc} und G_t des Pansenepithels mit und ohne Calcium in der mukosalen Lösung; N/n = 4/12

4.2 Transport von Natrium

4.2.1 Unidirektionale Transportraten

Die festgestellten Kurzschlußstromänderungen ($_{Diff}I_{sc}$) durch den Entzug von Calciumionen (Ca^{2+}) können theoretisch durch eine Anionensekretion von serosal nach mukosal oder durch eine Kationenresorption von mukosal nach serosal verursacht werden.

Um die Beziehungen zwischen Natrium und dem durch Ca^{2+} zu hemmenden Kurzschlußstrom I_{sc} genauer definieren zu können, wurden unidirektionale Natriumtransportraten mit und ohne Calcium gemessen. Die Versuche wurden unter Standardbedingungen gefahren mit Grundpuffer ohne Calcium und Magnesium. Nach der ersten Fluxperiode ohne Ca^{2+} wurde für die zweite Fluxperiode mukosal Ca^{2+} zugegeben.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Übersichtstabelle zusammengefaßt:

Tab. 3: Unidirektionale Fluxraten für den Natriumtransport, I_{sc} und G_t mit und ohne Ca^{2+} auf der mukosalen Seite.

**N / n = 4/12; Diff = (- Ca^{2+}) - (+ Ca^{2+}); * = p < 0,05
(ungepaarter t-Test, bzw. bei J_{netNa} Mann-Whitney)**

	J_{ms}^{Na}	J_{sm}^{Na}	J_{net}^{Na}	I_{sc}^{Na}	G_t [mS · cm ⁻²]
	[μEq · cm ⁻² · h ⁻¹]				
- Ca^{2+}	5,52 ± 0,27	1,71 ± 0,08	3,81 ± 0,33	2,31 ± 0,12	3,94 ± 0,22
+ Ca^{2+}	* 3,23 ± 0,18	1,55 ± 0,04	* 1,68 ± 0,16	* 0,27 ± 0,06	* 2,88 ± 0,26
Diff	2,29 ± 0,17	0,16 ± 0,10	n.s. 2,13 ± 0,21	2,04 ± 0,12	1,05 ± 0,16

Es fällt auf, daß sich für J_{net} und für den I_{sc} Veränderungen in der gleichen Größenordnung ergeben, die sich nicht signifikant unterscheiden. Die Ähnlichkeit zwischen diesen Meßgrößen weist darauf hin, daß der durch Calcium gehemmte positive Kurzschlußstrom dem elektrogenen Natriumtransport zugeordnet werden kann.

4.2.2 Einfluß transepithelialer Potentialdifferenzen auf den Natriumtransport

Jeder elektrogene Ionentransport wird durch die transepitheliale Potentiadifferenz (PD_t) beeinflusst. Um deren Auswirkung auf den elektrogenen Natriumtransport beschreiben zu können, wurde eine weitere Versuchsreihe mit unidirektionalen Fluxen durchgeführt, bei der die zu messenden Epithelien jeweils auf eine Potentialdifferenz von $PD = - 25$ mV, 0 mV und + 25 mV "geklemmt" wurden, ebenfalls wieder jeder Ansatz mit und ohne Calcium. Die **Tab. 4** gibt einen Überblick über die gemessen und errechneten Werte.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig den Einfluß der unterschiedlichen transepithelialen Potentialdifferenzen. FRIZZEL u. SCHULTZ (1972) haben die Grundlagen für diesen Zusammenhang am Kaninchencolon aufgezeigt und eine Formel erarbeitet, die eine Aufgliederung des Ionentransportes in eine potentialunabhängige elektroneutrale Komponente und eine diffusible, potentialabhängige und elektrogene Komponente erlauben. Die nach FRIZZEL u. SCHULTZ (1972) errechneten Werte ergaben für die vorliegenden Versuchsreihe die in **Abb. 3** dargestellten Geraden.

Es fällt auf, daß sich die Transportraten von serosal nach mukosal entsprechend der vorgegebenen Gleichung in Abhängigkeit von der PD_t verändern und sich nicht signifikant unterscheiden. Das ist offensichtlich nicht der Fall für den Na-Transport in der umgekehrten Richtung (Näheres siehe DISKUSSION).

Tab. 4: I_{sc} und G_t unidirektionaler Natriumtransportraten, aufgezeichnet bei -25 mV, 0 mV und +25 mV, N/n = 4/11

Klemmpotential -Ca²⁺	- 25 mV	0 mV	+ 25 mV
$J_{ms}^{Na} [\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}]$	8,27 ± 0,90	5,20 ± 0,38	3,98 ± 0,49
$J_{sm}^{Na} [\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}]$	1,36 ± 0,13	1,70 ± 0,13	2,43 ± 0,15
$J_{net}^{Na} [\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}]$	6,84 ± 0,84	3,39 ± 0,49	1,55 ± 0,49
$I_{sc} [\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}]$	2,60 ± 0,54	2,44 ± 0,35	2,29 ± 0,47
$G_t [mS \cdot cm^{-2}]$	7,52 ± 0,13	5,72 ± 0,88	5,04 ± 0,69

Klemmpotential Diff = (- Ca) - (+ Ca)	- 25 mV	0 mV	+ 25 mV
$J_{ms}^{Na} [\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}]$	4,19 ± 0,64	2,02 ± 0,48	0,80 ± 0,61
$J_{sm}^{Na} [\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}]$	0,20 ± 0,22	0,34 ± 0,18	0,17 ± 0,30
$J_{net}^{Na} [\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}]$	3,99 ± 0,61	1,68 ± 0,61	0,63 ± 0,53
$I_{sc} [\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}]$	2,05 ± 0,47	1,81 ± 0,47	1,73 ± 0,39
$G_t [mS \cdot cm^{-2}]$	3,57 ± 0,98	2,00 ± 0,98	1,06 ± 0,41

I_{sc} [$E\mu q \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$]

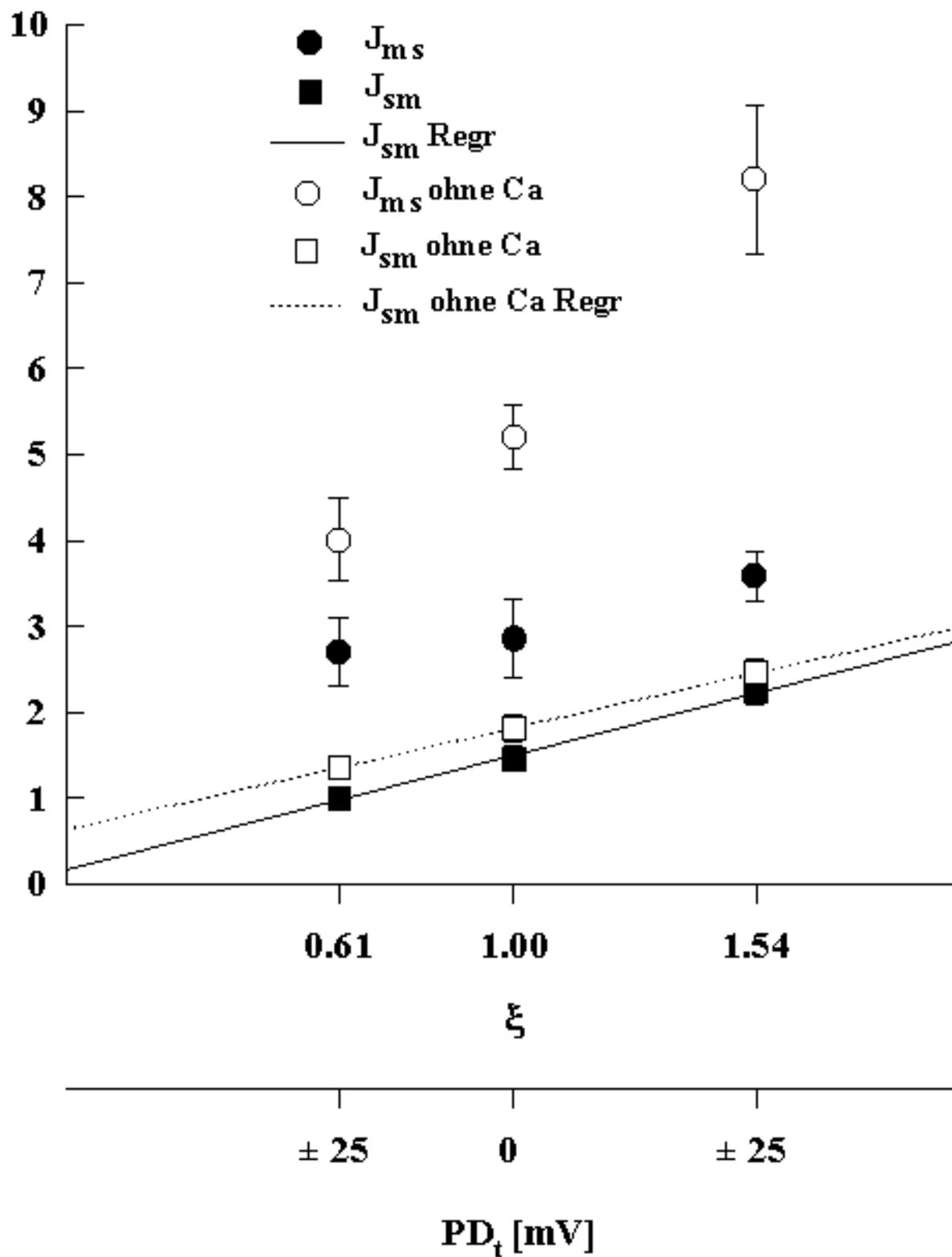


Abb. 3: Verschiedene Natriumtransportraten mit und ohne Calcium mit unterschiedlichen PD_t : - 25, 0, und + 25 mV

$$J_{ms} \text{ Regs: } y = 0.16 + 1.34 \cdot \xi ; r = 0.74$$

$$J_{ms} \text{ ohne Ca Regr: } y = 0.63 + 1.18 \cdot \xi ; r = 0.57$$

$$N/n = 4/12$$

4.2.3 Unidirektionale Mannittransportraten

Die Leitfähigkeit eines Epithels ergibt sich aus der Summe der zellulären und parazellulären Leitfähigkeiten. Die in den vorherigen Versuchen aufgezeigten, Ca-sensitiven Änderungen zeigen einen engen Zusammenhang zwischen I_{sc} und G_t auf, lassen auf überwiegend zelluläre Prozesse schließen und legen nahe, daß es sich bei der Änderung der Leitfähigkeit um eine Änderung der Na-Leitfähigkeit handelt. Da aber bekannt ist, daß Calcium auch die parazelluläre Leitfähigkeit beeinflussen kann, wurde in einer weiteren Versuchsreihe durch die Bestimmung von Mannittransportraten eine mögliche Änderung der parazellulären G_t geprüft.

Mannitol ist eine parazellulär permeable Substanz, die mit radioaktiv markierten ^{14}C als Markersubstanz zur Beurteilung von parazellulären Transportprozessen eingesetzt wird. Die Mannittransportrate (J_{ms}^{Man}) ist somit ein Maß für die parazelluläre Durchlässigkeit. In der **Tab. 4** sind die Versuchsergebnisse aufgezeigt.

Tab. 4: J_{ms}^{Man} = Mannittransportrate mit und ohne Calcium; N/n = 4/12

	J_{ms}^{Man} [$\mu\text{mol} \cdot \text{cm} \times \text{h}^{-1}$]	I_{sc} [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm} \times \text{h}^{-1}$]	G_t [$\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$]
- Ca^{2+}	0.09 ± 0.01	3.25 ± 0.34	5.44 ± 0.45
+ Ca^{2+}	0.10 ± 0.01	-0.01 ± 0.06	3.18 ± 0.46

Mit $0,09 + 0,01$ [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$] für J_{ms}^{Man} ohne Calcium und $0,10 + 0,01$ [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$] für J_{ms}^{Man} mit Calcium ist eine signifikante Änderung nach Calciumeinsatz nicht nachweisbar, obwohl I_{sc} und G_t die schon aus den beiden vorhergehenden Versuchsreihen bekannten Differenzen zeigen. Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß sich unter den gewählten Versuchsbedingungen die parazelluläre Permeabilität für Mannit nicht ändert und die Veränderungen der G_t daher sehr wahrscheinlich zellulär bedingt sind.

4.3 Elektrophysiologische Messungen

4.3.1 Unterschiedliche Natriumkonzentrationen

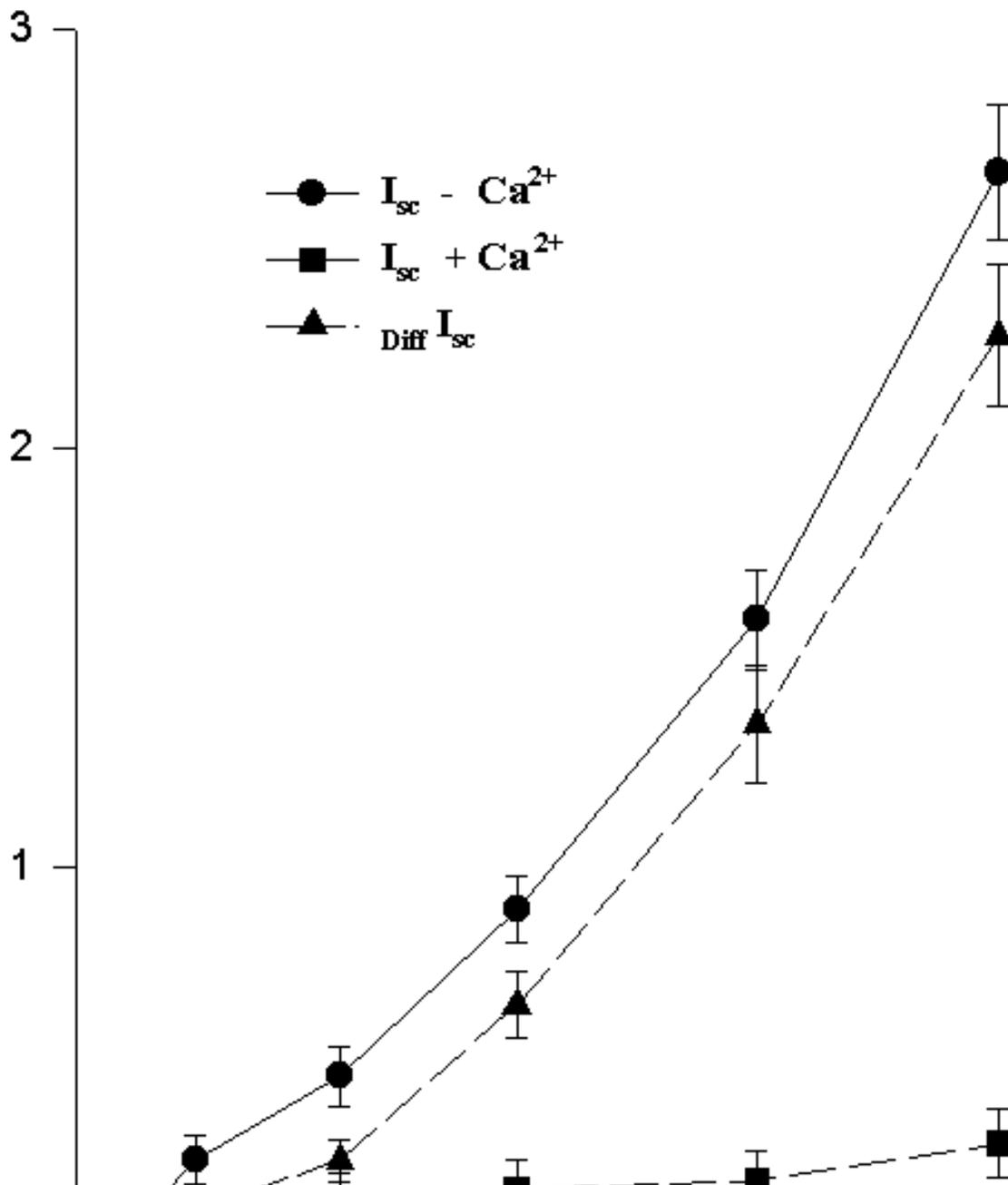
Wie die vorhergehenden Ergebnisse gezeigt haben, wird der gemessene Kurzschlußstrom von einem elektrogenen Natriumtransport verursacht, der unter Standardversuchsbedingungen durch Calcium gehemmt und durch Entfernung von Calcium wieder aktiviert werden kann. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß sich die Veränderungen des calcium-sensitiven Kurzschlußstromes durch unterschiedliche Natriumkonzentrationen entsprechend beeinflussen lassen.

