

IV. Ergebnisse

4.1 Vorversuche

Der aufgrund der Literaturergebnisse vorgeschlagene Anionenaustauscher ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) in der apikalen und basolateralen Membran des Psalterepithels (TILING, 1997) wurde den eigenen Versuchen als Arbeitshypothese zugrunde gelegt. Der Nachweis der in Serie geschalteten Anionenaustauscher sollte durch die direkte Bestimmung des HCO_3^- -Transportes mit Hilfe der pH-Stat-Methode erbracht werden (Versuchsaufbau siehe „**Material und Methoden**“). Da diese Methode neu etabliert werden musste, wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt, die der Optimierung der Versuchsbedingungen dienten.

Die in Serie geschalteten Anionenaustauscher ermöglichen einen Ionentransport nur mit Hilfe von Konzentrationsgradienten. Aus diesem Grund wurden in den Hauptversuchen hohe Gradienten gewählt, um den Nachweis des HCO_3^- -Transportes zu erleichtern. Bei den Vorversuchen hingegen, die allein der Versuchsetablierung dienten, wurde serosal eine Cl^- -Konzentration von $154,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ und mukosal von $124,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ vorgegeben. Der Cl^- -Konzentrationsgradient war also deutlich kleiner als unter physiologischen *in vivo*-Bedingungen (serosal $100 - 110 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, luminal $10 - 20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Die **Abb. 4** gibt die erhaltenen Ergebnisse unter diesen Versuchsbedingungen wieder. Es ist erkennbar, dass die Transportraten von HCO_3^- von der serosalen zur mukosalen Seite große Schwankungen aufweisen, die primär durch die Unterschiede zwischen den Tieren bedingt sind, aber auch zwischen den Epithelien eines Tieres beobachtet werden. Daraus ergibt sich als versuchstechnische Konsequenz, dass geplante Manipulationen der HCO_3^- -Transportraten nach Möglichkeit am gleichen Epithel, also sequentiell, durchgeführt werden. Dieser experimentelle Ansatz wird ermöglicht durch die relativ konstanten Transportraten in Abhängigkeit von der Zeit (siehe **Abb. 4**). Man kann von praktisch gleichen Transportraten nach der 2. Fluxperiode ausgehen.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Zeitachse der Versuche wie in den Vorversuchen beibehalten und grundsätzlich ein sequentielles Vorgehen gewählt, d. h. die jeweiligen Epithelien wurden zunächst als Kontrolle genutzt und dann entsprechend dem vorgesehenen Versuchsprotokoll die gewünschten Veränderungen vorgenommen.