Die folgende Versuchsreihe sollte deshalb zeigen, wie sich unterschiedliche Natriumkonzentrationen auf den calcium-sensitiven Natriumkurzschlußstrom auswirken. Dafür wurden Pufferlösungen mit 0, 15, 30, 55, 85 und 115 mM Natrium angesetzt und deren Auswirkungen auf den meßbaren I_{sc} mit und ohne Calcium

beobachtet. Um eventuelle Einflüsse durch höhere Natriumkonzentrationen auf serosaler Seite auszuschließen, wurden die entsprechenden Puffer nicht nur mukosal, sondern auch auf der serosalen Seite eingesetzt. Jede Natriumkonzentration wurde im Verlauf eines Versuches an jedem Epithel getestet, wobei die Reihenfolge systematisch verändert wurde, um zeitabhängige Veränderungen des I_{sc} zu eliminieren.

In der **Abb. 4** werden die Ergebnisse dargestellt. Es wurde deutlich, daß der I_{sc} unter calciumfreien Bedingungen entsprechend der Natriumkonzentration anstieg, während ab einer Natriumkonzentration von 30 mM mit Calcium keine signifikanten Unterschiede mehr darzustellen waren. Der $\text{Diff}I_{sc}$ stieg parallel zum absoluten I_{sc} . Der durch Calcium nicht zu beeinflussende Reststrom blieb nahezu gleich. Wie auch in anderen Geweben mit einem calcium-sensitiven Kurzschlußstrom konnte hier weder beim absoluten I_{sc} noch beim $\text{Diff}I_{sc}$ bei den hierbei eingesetzten Natriumkonzentrationen eine Sättigung beobachtet werden.

I_{sc} [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]



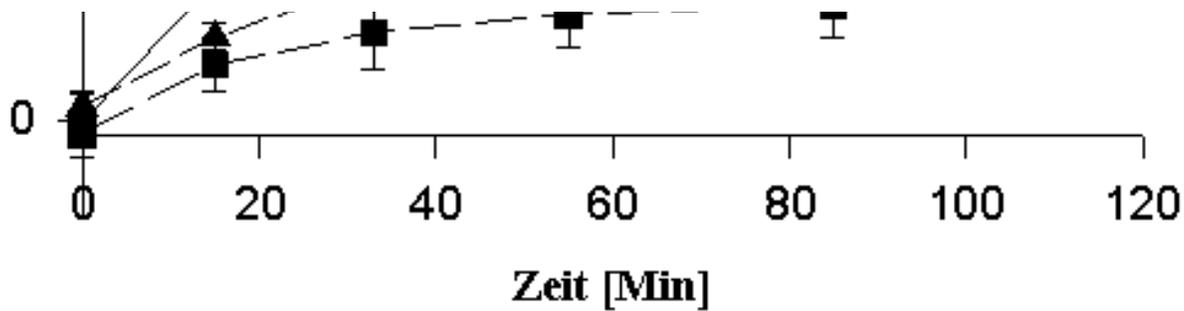


Abb. 4 Verhalten des I_{sc} bzw. $\text{Diff } I_{sc}$ bei steigenden Na-Konzentrationen in der mukosalen Pufferlösungen mit und ohne Calcium; N/n = 9/23

4.3.2 Natrium und andere monovalente Kationen

Die Zunahme des I_{sc} unter Ca-freien Bedingungen ist sehr wahrscheinlich auf die Aktivierung eines Kationenkanals in der luminalen Membran zurückzuführen. Um die Spezifität dieses Kanals für verschiedene andere monovalente Kationen zu prüfen, ist eine Versuchsreihe angesetzt worden, in der das Natrium des Grundpuffers durch andere monovalente Ionen der Alkalimetalle aus der ersten Hauptgruppe ersetzt wurde. Die isoosmotischen Puffer für die mukosale Seite enthielten in diesen Ionenersatzexperimenten statt der 115 mM Na^+ jeweils 115 mM Lithium (Li^+) Rubidium (Rb^+), Caesium (Cs^+) und Kalium (K^+).

Nach der üblichen Äquilibrationszeit von ca. 15 Minuten wurde jedes Gewebe durch Austausch der Pufferlösung auf der mukosalen Seite nacheinander mit dem jeweiligen Ion beschickt. Um eine Beeinflussung durch Zeit und Reihenfolge weitestgehend auszuschließen, sind die Versuchsabläufe so gestaltet worden, daß jedes Ion zu jedem Zeitpunkt, in der jeweils veränderten Reihenfolge gemessen wurde.

Nach weiteren 15 Minuten - neues *steady state* - wurde auf der mukosalen Seite Calcium zugegeben, um den so zu hemmenden Kurzschlußstrom zu ermitteln.

Die **Tab. 5** macht deutlich, daß der durch divalente Kationen in der mukosalen Lösung zu blockierende Transportkanal nicht nur für Natrium passierbar ist, sondern eine unspezifische Permeabilität für monovalente Kationen zeigt. Nach den ermittelten Werten für den calcium-sensitiven Anteil des Kurzschlußstromes kann folgende Reihe aufgestellt werden:



Bemerkenswert ist, daß bei Na^+ , Cs^+ und Li^+ der durch Calciumzugabe zu hemmende I_{sc} -Anteil im Mittel bei 80 % liegt. Ohne Calcium zeigen Rb^+ und K^+ einen fast doppelt so hohen I_{sc} als Na^+ , dabei werden bei Rb^+ im Mittel nur 60 % durch Ca-Zugabe gehemmt und bei K^+ im Mittel nur 35 % (siehe DISKUSSION). $\text{Diff } I_{sc}$ für Li^+ fällt signifikant geringer aus (verglichen mit Na^+).

Tab. 5: I_{sc} ohne Calcium, mit Calcium und $\text{Diff } I_{sc}$ nach Calciumzugabe zu mukosalen Pufferlösungen mit Rb^+ , Na^+ , Cs^+ , K^+ oder Li^+ ;

* = $p < 0,05$ (gepaarter t-Test) bezogen auf Na^+ , N/n = 4/22

Ion	- Ca ²⁺ I _{sc} [μEq · cm ⁻² · h ⁻¹]	+ Ca ²⁺ I _{sc} [μEq · cm ⁻² · h ⁻¹]	Diff I _{sc} [μEq · cm ⁻² · h ⁻¹]
Na ⁺	2,69 ± 0,14	0,32 ± 0,05	2,37 ± 0,13
Rb ⁺	4,38 ± 0,24	1,69 ± 0,16	2,68 ± 0,21
Cs ⁺	2,93 ± 0,18	0,58 ± 0,10	2,35 ± 0,16
K ⁺	5,65 ± 0,30	3,65 ± 0,20	2,00 ± 0,20
Li ⁺	1,73 ± 0,16	0,31 ± 0,05	* 1,42 ± 0,12

Tab. 6. Verhältnis des I_{sc} ohne Calcium zur Diff I_{sc} nach Zugabe der divalenten Kationen Ca²⁺, bzw. Ba²⁺, Sr²⁺ und Mg²⁺; Diff I_{sc} von Ca²⁺ = 100%;

* = p < 0,05 (gepaarter t-Test) bezogen auf Ca²⁺, N/n = 4/11

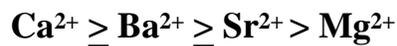
Ion	Diff I _{sc} [μEq · cm ⁻² · h ⁻¹]	I _{sc} [μEq · cm ⁻² · h ⁻¹]	% (Diff I _{sc})
Ca ²⁺	2,37 ± 0,19	2,99 ± 0,17	100
Ba ²⁺	2,29 ± 0,24	2,98 ± 0,22	97
Sr ²⁺	1,97 ± 0,21	2,59 ± 0,1	83
Mg ²⁺	* 1,81 ± 0,16	2,68 ± 0,23	76

4.3.3 Einfluß verschiedener divalenter Kationen

Für die Spezifizierung der Blockerwirkung von Calcium auf den elektrogenen Natriumtransport wurde in dieser Versuchsreihe Calcium (Ca²⁺) durch die divalenten Kationen Magnesium (Mg²⁺), Barium (Ba²⁺) oder Strontium (Sr²⁺) ersetzt. Durch den Einsatz dieser Edalalkalimetalle der zweiten Hauptgruppe soll ermittelt werden, ob die Sensitivität nur für Calcium gilt oder ob auch andere, 2-fach positiv geladene Ionen, in der Lage sind, den I_{sc} reversibel zu hemmen und welche Unterschiede aufzuzeigen sind.

Dafür wurden jeweils 4 Gewebe in wechselnder Reihenfolge mit dem jeweiligen Edalalkalimetall behandelt. Um den zeitlichen Einfluß auf die Meßgrößen soweit wie möglich auszuschließen, kamen die Kationen von Versuch zu Versuch nach einem vorgegebenen Zeitplan zum Einsatz, so daß jedes Ion zu jedem möglichen Zeitpunkt gemessen wurde.

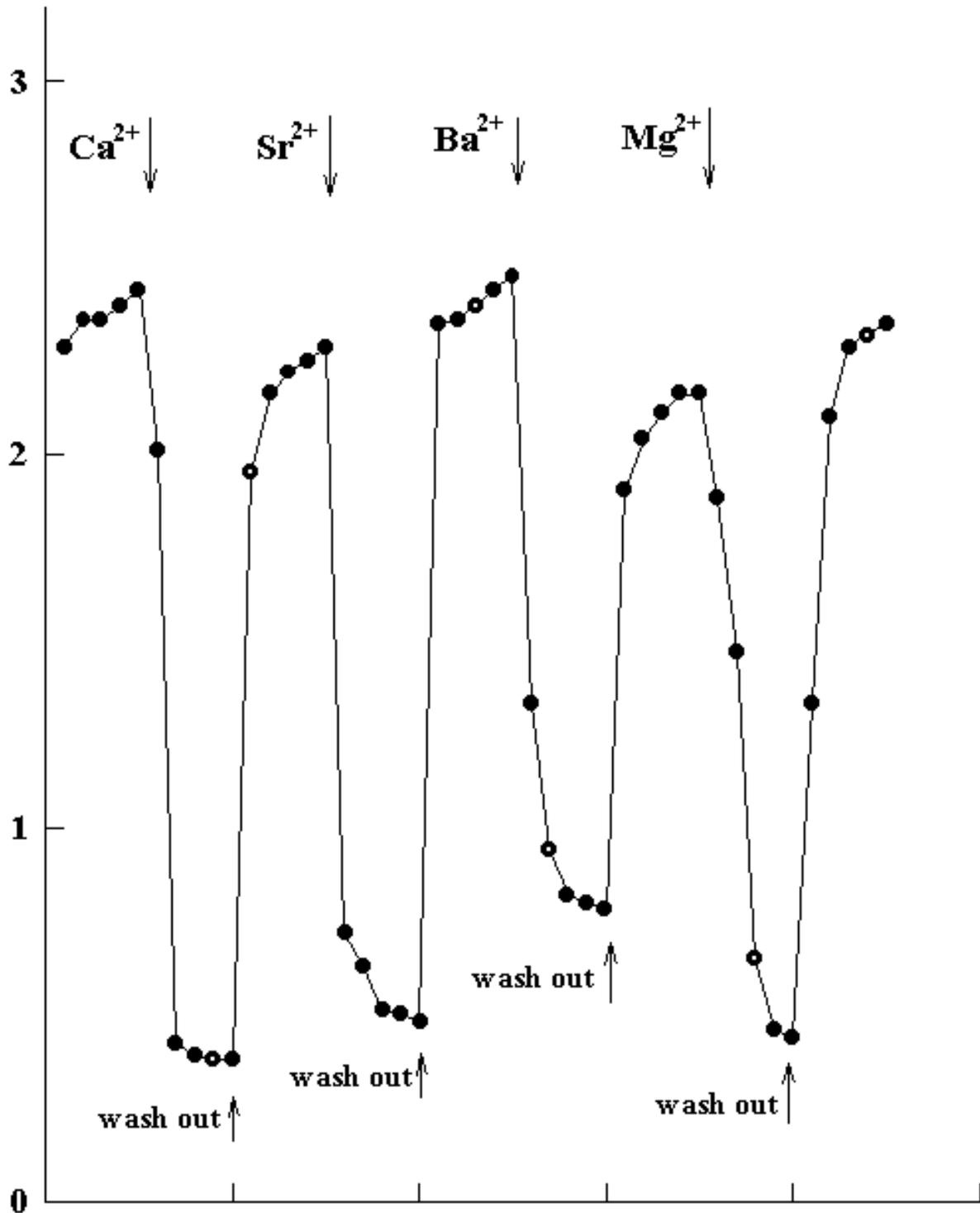
Es zeigte sich in allen Versuchen, daß die ausgewählten divalenten Ionen in Qualität und Quantität der Wirkung von Calcium sehr nahe kamen, nur für Mg²⁺ ließ sich ein signifikanter Unterschied feststellen. Aus der prozentualen Auswertung der Blockadewirkung von Ba²⁺, Sr²⁺ und Mg²⁺ im Verhältnis zu Ca²⁺ ergab sich die folgende Sequenz:



Die Anordnung war unabhängig von Zeit und Reihenfolge der Zugabe und entspricht der EISENMAN-Sequenz III für divalente Ionen.

Abb. 5 zeigt am Beispiel eines einzelnen Epithelstückes den Verlauf und die Reversibilität der verschiedenen Zugabezyklen von Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} und Mg^{2+} . Außerdem wird die in den Vorversuchen festgestellte Reversibilität der Hemmung und Stabilität des Gewebes deutlich.

I_{sc} [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]



0 **20** **40** **60** **80** **100**
Zeit [Min]

Abb. 5: Änderungen des Kurzschlußstromes I_{sc} unter Einwirkung der divalenten Ionen Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} und Mg^{2+} am Beispiel eines Gewebes

4.4 Charakterisierung des hemmenden Calciumeffektes

4.4.1 Zeitlicher Verlauf der Calcium-Hemmung

In den vorherigen Versuchsreihen wurde festgestellt, daß sich die Zugabe von Calcium zu einem calciumfreien Puffer auf der mukosalen Seite immer fast unmittelbar auf den durch Natrium verursachten Kurzschlußstrom auswirkte. Um den zeitlichen Verlauf der Hemmung genauer beschreiben zu können, wurde nach der üblichen Vorlaufzeit mukosal Calcium zugegeben und dann alle 6 Sekunden der I_{sc} und die G_t gemessen. Dabei war von besonderem Interesse, wie schnell sich ein *steady state* einstellen würde. Wie nach den vorhergehenden Versuchen erwartet, zeigte sich bei der Aufzeichnung wie in **Abb. 6** schon nach 2 Minuten ein deutlicher Abfall, der zwischen 8 und 10 Minuten sein *steady state* erreichte.

4.4.2 Konzentrationsabhängigkeit

In den vorherigen Versuchen wurde der Ca-sensitive Kurzschlußstrom immer vollständig durch 2 mM Calcium blockiert. Um die Empfindlichkeit des Kurzschlußstromes für verschiedene Calciumkonzentrationen zu testen, wurden in den folgenden Untersuchungen verschiedene Calciumkonzentrationen eingesetzt.

Nach schon bekanntem Vorlauf (ohne Calcium) wurde auf der mukosalen Seite die jeweils definierte Menge Calcium zugegeben. Für die Regulation der Hemmung ist nur das freie Calcium von Bedeutung, da für die Bindung im Kanal die freien Valenzen notwendig sind. Es wurden 10 Minuten nach jeder Manipulation die entsprechenden Werte für Strom und Leitfähigkeit und der pH-Wert gemessen, da die Konzentration an freiem Calcium pH-Wert-abhängig ist und deshalb als maßgebliche Größe in die Berechnung einbezogen werden muß. Mit Hilfe eines Computerprogrammes von KRATTENMACHER et al. (1991) wurde unter Einbeziehung der zugegebenen Calciumkonzentration und des jeweils gemessenen pH-Wertes die zur Wirkung kommende Konzentration an freiem Calcium errechnet.

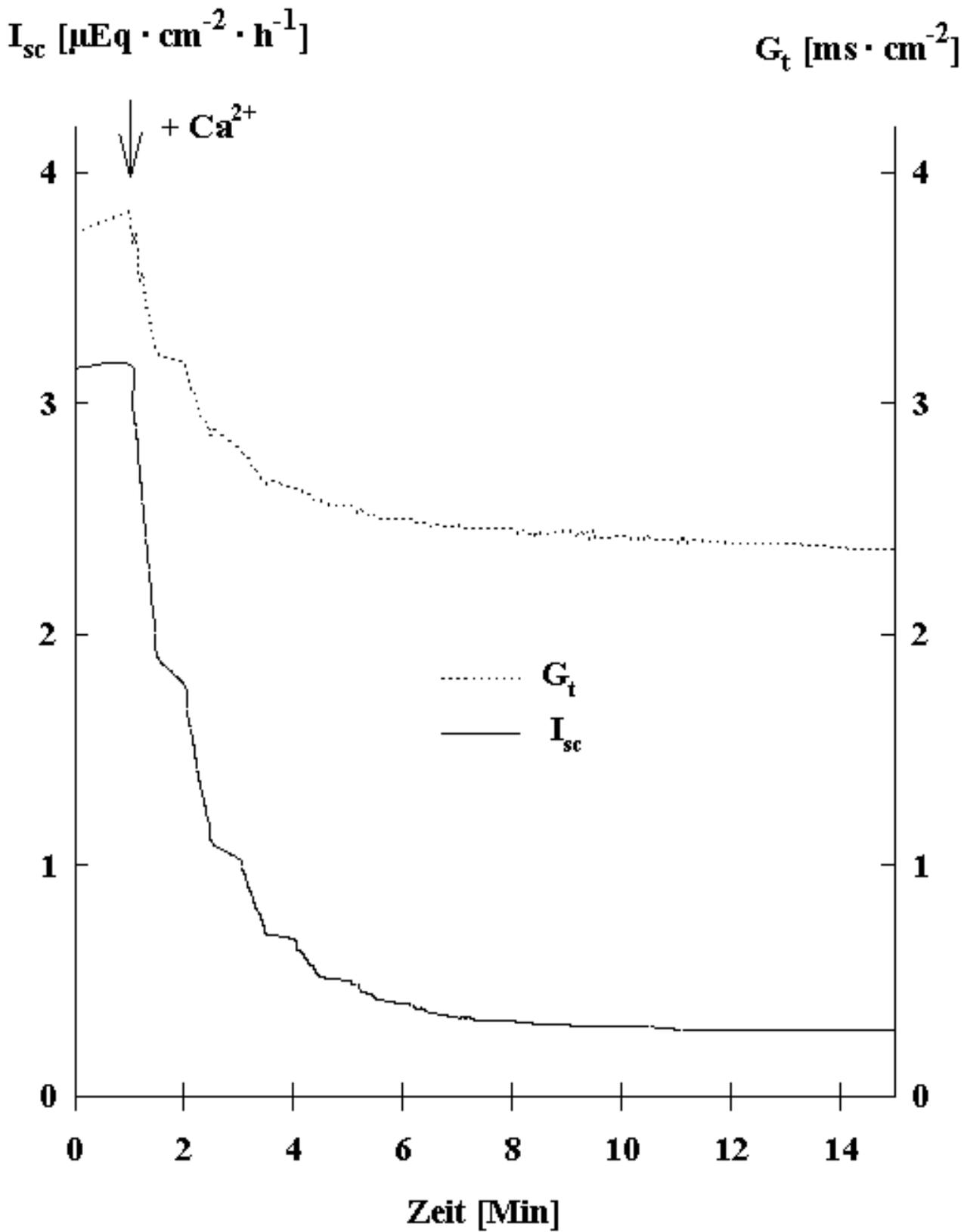


Abb. 6: Änderung des Kurzschlußstroms I_{sc} im Verlauf der Ca-Hemmung in den ersten 10 Minuten am Beispiel eines Gewebes

Tab. 7: Absolute und freie Calciumkonzentrationen, die zur Wirkung kamen und die entsprechenden Werte von I_{sc}^{Diff} ;**N/n = 5/15**

Ca²⁺-Zugabe [mM]	freies Ca²⁺ [μM]	I_{sc}^{Diff} [μEq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹]
1,000	0,11 \pm 0,00	0,51 \pm 0,09
1,400	0,35 \pm 0,02	1,02 \pm 0,12
1,600	0,76 \pm 0,05	1,33 \pm 0,21
1,750	1,48 \pm 0,08	1,49 \pm 0,22
1,850	2,88 \pm 0,15	1,64 \pm 0,22
1,925	5,95 \pm 0,42	1,78 \pm 0,23
1,950	9,55 \pm 0,59	1,84 \pm 0,23
1,975	20,98 \pm 1,27	1,88 \pm 0,24
1,995	50,80 \pm 3,14	1,92 \pm 0,24
2,000	474,24 \pm 43,57	1,95 \pm 0,24

$\text{Diff} I_{sc} [\mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}]$

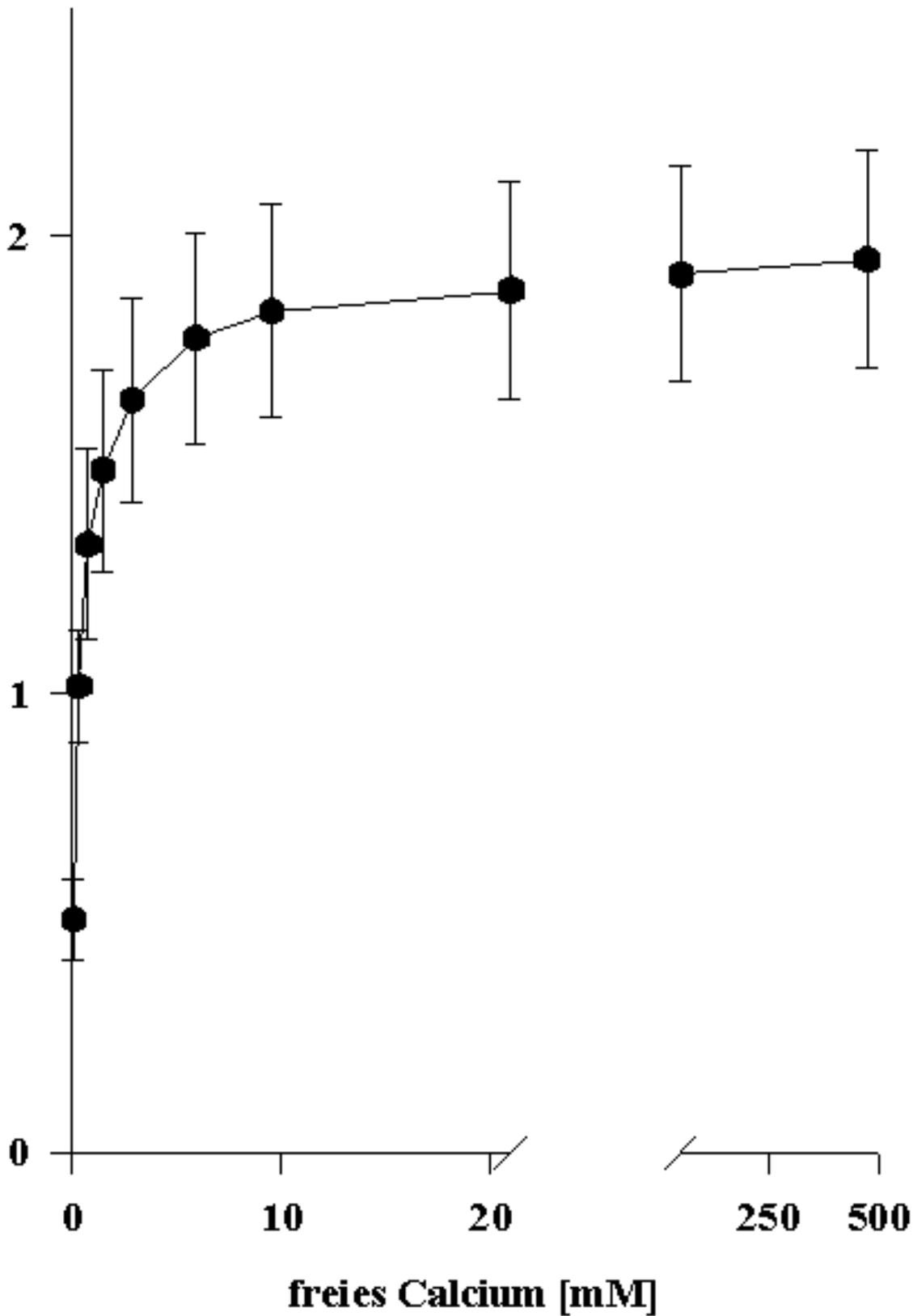


Abb. 7: Kurzschlußstromänderungen als $\text{Diff} I_{sc}$ aufgetragen, in ihrer Abhängigkeit zur Änderung der freien Ca-Konzentration; N/n = 5/15

4.4.3 Kinetik

Die erhaltene Beziehung zwischen freier Ca- Konzentration in der mukosalen Lösung und der Hemmung des Ca-sensitiven I_{sc} entspricht einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burg ermöglicht deshalb die Bestimmung von $K_m = 0,28 \mu M$ und $V_{max} = 1.85 \mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$. Die Regressionsgrade in **Abb. 7** zeigt die Linearität dieser Beziehung.

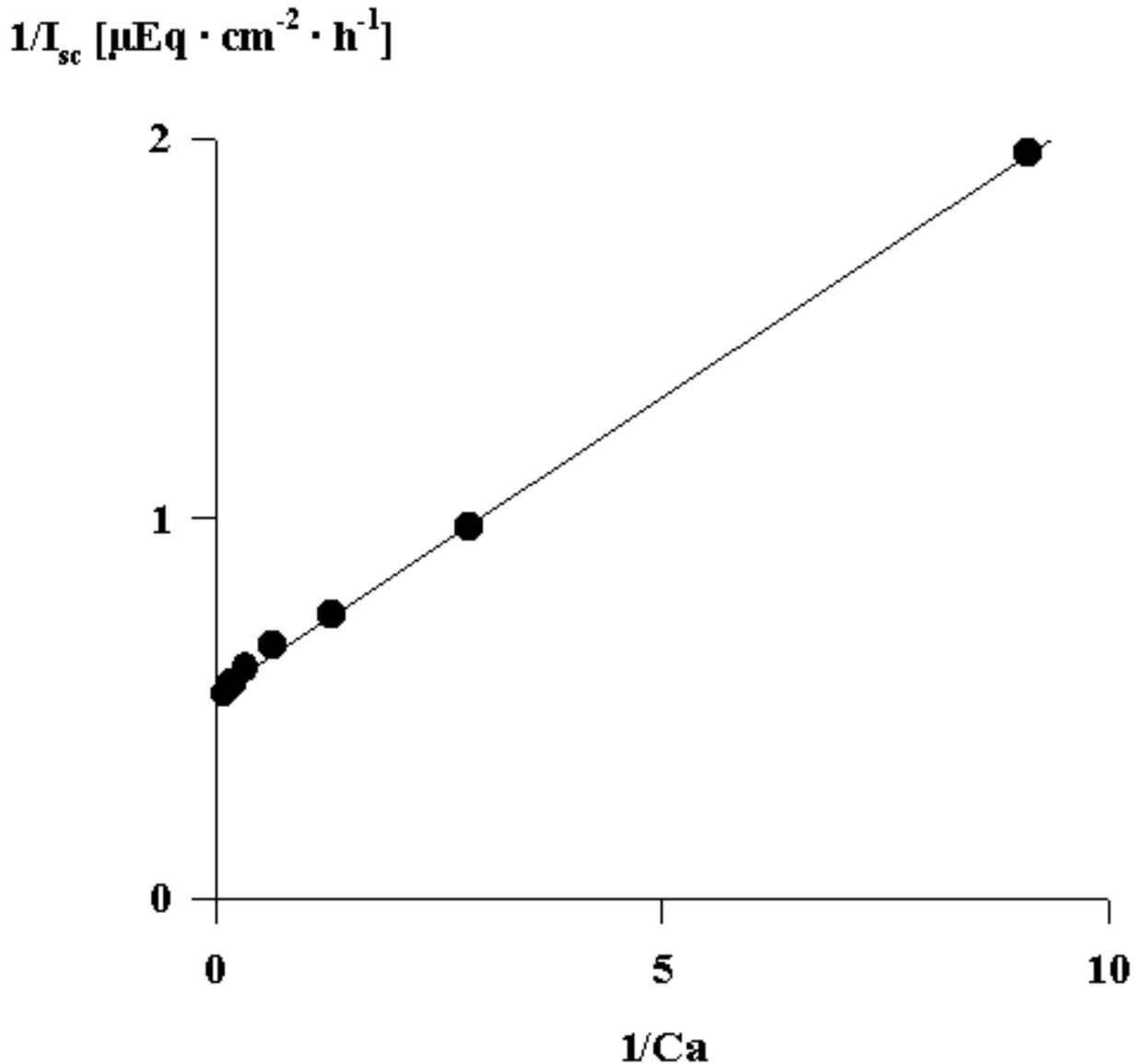


Abb. 8: Als Lineweaver-Burg-Plot dargestellte Beziehung zwischen $_{Diff}I_{sc}$ und freier Ca-Konzentration aus **Abb. 7**

$$y = 0.54 + 0156x; r = 0.99; N/n = 5/15$$

4.5 Wirkung von Amilorid, Theophyllin und Aldosteron

4.5.1 Amiloridsensitivität

Amilorid ist ein Guaninderivat, das pharmakologisch als Kalium sparendes Diuretikum eingesetzt wird. Als Wirkstoff gehört es zu den Kanalblockern und ist in der Lage, schnell und reversibel den elektrogenen Natriumtransport zu hemmen.