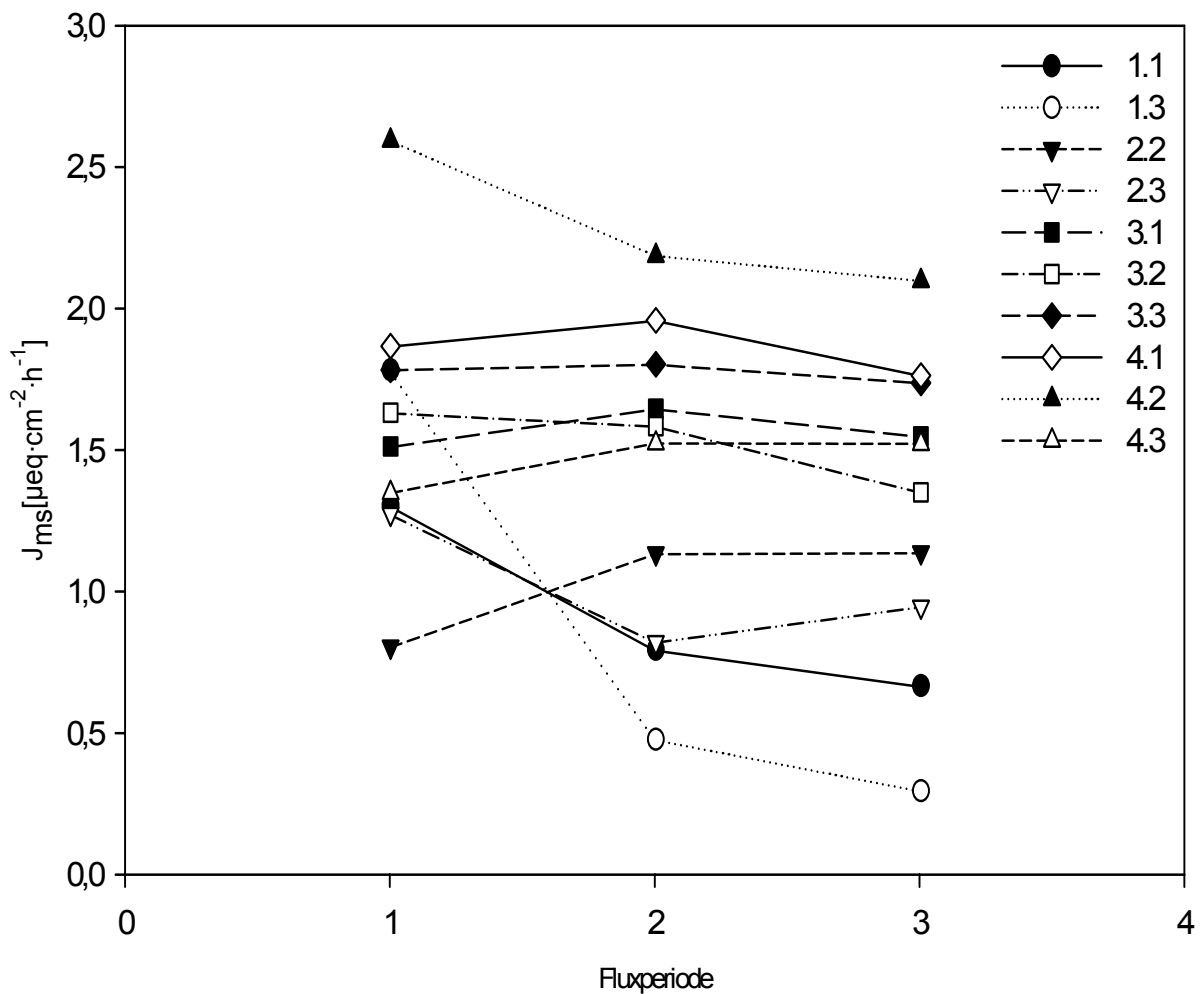


Abb. 4: Zeitverlauf der unidirektionalen Bicarbonatfluxe zu den Zeitpunkten 1, 2 und 3 (N = 4, n = 10); Inkubationslösungen siehe Anhang 8.1.1, Tab. 1 und 2

4.2 Effekte unterschiedlicher Anionengradienten

Da Konzentrationsgradienten zu Diffusionsvorgängen führen, wurde im Nachfolgenden die Abhängigkeit der HCO_3^- - Fluxrate von der Gewebeleitfähigkeit untersucht, um zu überprüfen, ob und in welchem Maße HCO_3^- auch parazellulär transportiert wird.