Um herauszufinden, ob das Pansenepithel in die Kategorie der amilorid-sensitiven oder -insensitiven Gewebe gehört, wurde der Natriumtransport daraufhin untersucht. Damit ein Vergleich mit anderen Geweben möglich war, kam Amilorid in einer Konzentration von ≥ 1 mmol/l (Hemmung des Na^+/H^+ -Austauschers) bis zu $\leq 0,1$ mmol/l (Hemmung von Natriumkanälen) zur Anwendung. Die mit DMSO entsprechend angesetzten Amiloridlösungen wurden in Abständen von 10 Minuten mukosal zugeben. Damit der zeitliche Effekt berücksichtigt werden konnte, mußte ein unbehandeltes Gewebestücke zur Kontrolle mitgemessen werden. Ein weiteres Stück Gewebe wurde nur mit der jeweiligen Zugabemenge des für Amilorid verwendeten Lösungsmittels DMSO behandelt, um dessen Einflüsse von der Amiloridwirkung abgrenzen zu können.

Tab. 8: Wirkung von Amilorid (1 - 100 μM) auf den I_{sc} ohne Calcium; die Unterschiede sind nicht signifikant (ungepaarter t-Test); N/n = 4/12

Zugabe [mM]	Amilorid I_{sc} [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]	DMSO I_{sc} [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]
0,001 Amilorid 2 Min. vor Zugabe	2.90 \pm 0.18	2.70 \pm 0.26
2 Min. nach Zugabe	2.77 \pm 0.16	2.62 \pm 0.27
0,010 Amilorid 2 Min. vor Zugabe	2.64 \pm 0.17	2.47 \pm 0.26
2 Min. nach Zugabe	2.46 \pm 0.17	2.37 \pm 0.23
0,100 Amilorid 2 Min. vor Zugabe	2.23 \pm 0.16	2.19 \pm 0.20
2 Min. nach Zugabe	2.08 \pm 0.18	2.07 \pm 0.20

Tab. 9: I_{sc} unter Einfluß von Theophyllin mit und ohne Calcium; N/n = 4/12

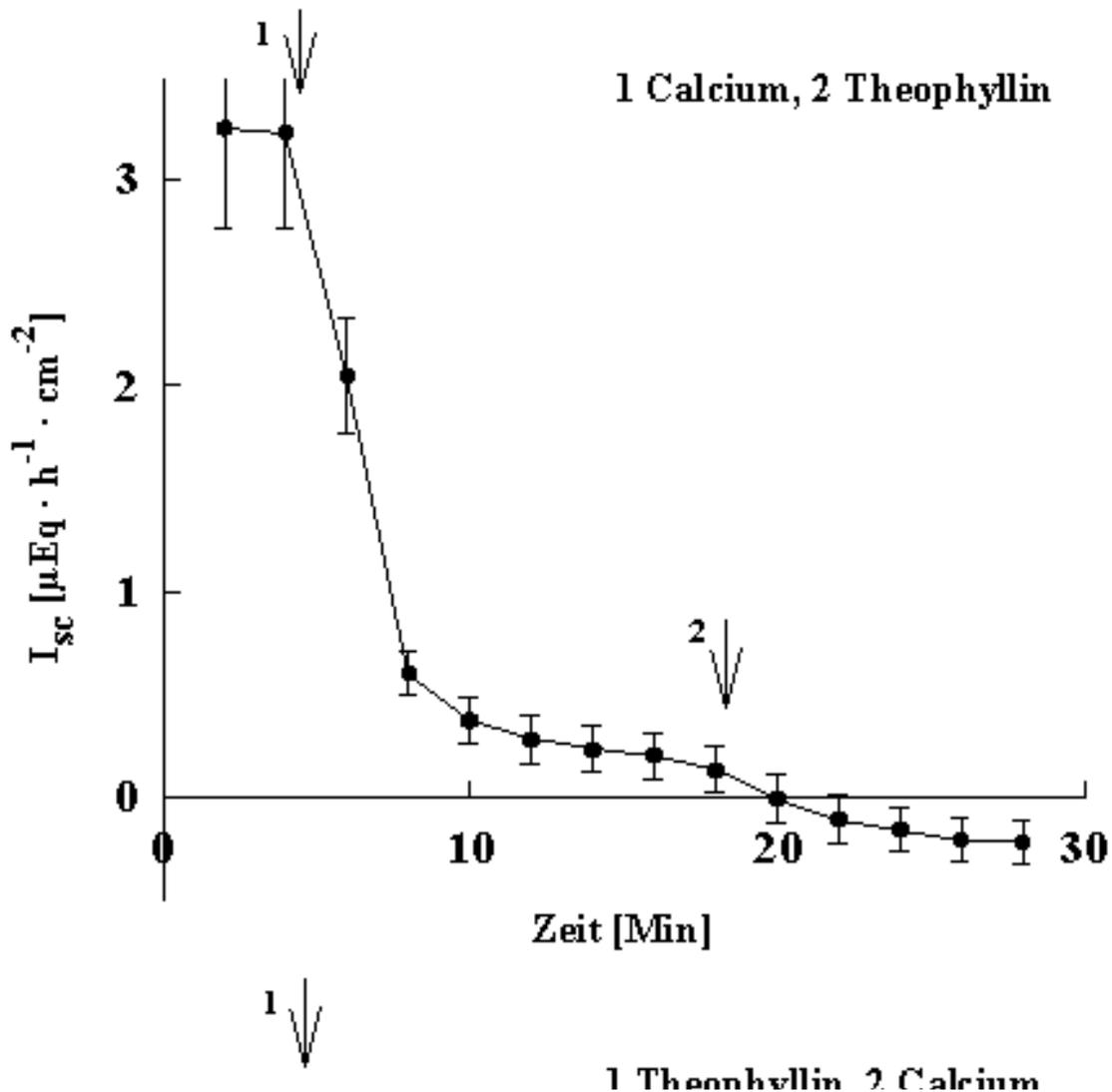
I_{sc} [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]		I_{sc} [$\mu\text{Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]	
absolut - Ca^{2+}	3,10 \pm 0,48	absolut - Ca^{2+}	2,86 \pm 0,51
+ Theo - Ca^{2+}	1,92 \pm 0,35	+ Ca^{2+} - Theo	0,29 \pm 0,11
+ Theo + Ca^{2+}	- 0,06 \pm 0,10	+ Ca^{2+} + Theo	- 0,10 \pm 0,08
Σ +Theo + Ca^{2+}	3.16 \pm 0.49	Σ Ca^{2+} + Theo	2.96 \pm 0.50

4.5.2 Theophyllin

Um den Einfluß von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) auf den calciumsensitiven Natriumstrom näher beschreiben zu können, wurde Theophyllin eingesetzt. Als Phosphodiesterasehemmer erhöht es die intrazelluläre cAMP-Konzentration und ist so Vermittler für viele Regulationsmechanismen und Transportvorgänge. Hier interessiert der Einfluß von cAMP auf den I_{sc} .

Für diese Versuchsreihe wurde Theophyllin in pulverisierter Form eingesetzt und nach der Vorlaufphase auf der mukosalen und serosalen Seite zugegeben. Die Menge war so gewählt, daß sich eine Konzentration von 10 mM ergab. Um die Calcium- und Theophyllinwirkung direkt vergleichen zu können, wurden in allen Versuchs-durchläufen 4 Epithelien parallel gemessen. Davon wurden 2 Gewebe als erstes mit Theophyllin und nach 30 Minuten mit Calcium behandelt, die übrigen 2 Gewebe in umgekehrter Reihenfolge. Dabei ist zu bemerken, daß unabhängig von der Reihenfolge der Zugabe von Calcium und Theophyllin das zuletzt erreichte Stromniveau der Hemmung gleich bleibt. Es wird deutlich, daß nur ein bestimmter Anteil des calcium-sensitiven Kurzschlußstromes durch Theophyllin gehemmt werden kann. Die Wirkung scheint von der jeweils vorliegenden Stromstärke abzuhängen. Diese Beobachtungen lassen sich mit der angewendeten Untersuchungsmethode nicht genauer differenzieren.

Wie aus der **Tab. 9** hervorgeht, kann ein gewisser Anteil des gemessenen Kurzschlußstromes durch Theophyllin gehemmt werden. Dabei scheint dieser Teil nur bedingt den calcium-sensitiven Kurzschlußstrom zu beeinflussen, da bei Calciumanwesenheit der Reststrom durch Theophyllin noch geringgradig zu senken ist. Die Wirkung ist reversibel, weil nach dem *wash-out* wieder das Stromausgangsniveau erreicht wurde.



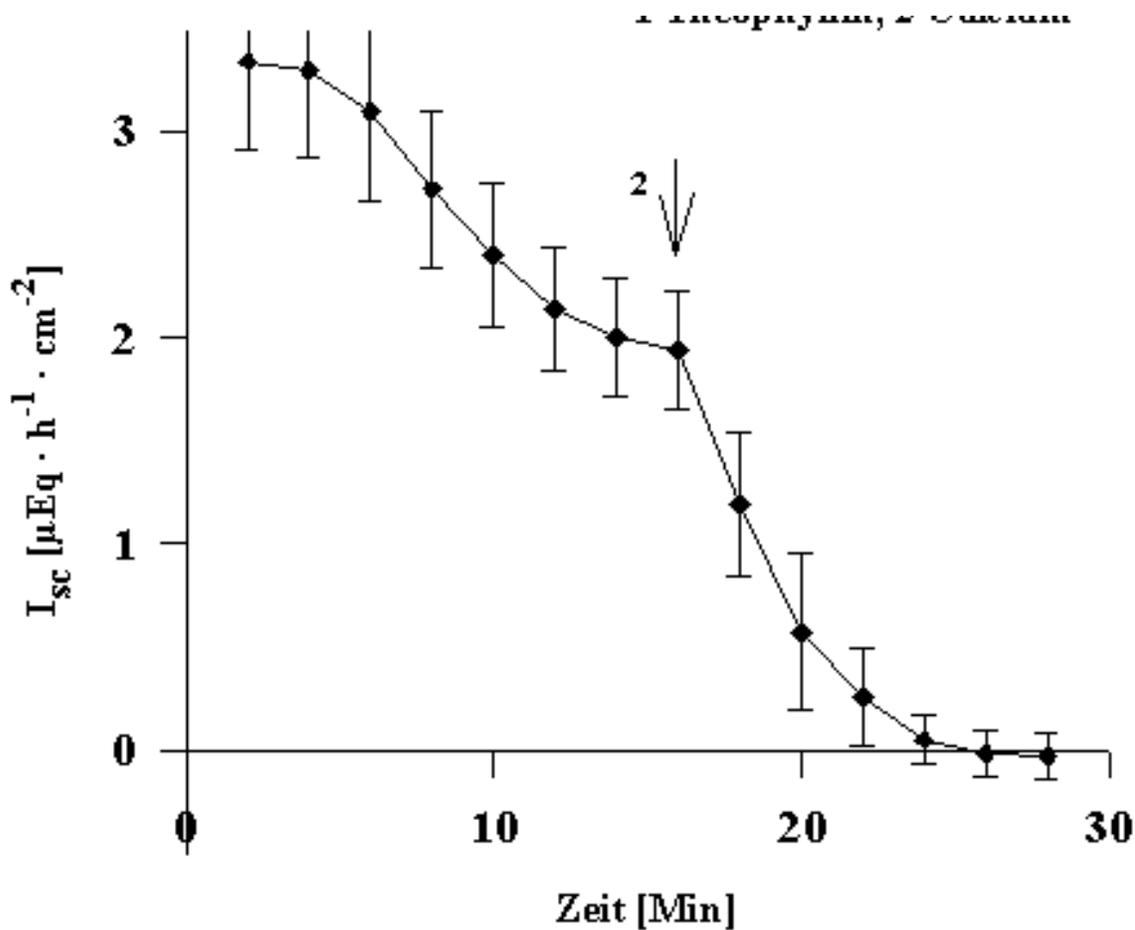


Abb. 9: Unterschiede in der Wirkung von Theophyllin mit und ohne Calcium in der Pufferlösung; N/n = 4/12

4.5.3 Aldosteron

Wie im Literaturteil beschrieben, wird an verschiedenen Geweben in Anwesenheit von serosalem Aldosteron, das durch eine Erhöhung der apikalen Leitfähigkeit einen vermehrten Natriumtransport nach serosal bewirkt, der Natrium-Kurzschlußstrom gesteigert. Bei calcium-sensitiven, amilorid-insensitiven Natriumtransporten wurde diese Wirkung bisher nicht nachgewiesen.

Ziel dieser Versuchsserie war es festzustellen, ob auch in diesem Fall eine Aldosteronwirkung nachzuweisen ist. Dazu wurden 4 Versuche mit jeweils 4 Epithelien durchgeführt, wobei entsprechend der Werte für Kurzschlußstrom und Leitfähigkeit

2 Versuchspaare mit je 1 Versuchs- und 1 Kontrollgewebe zusammen gestellt wurden. Im Gegensatz zum Standardversuchsablauf gab es hier einen 30-minütigen Vorlauf mit Calcium in der Pufferlösung, um einen stabilen Gewebezustand zu erreichen, erst dann wurde den jeweiligen Versuchsgeweben serosal 1 μM Aldosteron zugegeben. Nach 2 Stunden wurde mukosal bei allen Geweben der Puffer gegen einen calciumfreien Puffer ausgetauscht, nach weiteren 2 Stunden wurde mukosal wieder Calcium zugegeben, um den calcium-sensitiven Strom zu blockieren. Insgesamt wurden 5 Stunden registriert.

Weder mit noch ohne Calcium konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgeweben und den Geweben, die mit Aldosteron behandelt wurden, festgestellt werden.

Tab. 10: Wirkung von Aldosteron mit und ohne Calcium; N/n = 4/12

Zeit [Min]	Aldosteron $I_{sc} [\mu \text{ Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}]$	Kontrolle $I_{sc} [\mu \text{ Eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}]$
<u>Zugabe</u> Aldosteron		
2	$0,24 \pm 0,21$	$0,26 \pm 0,19$
120	$0,10 \pm 0,14$	$0,16 \pm 0,15$
240	$-0,4 \pm 0,13$	$-0,04 \pm 0,18$
<u>Entzug</u> Calcium		
250	$1,75 \pm 0,53$	$1,66 \pm 0,48$
360	$1,61 \pm 0,16$	$1,59 \pm 0,31$
<u>Zugabe</u> Calcium		
370	$0,11 \pm 0,12$	$0,06 \pm 0,23$

5 DISKUSSION

5.1 Methodenkritik

Die verwendete Untersuchungsmethode nach USSING (1949) bzw. USSING u. ZEHRAN (1951) ist in vielen vorhergehenden Arbeiten ausführlich erläutert worden und dort und in dieser Arbeit im Teil 2 (MATERIAL UND METHODEN) nachzu-lesen, so daß hier auf eine weitere Beschreibung verzichtet werden kann. Wichtig ist, daß durch den Einsatz definierter Pufferlösungen auf mukosaler und serosaler Seite des Epithels chemische Gradienten ausgeschaltet werden können und durch die Kurzschlußstrombedingungen auch der elektrische Gradient wegfällt. Diese in vitro Versuchsbedingungen erlauben die Untersuchung und Beurteilung einzelner Ionenbewegungen durch das Testgewebe. Damit lassen sich unter bestimmten Voraussetzungen die herrschenden in vivo Verhältnisse bei der untersuchten Tierart erklären.

Um möglichst gleiche Ausgangsbedingungen für die Versuche zu schaffen, bedurfte es einer sorgfältigen Vorarbeit. Kurz nach der Schlachtung: Präparatentnahme, schnelle und sorgfältige Präparation des Epithels unter ständiger Pufferspülung, Vermeidung von Temperaturschwankungen durch 38°C - warmen und begasten Transportpuffer, kurze Transportzeiten und zügiges Einsetzen in die Versuchsanlage. Des weiteren wurde darauf geachtet, daß aus dem sehr heterogenen Untersuchungsmaterial Epithelstücke mit möglichst ähnlicher Gewebestruktur ausgewählt wurden. Entsprechend den Vorversuchen kamen nur helle, kurzzottige und schwach verhornte Epithelstücke zum Einsatz. Trotz dieser Sorgfalt mußte bei einigen Versuchen in der Anfangsphase wegen zu niedriger Ströme oder zu hoher Leitfähigkeit, ein wichtiges Zeichen für die Intaktheit des Gewebes, abgebrochen werden.

Das Untersuchungsmaterial wurde Schlachttieren aus unterschiedlichen Einrichtungen entnommen, deren Lebens-, Haltungs- und Fütterungsbedingungen weitestgehend unbekannt waren und deshalb in die Beurteilung nicht mit einbezogen werden konnten. Obwohl auf möglichst ähnliche Gewebestruktur geachtet wurde, ist die Heterogenität der Tiere sicherlich eine Ursache für die oft große Streuung der gemessenen Werte. Um die Abweichungen so gering wie möglich zu halten, durften für die Vergleiche bestimmte Grenzwerte (s. 3.5.) für Strom und Leitfähigkeit nicht überschritten werden.

Zum Teil bleiben die Versuchsergebnisse unbefriedigend, da mit der verwendeten Untersuchungsmethode immer nur das gesamte Gewebe gemessen werden kann. Für differenziertere Aussagen sind Untersuchungen der Einzelzellen notwendig, die mit Hilfe der Mikroelektrode, der Patch-Clamp-Technik oder durch Vesikelstudien genauere Beschreibungen erlauben.

Für die Ergebnisse der Calcium-Dosis-Wirkungsbeziehung wurden die freien Calciumionen mit einem von KRATTENMACHER et al. (1991) entwickelten Computerprogramm errechnet. Als Berechnungsgrundlage mußten die genauen Werte der Phosphorkonzentration, der pH-Wert und die zugegebene Calciummenge eingegeben werden. Theoretisch enthielten die Pufferlösungen kein Calcium und damit auch keine freien Calciumionen. Da ferner bekannt ist, daß aus den Geweben Calcium in sehr geringen Mengen freigesetzt wird, erfolgte die übliche Pufferung des Ca^{2+} mit EGTA.

5.2 Diskussion der eigenen Ergebnisse

5.2.1 Elektrogener Na-Transport des Pansens im Vergleich zum klassischen Na-Transport

Die über das Pansenepithel veröffentlichten Studien (FERREIRA et al. 1966; CHIEN u. STEVENS, 1972; MARTENS u. GÄBEL, 1988; HENSELEIT, 1991) und auch die eigenen Beobachtungen zeigen für den transepithelialen, elektrogenen Na-Transport einen positiven Kurzschlußstrom (I_{sc}) auf. Diese Schlußfolgerung wurde aus der Tatsache abgeleitet, daß der Ersatz von Natrium den Kurzschlußstrom aufhebt und daß die Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase durch Ouabain ebenfalls zu einer praktisch vollkommenden Reduzierung des I_{sc} führt. Diese Beobachtungen lassen Übereinstimmungen mit Ergebnissen erkennen, die an Geweben mit klassischem Na-Transport gewonnen wurden (TURNHEIM et al., 1978). Trotz dieser Gemeinsamkeiten ergaben sich wesentliche Unterschiede, die aufzeigen, daß die generelle Klassifizierung "elektrogener Na-Transport" unzureichend ist.

Eine wesentliche Unterscheidung ergab sich aus der Tatsache, daß Amilorid - selbst in höchsten Konzentrationen - den Kurzschlußstrom im Schafpansen nicht zu hemmen vermochte. Dieses Diuretikum ist ein wirksamer und spezieller Blocker von Na-Kanälen in der apikalen Membran vieler Epithelien und nicht polaren Zellen, selbst bei geringer und sehr geringer Konzentration (BENOS et al. 1995). Das Fehlen eines Amilorideffektes könnte darauf hinweisen, daß der mutmaßliche Na-Kanal im Schafpansen für diesen Hemmstoff nicht empfindlich ist oder, alternativ dazu, seine bindenden Eigenschaften verloren hat. Diese Vermutung wurde von SELLIN u. DUBINSKY (1994) in Verbindung mit Erkenntnissen von LEWIS u. CLAUSEN (1991) diskutiert. In Untersuchungen von Harnblasen von Kaninchen haben diese Autoren beobachtet, daß luminale Proteasen einen Verlust der Hemmung des Na-Stromes durch Amilorid bewirken. SELLIN u. DUBINSKY (1994), die einen amiloridunempfindlichen Na-Transport in Untersuchungen am Kaninchenblinddarm beobachteten, diskutierten hierbei, daß der caecale Darminhalt möglicherweise in der Lage ist, luminale Membranproteine abzubauen und dadurch die mit Amilorid hervorgerufene Hemmung aufzuheben. Diese mögliche Erklärung könnte auch für das Pansen-epithel zutreffen, weil die mikrobielle Fermentation in den Vormägen dieser Wiederkäuer Aktivitäten von Proteasen einschließt. Untersuchungen mit Vormagenepithelien von Schafföten (120 - 140 Tage Tragezeit) haben jedoch einen positiven I_{sc}

ergeben, der auch keine Empfindlichkeit gegen Amilorid zeigte (MARTENS, unveröffentlichte Beobachtungen). Ein zweiter Grund für die Abwesenheit des Amilorideffektes könnte darin bestehen, daß die keratinisierten Zellen des verhornten Pansenepithels eine ausreichende Diffusion des Amilorids zu der transportierenden Membran tief im Epithel verhindern. Diese mögliche Erklärung erscheint unwahrscheinlich, da hohe Konzentrationen von Amilorid den Na^+/H^+ -Austauscher hemmen (MARTENS u. GÄBEL, 1988), der mit großer Sicherheit in der Membran vorhanden ist, die auch die vermutete Na-Leitfähigkeit aufweist.

Der zweite, bedeutende Unterschied besteht darin, daß der Kurzschlußstrom durch Aldosteron nicht beeinflußt wurde. Aldosteron steigert in den Geweben mit dem klassischen Na-Transport die Kanalaktivität, damit den Na-Transport und die Gewebeleitfähigkeit (BENOS et al. 1995). In den vorliegenden Untersuchungen wurde durch die serosale Zugaben von $1 \mu\text{M}$ Aldosteron während einer Inkubationszeit von sechs Stunden der I_{sc} weder mit noch ohne Calcium in der Pufferlösung verändert.

Die sich aus der fehlenden Wirkung von Amilorid und Aldosteron ergebende Vermutung, daß sich der elektrogene Na-Transport des Pansens vom klassischen Na-Transport unterscheidet, wurde durch die Modulation dieses Transportes durch divalente Kationen in der mukosalen Lösung bestätigt. Aus diesem Grund wird daher die weitere Diskussion weitgehend nur die Befunde der Literatur einbeziehen, die sich mit der Wirkung von divalenten Kationen auf Transporteigenschaften von Epithelien beschäftigen. Im Vordergrund stehen dabei Ergebnisse über nicht selektive oder nichtspezifische Kanäle oder Leitfähigkeiten (NSCC).

5.2.2 NSCC und Na-Transport am Schafpansen

Seit Jahrzehnten ist hinreichend bekannt, daß divalente Kationen in extrazellulären Lösungen potente Modulatoren für Kanalfunktionen in erregbaren (AMSTRONG u. MATTESON, 1986) und in nicht erregbaren Zellen und Geweben sind (SIEMEN, 1993; Van DRIESSCHE et al., 1988). Ungeachtet der Tatsache, daß die Resultate bei der Vielzahl von Untersuchungen sehr heterogen waren, war die Antwort des I_{sc} in unseren Untersuchungen sehr ähnlich, wenn Ca^{2+} und Mg^{2+} in der mukosalen Lösung nicht vorhanden waren. Der Kurzschlußstrom wurde reversibel erhöht oder blockiert durch mukosalen Entzug oder wiederholte Zugaben von divalenten Kationen.

Eine weitere allgemeine Erkenntnis über die aktivierten Kanäle war die Selektivität für Kationen gegenüber Anionen und die nur schwachen Unterschiede zwischen den einwertigen Kationen. Daraus wurde die mittlerweile anerkannte Bezeichnung *non selective cation channel* oder *conductance* (NSCC), also - nicht selektiver Kationenkanal - (SIEMEN, 1993) für die aktivierten Kanäle.

Da die Funktionen und molekularen Strukturen der NSCC unvollständig sind und eine eindeutige Klassifizierung nicht nsport^{1,5} II - arbeiten parallel zu den amilorid-sensitiven Kanälen;

- sind in Anwesenheit von mukosalen divalenten Kationen aktiv;

- steigern die Aktivität durch Entzug von mukosalen divalenten Kationen Koprodeum von Hühnerembryonen, u. adulten Hühnern⁸;

Blutegelhaut¹⁵ Ontogenetische Entwicklung der

Na-Transporte⁸,

Na-Transport¹⁵,

Ca-Leitfähigkeit¹⁵ III - keine amilorid-sensitiven Kanäle;

- aktiv bei Anwesenheit von mukosalen divalenten Kationen;

- weitere Aktivierung durch Entzug von divalenten Kationen Colon des *Xenopus*^{9,10},

Schafpansen,

Schafpsalter¹³,

Kaninchen-caecum¹⁴,

menschliche Keratinozyten⁷ Na-Transport in Anwesenheit mukosaler divalenter Kationen, der nicht amilorid-sensitiv ist, Funktion unbekannt **IV** - keine amilorid-sensitiven Kanäle;

- keine Aktivität in Anwesenheit mukosaler divalenter Kationen;

- Aktivierung durch Entzug von mukosalen divalenten Kationen Ectoderm von Hühnerembryonen¹² unbekannt¹²

1. DAS, S. u. L.G. PALMER (1989), 2. Driessche, W. v. u. W. Zeiske. (1985),

3. DRIESSCHE, W. v. (1987), 4. DRIESSCHE, W. v. et al. (1994), 5. Driessche, W. v. u. D. ERLIJ. (1994), 6.

ERLIJ, D. et al. (1992), 7. Galiotta, L. J. V. et al. (1991), 8. HEINZ, M. et al. (1991), 9. KRATTENMACHER,

R. et al. (1990), 10. Krattenmacher, R. et al. (1991), 11. Leonhard, S. et al. (1990), 12. Li, J.Q. et al. (1994),

13. SCHULTHEISS, G. (1995),

14. SELLIN, J.H. u. W.P. DUBINSKY (1994), 15. Weber, W. et al. (1995)

5.2.2.1 NSCC in Geweben mit amilorid-sensitivem Natriumtransport (Gr. I)

CURRAN u. GILL (1962) veröffentlichten die ersten Untersuchungen, in denen Ca-freie Lösungen auf der mukosalen Seite reversibel den I_{sc} an der Froschhaut steigerten. Sie vermuteten eine ansteigende

Natriumdurchlässigkeit der äußeren Membran nach dem Entzug von Calcium. Diese frühen Untersuchungen, die durch Untersuchungen von van DRIESSCHE u. ZEISKE (1985) näher beschrieben

wurden, haben eine Natriumaufnahme durch Kanäle der apikalen Membran der Froschhaut dargelegt, die parallel zu den amilorid-sensitiven Kanälen vorhanden sind. Untersuchungen, in denen Natrium durch

andere einwertige Ionen ersetzt wurde, haben gezeigt, daß dieser Kanal durchlässig ist für andere monovalente Kationen und daß divalente Kationen in mikromolaren Konzentrationen diesen Kanal

vollständig blockieren (Van DRIESSCHE u. ZEISKE, 1985). Da diese Beobachtungen Ähnlichkeiten mit Calciumkanälen in der Froschmuskelmembran (ALMERS et al., 1988) und im Herzgewebe (HESS u.

TZIEN, 1984) haben, versuchten Van DRIESSCHE u. ZEISKE (1985) Calciumströme zu messen. Es gelang ihnen jedoch nicht, Calciumströme zu registrieren oder die Effekte von Ca-Kanal-Blockern aufzuzeigen. Ein

mit Ag^+ (40 nM) vorbehandeltes Epithel der Krötenharnblase wies einen Calciumkurzschlußstrom auf, was die Vermutung eines Calciumkanals in der apikalen Membran der Krötenharnblase unterstützt (Van

DRIESSCHE, 1987). DAS u. PALMER (1989) hingegen wiesen die Hypothese des Calciumkanals zurück. Sie untersuchten die Einzelkanal-Leitfähigkeit einer Kationen-Leitfähigkeit mit der Patch-Clamp-Technik

und vermuteten eine Kaliumleitfähigkeit, die durch mukosales Calcium blockiert wird und beim Kaliumtransport eine physiologische Rolle spielen könnte. Diese Vermutung ist in jüngeren Untersuchungen

von ERLIJ et al. (1992), Van DRIESSCHE u. ERLIJ (1994) und Van DRIESSCHE et al. (1994) in bezug auf A6-Zellen bestätigt worden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in Amphibiengeweben mit klassischem amilorid-sensitivem Natriumtransport eine Kaliumleitfähigkeit in der apikalen Membran existiert, die durch mukosales Calcium beeinflußt wird und möglicherweise beim Kaliumtransport und der Zellvolumenregulation eine Bedeutung hat. Die Untersuchungen von ERLIJ et al. (1992) haben gezeigt, daß die Calciumkonzentration im Krötenharn in etwa 100 μM beträgt und damit niedrig genug ist für die physiologische Modulation des Kaliumkanals durch Ca im Harn.

Zwei Beobachtungen an Vormagenepithelien scheinen im Hinblick auf die Ergebnisse aus Untersuchungen mit Amphibiengewebe wichtig zu sein. HOELLER et al. (1988) haben einen Calciumtransport von mukosal nach serosal durch das isolierte Pansen-epithel von Schafen nachgewiesen. Der Mechanismus des

vermuteten aktiven Calciumtransportes - luminale Aufnahme und basolaterale Ausschleusung - ist unbekannt. Ein Calciumkanal in der luminalen Membran kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, der als NSCC dienen könnte, wenn mukosal die divalenten Kationen entfernt wurden. Darüber hinaus weist das Pansenepithel eine Kaliumleitfähigkeit in der luminalen Membran auf (LEONHARD - MAREK u. MARTENS, 1996). Leider erlaubt der augenblickliche Kenntnisstand über den Calcium- und Kaliumtransport an Pansen-epithelien keine zufriedenstellende Schlußfolgerung über die mögliche Funktion der an diesen Transportmechanismen beteiligten Kanäle als NSCC. Aus diesem Grund ist eine eindeutige Aussage über die mögliche Bedeutung eines vermuteten Calcium- oder Kaliumkanals als NSCC nicht möglich. Trotz dieser Unsicherheit, die sich aus der unzureichenden direkten Charakterisierung der beteiligten Transportmechanismen ergibt, wird eine Beteiligung möglicher K- oder Ca-Kanäle am Ca-sensitiven I_{sc} für unwahrscheinlich gehalten. Vermutlich erfolgt durch die mukosale Entfernung von Ca^{2+} und Mg^{2+} eine Modulation des basalen elektrogenen Na-Transportes (siehe unten).

5.2.2.2 NSCC in Geweben mit amilorid- und divalentinsensitivem Natriumtransport (Gruppe II, III)

Gewebe der Gruppe **II** und **III** sind durch einen amilorid-insensitiven Natriumtransport gekennzeichnet, der auch mit divalenten Kationen in der mukosalen Lösung aktiv ist und der in bemerkenswerter Weise durch mukosalen Entzug von divalenten Kationen gesteigert wird. Im Coprodeum von Kücken und erwachsenen Hennen (HEINZ et al., 1991) und in der Blutegelhaut (WEBER et al. 1995) arbeitet ein amiloridsensitiver Natriumkanal parallel zu diesem Transportweg (Gruppe **II**). Das Colon von *Xenopus levis* (KRATTENMACHER et al., 1990), das Caecum der Kaninchen (CLAUSS, W. et al., 1989) und der Blättermagen von Schafen (SCHULTHEISS, 1995) zeigen nur einen amilorid-insensitiven, elektrogenen Natriumtransport (Gruppe **III**), der offensichtlich die Natriumabsorption in diesen Geweben übernimmt (statt des klassischen amilorid-sensitiven Natriumtransportweges).

Dieser amilorid-insensitive Natriumtransport der Gruppe **II** und **III** zeigt die übliche Beobachtung des I_{sc} -Anstieges nach Entzug von mukosalen, divalenten Kationen. Zwei mögliche Erklärungen werden für den calcium-sensitiven I_{sc} in Erwägung gezogen.

Die Wirkung der divalenten Kationen könnte darin bestehen, den vorhandenen, elektrogenen Na-Transport zu modulieren. Alternativ hierzu könnte der Entzug von divalenten Kationen einen Kationenkanal aktivieren, der bei Anwesenheit von divalenten Kationen vollständig blockiert ist. Da Einzelkanalstudien unter Anwendung der Patch-Clamp-Technik lediglich an menschlichen Keratinozyten gemacht wurden, ist eine klare Unterscheidung zwischen diesen beiden Alternativen nicht möglich und alle Schlußfolgerungen sind daher mehr oder weniger indirekter Art. Diese Schwierigkeiten der Interpretation der möglichen Wirkung von divalenten Kationen sind bei den eigenen Daten über den Schafpansen gegeben.

Zwei Beobachtungen ermutigen uns, die erste Möglichkeit (Einzelkanal) zu bevorzugen und vorzuschlagen: die Beeinflussung von amilorid-insensitiven Natriumtransportwegen durch mukosalen Entzug von divalenten Kationen.

Erstens wurde eine positiv lineare Korrelation zwischen I_{sc} plus Calcium und I_{sc} minus Calcium gefunden. War der I_{sc} mit Calcium im Puffer schwach, war auch die Antwort des I_{sc} ohne Calcium schwach bzw. umgekehrt. Nach derzeitigem Wissen ist eine solche Korrelation nicht berichtet worden und läßt annehmen, daß die Aktivität des vermuteten Natriumkanals mit Calcium die Antwort ohne Calcium bestimmt. Eine mögliche und wahrscheinliche Erklärung für diese Beziehung könnte in der spekulativen Vermutung bestehen, daß die Wahrscheinlichkeit der Kanalöffnung einer vermuteten Natriumleitfähigkeit nach Entzug

von divalenten Kationen ansteigt, wie auch die Kationenleitfähigkeit bei Patch-Clamp-Studien an kultivierten menschlichen Keratinozyten gezeigt hatte (GALIETTA et al., 1991).

Zweitens reduziert Theophyllin den I_{sc} mit und ohne Calcium und zeigt damit auch die enge Beziehung von I_{sc} mit und ohne Calcium. Theophyllin hemmt die Phosphodiesterase und läßt die zytoplasmatische Konzentration von cAMP ansteigen. Das Theophyllin die Kanalaktivitäten beeinflusst, wurde auch an anderen Geweben mit NSCC beobachtet und diente der Klassifizierung. Es ist hinreichend bekannt, daß der Kalium-kanal in der apikalen Membran von Krötenharnblasen durch das neurohypophysäre Hormon Oxytocin stimuliert wird und dadurch intrazelluläres cAMP angehoben wird (ERLIJ et al. 1986). Diese Stimulation durch Oxytocin wurde von Van DRIESSCHE et al. (1987) und von ERLIJ et al. (1992) bestätigt. Sie fanden einen deutlichen Anstieg der Kanalaktivitäten bei Abwesenheit von mukosalem Calcium. ERLIJ et al., (1992) vermuteten, daß die Eigenschaften der durch Oxytocin erhöhten Kaliumpassage ähnlich der beschriebenen durch Calcium zu blockierenden Kationenkanäle sein könnte.

5.2.3 Kurzschlußstrom (I_{sc}) und Leitfähigkeit (G_t)

Der Entzug von divalenten Kationen aus der mukosalen Lösung verursachte eine reversible und wiederholbare Veränderung des positiven Kurzschlußstromes, der in einer engen Beziehung zu der Natriumkonzentration der Pufferlösung stand. Natrium-fluxmessungen zeigten, daß der calcium-sensitive Strom dem veränderten Natriumtransport entsprach (J_{ms} und J_{net}). Diese Erkenntnisse bestärken die Auffassung, daß der calcium-sensitive I_{sc} einen elektrogenen Natriumtransport darstellt, der durch natriumleitende Kanäle in der apikalen Membran zur luminalen Natriumaufnahme führt, wobei das aufgenommene Natrium durch die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase herausgepumpt wird. Änderungen des I_{sc} waren immer mit einer Veränderung der G_t verbunden, die möglicherweise auf eine Änderung der Leitfähigkeit der apikalen Membran zurückzuführen ist. Jedoch können Auswirkungen auf die parazelluläre Leitfähigkeit nicht deshalb ausgeschlossen werden, weil für divalente Kationen wie Calcium Wirkungen auf *tight junctions* (parazelluläre Leitfähigkeit) beschrieben wurden (GONZALES-MARISCAL et al. 1990). Der Entzug von divalenten Kationen veränderte die Permeabilität der parazellulären Passagewege offensichtlich nicht. Die Fluxraten von Mannitol als Parameter für parazelluläre Diffusion sind weitgehend unbeeinflusst geblieben, und der PD-abhängige J_{sm} -Flux von Natrium, der wahrscheinlich passiv und parazellulär ist, blieb nahezu identisch. Diese Erkenntnisse stützen die Vermutung, daß Veränderungen der G_t nach Entzug von divalenten Kationen durch zelluläre Veränderungen, möglicherweise durch solche der apikalen Membran, hervorgerufen wurden.

5.2.4 Nicht selektive Kationenkanäle (NSCC) - Allgemeine Merkmale und Verschiedenartigkeiten

NSCC sind schon in unterschiedlichen Geweben gefunden worden (Van DRIESSCHE et al. 1988). Alle wurden von mikromolaren Calciumkonzentrationen gehemmt. Weiterhin besaßen diese NSCC eine Durchlässigkeit für eine gewisse Anzahl von monovalenten Kationen. Über diese allgemeinen und geläufigen Beobachtungen hinaus existieren signifikante und wichtige Unterschiede in bezug auf die Selektivität von monovalenten Kationen, Blockade durch divalente Kationen und im Hinblick auf die Sättigung des Ionentransportes.

5.2.4.1 Selektivität

Van DRIESSCHE u. ZEISKE (1985) beobachteten, daß die apikale Membran der Froschhaut für

verschiedene Kationen durchlässiger wird, wenn der mukosalen Lösung Calcium entzogen wurde. Sie beschrieben eine Durchlässigkeit für K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Tl^+ und NH_4^+ . Diese unspezifische Durchlässigkeit für monovalente Kationen ist eine gängige Beobachtung in allen Studien über calcium-sensitive Ströme an Epithelien. Dennoch muß deutlich betont werden, dass offensichtliche Unterschiede bestehen. Beispielsweise sind NSCC der Froschhaut (Van DRIESSCHE u. ZEISKE, 1985) oder im Colon von *Xenopus* (KRATTENMACHER et al., 1991) nicht durchlässig für Lithium, jedoch in der Krötenharnblase (DAS u. PALMER, 1989). NSCC in Kaninchencaecum hingegen ließen Caesium nicht passieren (SELLIN u. DUBINSKY, 1994). Diese Verschiedenartigkeit bedeutet offensichtlich, daß zwischen den NSCC Unterschiede bestehen. Dieser Schluß wird auch dadurch unterstützt, daß eine Beobachtung der Permeabilitätssequenzen für monovalente Kationen ähnlich viele Variationen gezeigt hat: Froschhaut $Na^+ \cong K^+ \cong Tl^+ > Rb^+ > Cs^+ > NH_4^+$ (Van DRIESSCHE u. Zeiske, 1985); Krötenharnblase $K^+ > Rb^+ = Na^+ > Cs^+ > Li^+$ (AELVOET et al., 1988); Hühnercoprodeum: $Cs^+ > Na^+ = K^+ > Rb^+ > Li^+$ (HEINZ et al., 1991); Kaninchencaecum: $Na^+ > K^+ > Li^+$ (SELLIN u. DUBINSKY, 1994), Schafblättermagen: $Na^+ > Li^+ \cong K^+ \cong Rb^+ \cong Cs^+$. Es muß jedoch betont werden, daß diese Sequenzen der Selektivität mit Vorsicht zu interpretieren sind, weil die elektrochemischen Gradienten durch die apikale Membran für die Ionen unbekannt waren (USSING-Kammer-Methode).

5.2.4.2 Divalente Kationen

Der calcium-sensitive Strom wird durch mikromolare Konzentrationen von Calcium in der mukosalen Lösung blockiert (Van DRIESSCHE et al., 1988). Eine Blockierung des Stromes wurde auch beobachtet, wenn andere divalente (Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+}) Kationen getestet wurden. Aber auch hierbei sind Unterschiede vorhanden. DAS u. PALMER (1989) nahmen eine grobe Einteilung der zweiwertigen Kationen in zwei Gruppen vor, abhängig von ihrem Effekt auf die luminale Kaliumleitfähigkeit in Krötenharnblasen: Ca^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} und Cu^{2+} mit hoher Affinität, Mg^{2+} , Ba^{2+} , oder Sr^{2+} mit schwächeren Effekten. Vergleichbare Beobachtungen konnten in den vorliegenden Untersuchungen gemacht werden. Im Vergleich zu Ca^{2+} wurden Mg^{2+} , Ba^{2+} und Sr^{2+} untersucht, die alle vier eine sehr ähnliche Wirkung zeigten, lediglich die Wirkung von Mg^{2+} fiel etwas niedriger aus. Allerdings wurde nur für Calcium die Dosis-Wirkungs-Beziehung näher untersucht. Dabei zeigte sich, wie schon an anderen Geweben (Van DRIESSCHE et al., 1988), daß die Hemmung schon bei mikromolaren Konzentrationen eintritt.

Die möglichen Interaktionen von zweiwertigen Kationen mit NSCC wurden bereits von DAS u. PALMER (1989) diskutiert. Eine Erklärung könnte eine einfache Blockierung des Kationenkanals durch zweiwertige Kationen sein. Diese Form der Hemmung sollte PD-abhängig sein, was aber in den Einzelkanalstudien von DAS u. PALMER (1989) und GALIETTA et al. (1991) nicht nachgewiesen werden konnte. Alternativ diskutierten DAS u. PALMER (1989) Veränderungen von Oberflächenbedingungen in der Nähe der Kanalöffnung. Welche Art der Hemmung an NSCC des Schafpansens vorliegt, kann aus den vorhandenen Daten nicht abgeleitet werden.

5.2.4.3 Sättigung

In den frühen Studien von AELVOET et al. (1988) bestand eine wichtige Beobachtung darin, daß calcium-sensitive Ströme bei ansteigender Natriumkonzentration keine Sättigung aufwiesen. Eine lineare Beziehung zwischen der Natriumkonzentration und dem calcium-sensitiven Strom durch NSCC ist sehr oft beobachtet worden (DAS u. PALMER, 1989; KRATTENMACHER et al. 1990; Van DRIESSCHE et al. 1991) und steht im Gegensatz zum klassischen Natriumtransport. Diese Beobachtung wurde daher als typische Eigenschaft von NSCC angesehen.

In den eigenen Versuchen wurde auch keine Sättigung gefunden (**Abb. 4**). Die erhaltenen Daten vermitteln vielmehr den Eindruck, daß sich bei steigender Na-Konzentration sogar eine überproportionale Zunahme des I_{sc} ergab. Diese ungewöhnliche Beziehung erlaubt eine mögliche Erklärung durch Untersuchungen von LANG u. MARTENS (1997). In dieser Studie wurde ein potentialabhängiger Kationenkanal in der apikalen Membran des Pansenepithels nachgewiesen, der durch die Depolarisation dieser Membran aktiviert wird. Damit bietet sich eine Erklärung für die oben angeführte Beziehung zwischen Na-Konzentration und I_{sc} an. Mit steigender Na-Konzentration erfolgt ein verstärkter Einstrom von Na, wodurch die apikale Potentialdifferenz depolarisiert, der potentialabhängige Kanal aktiviert und damit der I_{sc} erhöht wird. Die Existenz eines PD-abhängigen Kanals geht auch aus der **Abb. 3** hervor, in der der Na-Transport in Abhängigkeit von der transepithelialen Potentialdifferenz (PD_t) dargestellt wurde. Es zeigte sich, daß die erhaltenen Fluxraten von Na nicht linear mit der Funktion ξ korrelierten. Bei einer PD_t von + 25 mV (= apikale Depolarisation) ergaben sich eindeutig höhere Transportraten für Na als entsprechend der Funktion zu erwarten gewesen wären (siehe **Abb. 3**).

5.2.5 Physiologische Bedeutung des NSCC im Pansenepithel

Die Blockade von NSCC durch sehr niedrige mukosale Ca-Konzentrationen (μM) wirft die Frage auf, ob die Aktivierung von NSCC durch geringe mukosale Calciumkonzentrationen unter normalen in vivo Bedingungen eine physiologische Bedeutung hat. Es bestehen erhebliche Unsicherheiten, und hinsichtlich der möglichen physiologischen Funktion von calcium-sensitiven Strömen herrscht nach wie vor keine Klarheit (Van DRIESSCHE u. ZEISKE, 1985; KRATTENMACHER et al. 1991). Dennoch haben fortlaufende Studien in den letzten zehn Jahren an Krötenblasen gezeigt, daß der calcium-sensitive Strom in diesem Epithel beim Transport von Kalium und bei der Zellvolumenregulation eine wichtige Rolle spielen kann (DAS u. PALMER, 1989; ERLIJ et al. 1992). Diese Schlußfolgerung wird durch den Befund gestützt, daß die physiologische Ca-Konzentration im Krötenurin oft sehr gering ist ($< 0,1\text{mM}$), so daß eine Aktivierung von NSCC in diesem Epithel unter physiologischen Bedingungen möglich ist (ERLIJ et al. 1992).

Demgegenüber liegt die Konzentration von Ca^{2+} und Mg^{2+} in der Vormagenflüssigkeit von Schafen im millimolaren Bereich und hemmt damit den calcium-sensitive Strom (HALL, J. W. et al., 1988). Möglicherweise trifft diese Schlußfolgerung für alle NSCC im gesamten Gastrointestinaltrakt zu (KRATTENMACHER et al., 1990; HEINZ et al., 1991; SELLIN u. DUBINSKY, 1994). In diesem Zusammenhang sollte jedoch betont werden, daß die Epithelien des Gastrointestinaltraktes einen amilorid- und einen calcium-insensitiven Natriumtransport zeigen, der eine Natriumabsorption in Gegenwart einer physiologischen Konzentration von mukosalen divalenten Kationen sicherstellt. Die Aktivierung des Natriumtransportes durch Entzug von mukosalen zweiwertigen Kationen könnte als Regulation des basalen Natriumtransportes und möglicherweise als Eigenschaft des vermuteten Kanals angesehen werden. Ferner zeigte diese Eigenschaft, daß sich der elektrogene Na-Transport in diesem Gewebe eindeutig von dem klassischen Na-Transport unterscheidet.

Wenn sich zeigen sollte, daß der von LANG (1997) nachgewiesene PD-abhängige Kationenkanal identisch ist mit dem in diesen Untersuchungen studierten NSCC, dann ist eine klare Abgrenzung des elektrogenen Na-Transportes im Pansenepithel vom klassischen Na-Transport (amilorid-sensitiv) möglich.

6 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

An isolierten Pansenepithelien von Schafen wurde mit Hilfe der Ussing-Kammer-Methode ein calcium-sensitiver, elektrogener Na-Transport untersucht.

1. Die Entfernung von divalenten Kationen aus der mukosalen Lösung hatte eine erhebliche Steigerung des I_{sc} zur Folge. Durch wiederholte Zugabe von Ca^{2+} (2 mM) zur mukosalen Lösung zeigte sich, daß der I_{sc} reversibel blockiert wird.
2. Die Bestimmung der Na-Flux-Rate mit und ohne Ca^{2+} in der mukosalen Lösung zeigte, daß die Höhe des Ca-sensitiven I_{sc} für den Anstieg des J_{net}^{Na} verantwortlich ist. Das unterstützt die Vermutung, daß der Entzug von Ca^{2+} aus der mukosalen Lösung die Aktivierung eines Ca-sensitiven Na-Transportes bewirkte. Mit steigenden Na-Konzentrationen, ohne Ca^{2+} in der mukosalen Lösung, nahm der I_{sc} zu, ohne ein Sättigungsverhalten zu zeigen.
3. Die calcium-sensitive Veränderung des I_{sc} wurde begleitet von einer entsprechenden Zu- bzw. Abnahme der G_t .
4. Die Fluxraten von Mannit als Marker für parazelluläre Durchlässigkeit wurden durch den Calciumgehalt in der mukosalen Lösung nicht beeinflußt.
5. Die vermutete calcium-sensitive Kationen-Leitfähigkeit in der luminalen Membran ist unspezifisch. Ein völliger Austausch von Na^+ durch Rb^+ , K^+ , Cs^+ oder Li^+ in der mukosalen Lösung induzierte in allen Fällen ein calcium-sensitiven I_{sc} :
 $Rb^+ > Na^+ \geq Cs^+ > K^+ > Li^+$
6. Der Ca-sensitive I_{sc} war durch mikromolare Ca-Konzentrationen in der mukosalen Lösung zu hemmen ($K_m = 0,28 \mu M$).
7. Weder mukosale Zugabe von Amilorid (1 - 100 μM) noch serosale Zugabe von Aldosteron (1 μM) beeinflußten den I_{sc} .
8. Theophyllin hemmte den I_{sc} unabhängig von der Anwesenheit von Ca^{2+} in der mukosalen Lösung.

Die Untersuchungsergebnisse unterstützen die Vermutung, daß der Entzug von zweiwertigen Kationen aus der mukosalen Lösung eine unspezifische Kationenleitfähigkeit aktiviert (NSCC), die in bemerkenswerter Weise dem NSCC in Epithelien anderer Gewebe im Verdauungskanal gleicht.

SUMMARY

In vitro studies of a calcium-sensitive electrogenic sodium transport in the sheep ruminal epithelium

A calcium-sensitive, electrogenic Na transport was studied in isolated preparations of sheep rumen epithelium with the Ussing chamber method.

1. Removal of divalent cations ($Ca^{2+} + Mg^{2+}$) from the mucosal solution enhances the I_{sc} considerably. This increase of I_{sc} is reversibly blocked by repeated addition of Ca^{2+} (2 mM) to the mucosal solution.
2. The determination of Na flux rates with and without Ca^{2+} in the mucosal solution revealed that the

Ca-sensitive I_{sc} accounts for increase of J_{net}^{Na} which supports the assumption that removal of Ca^{2+} from the mucosal solution causes an activation of a Ca-sensitive, electrogenic Na transport. In the absence of Ca^{2+} increasing Na concentrations enhanced I_{sc} without saturation.

3. The Ca-sensitive change of I_{sc} is accompanied by a corresponding alteration of G_i .
4. Removal of Ca^{2+} from the mucosal solution did not change fluxes of mannitol as a marker for paracellular permeability.
5. The putative, Ca-sensitive Na conductance in the luminal membrane is very unspecific. Total replacement of Sodium in the mucosal solution by Rb, K^+ , Cs^+ or Li^+ caused in all cases a Ca-sensitive current: $Rb^+ > Na^+ \geq Cs^+ > K^+ > Li^+$.
6. The Ca-sensitive I_{sc} is inhibited by micromolar Ca concentrations ($K_m = 0,28\mu M$).
7. Mucosal addition of amilorid (1 - 100 μM) did not change Ca-sensitive I_{sc} nor serosal addition of aldosterone (1 μM).
8. Theophylline decreases the I_{sc} in the presence and in the absence of mucosal divalent cations.

The obtained data support the assumption that removal of divalent cations from the mucosal solution activates a nonspecific cation conductance (NSCC) which remarkably resembles NSCC in other epithelia from the gastro-intestinal-tract.

7 LITERATURVERZEICHNIS

AELVOET, I.; D. ERLIJ und W. v. DRIESSCHE (1988):

Activation and blockage of a calcium-sensitive cation-selective pathway in the apical membrane of the toad urinary bladder.

J. Physiol. 398: 555-564

ALMERS, W.; E.W. McCLESKEY und P.T. PALADE (1988):

A non-selective cation conductance in frog muscle membrane blocked by micromolar external calcium ions.

J. Physiol. 398: 565-574

Armstrong, C. M. und D. R. Matteson (1986):

The role of calcium ions in the closing of K channels.

J. Gen. Physiol. 87: 817-832

ARMSTRONG, C.M. und J. LOPEZ-BARNEO (1987):

External calcium ions are required for potassium channel gating in squid neurons.

Science 236: 712-714

BEAUWENS, R.; R. S. FISCHER, u. J. CRABBE (1990):

Sodium transport by *tight* amphibian epithelia

in . R. K. H. KINNE (ed.): Basic Principles in Transport.

Comp. Physiol. Basel, Karger, S. 1-57

BENOS, D.J. (1982):

Amiloride: A molecular probe of sodium transport in tissues and cells.
Am. J. Physiol. 242: C131-145

Benos, D. J.; M. S. Awayda; I. I. Ismailov und J. P. Johnson (1995):

Structure and function of amiloride-sensitive Na⁺ channels.
J. Membr. Biol. 143: 1-18

BIBER, T.U. und M.L. SANDERS (1973):

Influence of transepithelial potential difference on the sodium uptake at the outer surface of the isolated frog skin.
J. Gen. Physiol. 61: 529-551

BINDSLEV, N. (1979):

Sodium transport in the hen lower intestine. Induction of sodium sites in the brush border by a low sodium diet.
J. Physiol. 288: 449-466

BLAUSTEIN, K. (1977):

Effects of internal and external cations and of ATP on sodium-calcium exchange in squid axon.
Biophysiol. J. 20: 79-111

CHASE, H.S.J. und Q. AL-AWQATI (1981):

Regulation of the sodium permeability of the luminal border of toad bladder by intracellular sodium and calcium.
J. Gen. Physiol. 77: 693-712

CHIEN, W. und C.E. STEVENS (1972):

Coupled active transport of Na und Cl across forestomach epithelium.
Am. J. Physiol. 223: 997-1003

CLAUSS, W. und E. SKADHAUGE (1988):

Modulation of Na and Cl transport by mineralocorticoids.
Comp. Biochem. Physiol. 90A: 583-589

CLAUSS, W.; J. DÜRR und G. RECHKEMMER (1985):

Characterization of conductive pathways in guinea pig distal colon in vitro.
Am. J. Physiol. 248: G176-183

CLAUSS, W.; B. HOFFMANN; H. SCHÄFER und H. HÖRNICKE (1989):

Ion transport and electrophysiology in rabbit cecum.
Am. J. Physiol. 256: G1090-1099

CRABBÉ, J. (1963):

Site of action of aldosterone on the bladder of the toad.
Nature 23: 787-788

COX, T. C. und R. H. ALVERANDO (1979):

Electrical and transport characteristics of skin of Larval *Rana catesbeiana*
Am. J. Physiol. 45: 625-641

Curran, P. F. und J. R. Gill, jr. (1962):

The effect of calcium on sodium transport by frog skin.
J. Gen. Physiol. 45: 625-641

DAS, S. und L.G. PALMER (1989):

Extracellular Ca^{2+} controls outward rectification by apical cation channels in toad urinary bladder: Patch-Clamp and whole-bladder studies.
J. Membr. Biol. 107: 157-168

DESMEDT, L.; J. SIMAELS und W. v. DRIESSCHE (1991):

Amiloride blockage of Na^{+} channels in amphibian epithelia does not require external Ca^{2+} .
Pflügers Arch. 419: 632-638

DOBSON, A. (1959):

Active transport through the epithelium of the reticulo-rumen sac.
J. Physiol. 146: 235-251

DRIESSCHE, W. v. (1987):

Ca^{2+} channels in the apical membrane of toad urinary bladder.
Pflügers Arch. 410: 243-249

DRIESSCHE, W. v. und B. LINDEMANN (1979):

Concentration dependence of currents through single-sodium selective pores in frog skin.
Nature 282: 519-520

DRIESSCHE, W. v. und W. ZEISKE (1985):

Ca^{2+} -sensitive, spontaneously fluctuating, cation channels in the apical membrane of the adult frog skin epithelium.
Pflügers Arch. 405: 250-259

DRIESSCHE, W. v. und D. ERLIJ (1994):

Cell swelling activates a poorly selective monovalent cation channel in the apical membrane of toad urinary bladder.
Pflügers Arch. 428: 1-8

DRIESSCHE, W. v; I. AELVOET und D. ERLIJ (1987):

Oxytocin and cAMP stimulate monovalent cation movements through a Ca^{2+} - sensitive, amiloride-insensitive channel in the apical membrane of toad urinary bladder.
Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 313-317

DRIESSCHE, W. v.; J. SIMAELS; I. AELVOET und D. ERLIJ (1988):

Cation-selective channels in amphibian epithelia: Electrophysiological properties and activation.
Comp. Biochem. Physiol. 90A: 693-699

DRIESSCHE, W. v; L. DESMEDT und J. SIMAELS (1991):

Blockade of Na⁺ current through poorly selective cation channels in the apical membrane of frog skin and toad urinary bladder.

Pflügers Arch. 418: 193-203

DRIESSCHE, W. v.; L. DESMEDT; P. DE SMET und J. SIMAELS (1993):

Poorly selective cation channels in apical membranes of epithelia

in: D. SIEMEN u. J. HESCHELER (eds): Nonselective cation channels: Pharmacology, Physiology and Biophysics.

Birkhäuser Verlag, Basel/CH

DRIESSCHE, W. v.; P. DE SMET und H. DE SMEDT (1994):

Poorly selective cation channels in the apical membrane of A6 cells.

Pflügers Arch. 426: 387-395

ERLIJ, D.; DRIESSCHE, W. v. und I. DE WOLF (1986):

Oxytocin stimulates the apical K⁺ conductance in frog skin.

Pflügers Arch. 407: 602-606, 1986.

ERLIJ, D.; A. I. KAUFMANN und L. GERSTEN (1992):

Urinary Ca²⁺ and the regulation of K⁺ secretion in toad bladder by neurophyseal hormones.

Pflügers Arch. 420: 23-28, 1992.

FERREIRA, H.G.; F.A. HARRISON und R.D. KEYNES (1964):

Studies with isolated rumen epithelium of the sheep.

J. Physiol. 175: 28P-30P

FERREIRA, H.G.; F.A. HARRISON und R.D. KEYNES (1966):

The potential and short-circuit across isolated rumen epithelium of the sheep.

J. Physiol. 187: 631-644

FERREIRA, H.G.; F.A. HARRISON; R.D. KEYNES und L. ZURICH (1972):

Ion transport across an isolated preparation of sheep rumen epithelium.

J. Physiol. 222: 77-93

FISCHER, H., DRIESSCHE, W. v., u. CLAUSS, W. (1989):

Evidence for apical sodium channels in frog lung epithelia cells.

Am. J. Physiol. 256: C764-771

FLEMMER, A.; A. DÖRGE; K. THURAU und F.-X. BECK (1993):

Transcellular sodium transport and basolateral rubidium uptake in the isolated perfused cortical collecting duct.

Pflügers Arch. 424: 250-254

FOSTER, E.S.; T.W. ZIMMERMANN; J.P. HAYSLETT und H.J. BINDER (1983):

Corticosteroid alteration of active electrolyte transport in rat distal colon.

Am. J. Physiol. 245:G668-675

FOSTER, E.S.; M.E. BUDINGER; J.P. HAYSLETT und H.J. BINDER (1986):

Ion transport in proximal colon of the rat. Sodium depletion stimulates neutral sodium chloride absorption.

J. Clin. Invest. 77: 228-235

FRAZIER, H.S.; E.F. DEMPSEY und D. A. LEAF (1962):

Movement of sodium across the mucosal surface of the isolated toad bladder and its modification by vasopressin.

J. Gen. Physiol. 45: 529-543

FRIZZELL, R.A. und S.G. SCHULTZ (1972):

Ionic conductances of extracellular shunt pathway in rabbit ileum. Influence of shunt on transmural sodium transport and electrical potential differences.

J. Gen. Physiol. 59: 318-346

FRIZZELL, R.A. und S.G. SCHULTZ (1978):

Effect of aldosterone on ion transport by rabbit colon, in vitro.

J. Membr. Biol. 39: 1 - 26

FRIZZELL, R.A.; H.J. KOCH und S.G. SCHULTZ (1976):

Ion transport by rabbit colon. I. Active and passive components.

J. Membr. Biol. 27: 297-316

FRÖMTER, E. und B. GEBLER (1977):

Electrical properties of amphibian urinary bladder epithelia:

III. The cell membrane resistances and the effect of amiloride.

Pflügers Arch. 371: 99-108

FUCHS, W.; E.H. LARSEN und B. LINDEMANN (1977):

Current-voltage curve of sodium channels and concentration dependence of sodium permeability in frog skin.

J. Physiol. 267: 137-166

Galiotta, L. J. V.; V. Barone; M. De Luca und G. Romeo (1991):

Characterization of chloride and cation channels in cultured human keratinocytes.

Pflügers Arch. 418: 18-25

GARTY, H. (1986):

Mechanisms of aldosterone action in tight epithelia.

J. Membr. Biol. 90: 193-205

GARTY, H. und D.J. BENOS (1988):

characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na channel.

Physiol. Rev. 68: 309-373

GARTY, H. und I.S. EDELMANN (1983):

Amiloride-sensitive trypsinization of apical sodium channels.

J. Gen. Physiol. 81: 785-803

GARTY, H. und L. G. PALMER (1997):

Epithelial sodium channels: Function, structure and regulation.
Physiol. Reviews. 77: 359-385

GÄBEL, G. (1988):

Natrium- und Chloridtransport im Pansen von Schafen: Mechanismen und ihre Beeinflussung durch intraruminale Fermentationsprodukte.
Hannover, Tierärztl. Hochschule, Habilitationsschrift

Gonzalez-Mariscal, L.; R. G. Contreras; J. J. Bolivar; A. Ponce; B. Chávez de Ramirez und M. Cerejido (1990):

Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells.
Am. J. Physiol. 259: C978-986

GRINSTEIN, S. und D. ERLIJ (1978):

Intracellular calcium and the regulation of sodium transport in the frog skin.
Proc. R. Soc. Lond. B. 202: 353-360

HAIGER, A (1982):

Biometrische Methoden in der Tierproduktion.
Österreichischer Agrarverlag, Wien

HALL, J. W.; W. MAJAK; A. L. VAN RYSWYK; R. E. HOWARTH und C.M. KALNIN (1988):

The relationship of rumen cations and soluble protein with predisposition of cattle to alfalfa bloat.
Can. J. Anim. Sci. 68: 431-437

HALM, D.R. und S.T. HALM (1994):

Aldosterone stimulates K^+ secretion prior to onset of Na^+ absorption in guinea pig distal colon.
Am. J. Physiol. 266: C552-558

HARRISON, F.A (1971):

Ion transport across rumen and omasum epithelium.
Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B262: 301-305

HARRISON, F.A.; R.D. KEYNES; J.C. RANKIN und L. ZURICH (1975):

The effect of quabain on ion transport across isolated sheep rumen epithelium.
J. Physiol. 249: 669-677

HEINZ, M.; R. KRATTENMACHER; B. HOFFMANN und W. CLAUSS (1991):

Different modes of electrogenic Na.
Physiol. Scand. 42: 298-308

KRATTENMACHER, R. und W. CLAUSS (1988):

Elektrophysiological analysis of sodium-transport in the colon of the frog *Rana esculenta*. Modulation of apical membrane properties by antidiuretic hormone.
Pflügers Arch. 411: 606-612

KRATTENMACHER, R., R. VOIGT und W. CLAUSS (1990):

Ca-sensitive sodium absorption in the colon of *Xenopus laevis*.

J. Comp. Physiol. 160: 161-165

KRATTENMACHER, R.; R. VOIGT; M. HEINZ und W. CLAUSS (1991):

Electrolyte transport through a cation-selective ion channel in large intestinal enterocytes of *Xenopus laevis*.

J. Exp. Biol. 155: 275-290

LANG, I (1997):

In-vitro-Untersuchungen zur Charakterisierung eines spannungsabhängigen Kationenkanals in der luminalen Membran des Pansenepithels beim Schaf. Berlin, Freie Universität, Vet. med Dissertation

LANG, I. u. H. MARTENS (1997):

Depolarization of the apical membrane enhances electrogenic Na transport through a PD-dependent cation conductance in the rumen epithelium of sheep.

Pflügers Arch. 433: R159

LEONHARD-MAREK, S. und H. MARTENS (1996):

Effects of potassium on magnesium transport across rumen epithelium.

Am. J. Physiol. 271: G1034-1038

LEONHARD, S.; E. SMITH; H. MARTENS; G. GÄbel und E. GANZONI (1990):

Transport of magnesium across an isolated preparation of sheep rumen: a comparison of MgCl₂, Mg aspartate, Mg pidolate, and Mg-EDTA.

Magnesium Trace Elem. 9: 265-271

LEVINE, S.D.; W.A. KACHADORIAN; D.N. LEVIN und D. SCHLONDORFF (1981):

Effects of trifluoperazine on function and structure of toad urinary bladder. Role of calmodulin in vasopressin-stimulation of water permeability.

J. Clin. Invest. 67: 662-672

LEVITAN, I.B (1985):

Phosphorylation of ion channels.

J. Membr. Biol. 87: 177-190

LEWIS, S.A. und C. CLAUSEN (1991):

Urinary proteases degrade epithelial sodium channels.

J. Membr. Biol. 122: 77-88.

LEWIS, S.A. und J. M. DIAMOND (1976):

Na⁺- transport by rabbit urinary bladder, a tight epithelium.

J. Membr. Biol. 28: 1-40

LEWIS, S.A. und N.K. WILLS (1983):

Apical membrane permeability and kinetic properties of the sodium pump in rabbit urinary bladder.

J. Physiol. 341: 169-184

LI, J.H.; L.G. PALMER und B. LINDEMANN (1982):

The role of sodium-channel density in the natriferic response of the toad urinary bladder to an

antidiuretic hormone.

J. Membr. Biol. 64: 77-89

LI, J.Q.; B. PROD'HOM und P. KUCERA (1994):

Cation channel by extracellular Ca^{2+} in the apical membrane of the chick embryonic ectoderm.

Pflügers Arch. 429: 183-192

LINDEMANN, B. und W. v. DRIESSCHE (1977):

Sodium specific channels of frog skin are pores: current fluctuations reveal high turnover.

Science 195: 292-294

LING, B.N. und D.C. EATON (1989):

Effects of luminal Na^+ on single Na channels in A6 cells, a regulatory role for protein kinase C.

Am. J. Physiol. 256: F1094-1103

MARTENS, H. und G. GÄBEL (1988):

Transport of Na^+ and Cl^- across the epithelium of ruminant forestomachs: Rumen and omasum. A review.

Comp. Biochem. Physiol. 90A: 569-575

MARTENS, H.; G. GÄBEL und H. STROZYK (1987):

The effect of potassium and the transmural potential difference on magnesium transport across an isolated preparation of sheep rumen epithelium.

Quartl. J. Exp. Physiol. 72: 181-188

MARTENS, H.; M. HENSELEIT und G. GÄBEL from the alimentary tract of sheep.

Brit. J. Nutr. 6, v.

POWELL, D.W. (1981):

Barrier function of epithelia.

Am. J. Physiol. 241: G275-288

SANDLE, G.I. (1989):

Segmental heterogeneity of basal and aldosterone-induced electrogenic Na transport in human colon.

Pflügers Arch., 414, 706-712

SANDLE, G.I. und F. McGLONE (1987):

Segmental variability of membrane conductances in rat and human colonic epithelia. Implications for Na, K and Cl transport.

Pflügers Arch. 410: 173-180

SCHARRER, E.; M. MEDL und H.G. LIEBICH (1983):

Changes in the structure and function of the rumen epithelium during development.

Zbl. Vet. Med. A30: 767-774

SCHEFFLER, A. (1984):

Charakterisierung der Wirkung von Pharmaka auf die elektrophysiologischen Parameter gastrointestinaler Epithelgewebe mit einer computergesteuerten Strom- und Spannungsklemmeinrichtung.

*Aachen, Med. Fak., TU,
Dissertation*

SCHULTHEISS, G. (1995):

Calcium-sensitive elektrogenic sodium transport of sheep omasum
Berlin, Freie Universität, Vet. med. Dissertation

SCHULTZ, S. G. (1986):

Cellular models of epithelial transport.
Physiol. of Membr. Disorders, Plenum publishing Corporation, S. 519-534

SELLIN, J.H. und M. FIELD (1981):

Physiologic and pharmacologic effects of glucocorticoids on ion transport across rabbit ileal mucosa in vitro.
J. Clin. Invest. 67: 770-778

SELLIN, J.H. und R. DE SOIGNIE (1987):

Ion transport in human colon in vitro.
Gastroenterology, 93: 441-448

SELLIN, J.H. und W.P. DUBINSKY (1994):

Apical nonspecific cation conductances in rabbit cecum.
Am. J. Physiol. 266: G475-484

SELLIN, J.H.; H. OYARZABAL und E.J. CRAGOE (1988):

Electrogenic sodium absorption in rabbit cecum in vitro.
J. Clin. Invest. 81: 1275-1283

SELLIN, J. H.; A. HALL; E. J. CRAGOE, jr. und W. P. DUBINSKY (1993):

Characterization of an apical sodium conductance in rabbit cecum.
Am. J. Physiol. 264: G13-21

SHIMIZU, T.; M. NAKAMURA; K. YOSHITOMI und M. IMAI (1993):

Effects of prostaglandine E2 on membrane voltage of the connecting tubule and cortical collecting duct from rabbits.
J. Physiol. 462: 275-289

SIEMEN, D. (1993):

Nonselective cation channels.
In: Nonselective cation channels:
Pharmacology, Physiology and Biophysics
in D. Siemen and J. K.-J. Hescheler (eds.):

Basel, Birkhäuser Verlag, p. 3-25.

SMITH, P.R. und D.J. BENOS (1991):

Epithelial Na⁺ channels.
Annu. Rev. Physiol. 53: 509-530

SPERBER, J. und S. HYDÉN (1952):

Transport of chloride through the ruminal mucosa.

Nature 169: 587

STEVENS, C.E. (1964):

Transport of sodium and chloride by the isolated rumen epithelium.

Am. J. Physiol. 206: 1099-1105

STEVENS, C.E. (1973):

Transport across rumen epithelium. In: H. H. Ussing (ed.): Transport mechanisms in epitheliae, Munksgaard, Copenhagen, 404-421

STROZYK, B. M. (1987):

Untersuchung über den Transport von Natrium durch das isolierte Pansenepithel von Schafen: Hinweis für einen Na^+/H^+ -Austausch in der luminalen Membran.

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Vet. med. Dissertation

TAYLOR, A. und E. EICH (1978):

Evidence for Na-Ca exchange in toad urinary bladder.

Abstract. Proc. Int. Congr. Nephrol., 7th, Montreal, p. C-8

THOMAS, S.R.; Y. SUZUKI; S.M. THOMPSON und S.G. SCHULTZ (1983):

Electrophysiology of Necturus urinary bladder.

I. "Instantaneous" current voltage relations in the presence of varying mucosal sodium concentrations.

J. Membr. Biol. 73: 157-175

THOMPSON, S.M. und J.H. SELLIN (1986):

Relationships among sodium current, permeability, and Na activities in control and glucocorticoid-stimulated rabbit descending colon.

J. Membr. Biol. 92: 121-134

THOMPSON, S.M.; Y. SUZUKI und S.G. SCHULTZ (1982):

The electrophysiology of rabbit descending colon: I. Instantaneous transepithelial current-voltage relations and the current-voltage relations of the Na-entry mechanism.

J. Membr. Biol. 66: 41-54

TURNHEIM, K. (1991):

Intrinsic regulation of apical sodium entry in epithelia.

Physiol. Rev. 71: 429-445

TURNHEIM, K. (1994):

Epithelial sodium transport: basic autoregulatory mechanisms.

Physiol. Rev. 43: 211-218

TURNHEIM, K.; R.A. FRIZZELL und S.G. SCHULTZ (1978):

Interaction between cell sodium and the amiloride-sensitive sodium entry step in rabbit colon.

J. Membr. Biol. 39: 233-256

TURNHEIM, K.; H. PLASS; M. GRASL; P. KRIVANEK und H. WIENER (1986):

Sodium absorption and potassium secretion in rabbit colon during sodium deficiency.
Am. J. Physiol. 250: F235-245

USSING, H.H. (1949):

The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies.
Acta Physiol. Scand. 17: 1-37

USSING, H. H. und K. ZEHRAN (1951):

Active transport of sodium as the source of electric current in short-circuited isolated frog skin.
Acta Phys. Scand. 23: 110-127

VOGLER, S. (1991):

Natrium- und Chlorid-Transport über das isolierte Netzmagenepithel von Schafen.
Berlin, Freie Universität, Vet. med.
Dissertation

VOÚTE, c. L.; R. DIRIX; r. nielsen und h. h. ussing (1969):

The effect of aldosterone on the isolated frog skin epithelium (*rana temporaria*)
Exp. Cell Res. 57: 448-449

WEBER, W.; M. U. BLANK und W. CLAUSS (1995):

Regulation of electrogenic Na⁺ transport across leech skin.
Am. J. Physiol. 268: R605-R613

WOLFFRAM, S., R. FRISCHKNECHT und E. SCHARRER (1989):

Influence of theophyllin on the electrical potential difference and ion fluxes (Na, Cl, K) across the isolated rumen epithelium of sheep.
J. Vet. Med. A36: 755-762

8 ANHANG

Pufferzusammensetzungen (Angaben in [mM])

Transportpuffer: wurde nur für den Transport eingesetzt

Substanz	[mM]
NaCl	75
KCl	5
NaHCO ₃	25
Na ₂ HPO ₄	1
NaH ₂ PO ₄	2

Glucose	10
CaCl ₂	1
MgCl ₂	2
Na - D - Gluconat	33

Grundpuffer: Grundlage der meisten Puffervarianten, wurde für alle Versuchsvorläufe und als Kontrolle verwendet

Substanz	[mM]
NaCl	115
K ₂ HPO ₄	2
KH ₂ PO ₄	1
Glucose	10
Hepes (N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N-2-Ethansulfonsäure)	8
Trisma OH	10
Mannit	54

Stammlösungen: Calcium-Stammlösung für alle Versuche, Magnesium-, Barium- und Strontium-Stammlösungen für 4.1.3

Substanz	Lösungsmittel	Zugabevolumen [µl]	Konzentration am Gewebe [mM]
CaCl	Aqua bidest	100	2
MgCl	Aqua bidest	100	2
BaCl	Aqua bidest	100	2
SrCl	Aqua bidest	100	2

Grundpuffervarianten:

Für verschiedenen Na-Konzentration: Einsatz von N-Methyl-D-Glucamin (NMDG)

Substanz	[mM]
NaCl	0 15 30 55 85 115
NMDG	115 100 85 60 30 0
jeweils wie Grundpuffer	

Transport anderer monovalenter Kationen:

Substanz	[mM]
Cholin KCl RbCl CsCl NH ₄ Cl LiCl	115
jeweils wie Grundpuffer	

Konzentrationsabhängigkeit des Calciumeffektes:

Substanz	[mM]
NaCl	115
KCl	5
Glucose	10
Hepes	8
Trisma-OH	10
Mannit	54

Wirkstoffkonzentrationen:

Substanz	Lösungsmittel	Zugabevolumen [µl]	Konzentration am Gewebe [mM]
Amilorid	DMSO	20	0,001
Amilorid	DMSO	20	0,01
Amilorid	DMSO	20	0,1
Aldosteron	DMSO	20	0,001

DANKSAGUNGEN

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. H. Martens für die Überlassung des Themas. Im Besonderen möchte ich mich bedanken für die außergewöhnlich gute Betreuung in allen praktischen, theoretischen und sonstigen Fragen.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. G. Gäbel, Frau Dr. S. Leonhard-Marek, Herrn Dr. G. Schultheiß und Frau Dr. S. Vogler für die praktische Unterstützung und die fachliche Diskussion.

Darüber hinaus gilt mein Dank Frau B. Biedenkapp, Frau M. Ganz und Frau K. Wolf für die technische und praktische Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Bedanken möchte ich mich bei Frau D. Plaumann für die Korrekturhilfen bei der Erstellung der schriftlichen Arbeit, bei Herrn Dr. E. Mohr für die Hilfe am Computer und bei Frau Ochsmann für Ihre Unterstützung in der Statistik.

Danke an alle übrigen Mitarbeitern der Veterinärphysiologie, für das angenehme Arbeitsklima, die Offenheit für alle Fragen und ihrer Bereitschaft, bei jeder Art von Schwierigkeiten zu helfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten, Freund und Mann Herrn Uwe Hitschke, meinem Sohn Max Hitschke und meinen Eltern. Ohne ihr Verständnis, ihre Hilfe und die moralische Unterstützung

wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Dissertation zu erstellen.