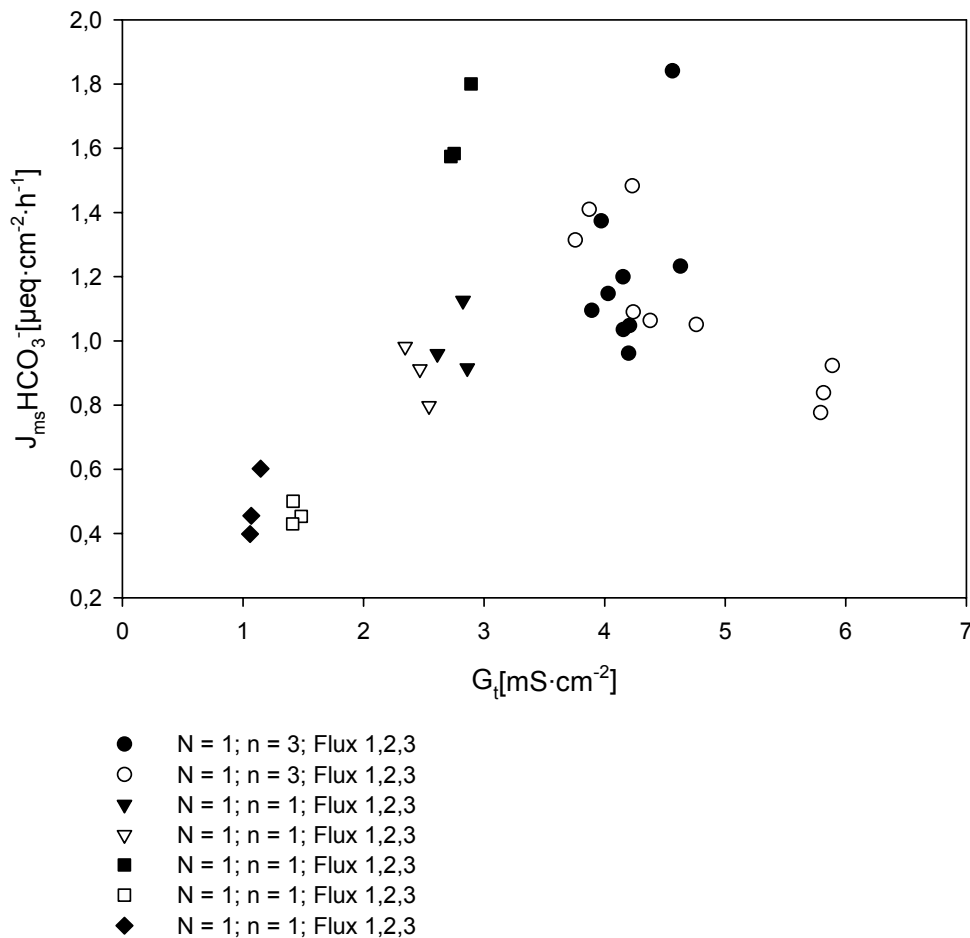


Abb. 5: Grafische Darstellung der Abhängigkeit des HCO_3^- - Transportes ($J_{\text{ms}}\text{HCO}_3^-$ [$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$]) von der Gewebeleitfähigkeit (G_t [$\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$]); (N = 7, n = 11 ; Fluxperioden 1, 2 und 3; Mittelwert der einzelnen Fluxperioden)

Die aus der **Abbildung 5** hervorgehende fehlende Beziehung der HCO_3^- -Fluxe zur Gewebeleitfähigkeit legt die Vermutung nahe, dass die Passage von HCO_3^- trotz der

geringen Größe der Transportraten überwiegend transzellulär erfolgt und die passive parazelluläre Passage kaum eine Bedeutung hat.

4.2.1 Mukosale Variation von HCO_3^- : 25 und 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

Der in den Vorversuchen erprobte Versuchsansatz wurde auch in dieser Serie beibehalten. Mukosal wurden 25 oder 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCO_3^- eingesetzt und die serosale Cl^- - Konzentration von 154,8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ konstant gehalten. Der mittlere HCO_3^- - Transport in den Fluxperioden 2 und 3 bei einem HCO_3^- - Gradienten von 25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ lag bei $1,11 \pm 0,08 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Die Erhöhung des Gradienten auf 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ verursachte eine Zunahme des HCO_3^- -Transportes auf $1,47 \pm 0,39 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, die jedoch nicht direkt proportional der Zunahme der HCO_3^- Konzentration ausfiel. (siehe **Tab. 1**)

Tab 1: Einfluss der mukosalen Variation auf $J_{\text{msHCO}_3^-}$ (25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCO_3^- : N = 2, n = 6; 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCO_3^- : N = 2, n = 5; Mittelwerte der Fluxperioden \pm SEM), Heufütterung; Inkubationslösung 8.1.2, Tab. 3-5

Bicarbonat ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Fluxperiode	$J_{\text{msHCO}_3^-}$ ($\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	n
25	1	$1,26 \pm 0,14$	6
	2 ¹	$1,11 \pm 0,08$	
50	1	$1,90 \pm 0,47$	5
	2 ¹	$1,47 \pm 0,39$	

¹ = in Fluxperiode 2 wurden die Mittelwerte der zweiten (120-148min) und dritten (152-180min) Messperiode der einzelnen Epithelien zusammengefasst. Sie beinhaltet also doppelt so viele Werte wie Fluxperiode 1

Der Unterschied zwischen den Gruppen 25 und 50 mmol·l⁻¹ stellt sich als nicht signifikant dar ($p > 0,05$). Einzig über den zeitlichen Verlauf der Epithelien lässt sich eine systematische Veränderung ($p < 0,05$) erkennen (siehe auch Varianzanalyse im Anhang 8.2).

4.2.2 Einfluss von Chlorid auf den Bicarbonattransport

Die von TILING (1997) durchgeführten Versuche zielten auf den Nachweis von Anionenaustauschern an der apikalen und basolateralen Membran am Psalterepithel von Schafen. Da bei Ergebnissen durch *in vivo* -Versuche eine Cl⁻ - Sekretion beobachtet wurde, die vermutlich im Austausch mit Bicarbonat erfolgt, wurde von TILING *in vitro* gezielt die Abhängigkeit dieser beiden Ionen voneinander untersucht.

Der Entzug von HCO₃⁻ aus der Inkubationslösung führte zu dem Ergebnis, dass

- a) Bicarbonat keinen Einfluss auf die hohen unidirektionalen Chloridfluxe hat und
- b) Chlorid weitgehend elektroneutral und transzellulär transportiert wird.

Zudem bekräftigte der Befund, wonach nur Bicarbonat (Gradient) unter der Gruppe der eingesetzten Anionen einen stimulierenden Effekt auf den Chloridtransport erzielen konnte (dies besonders deutlich bei mukosalem HCO₃⁻ - Einsatz) die Hypothese von Cl⁻/HCO₃⁻ - Austauschern in der apikalen und basolateralen Membran.

Diese Beobachtung sollte in den vorliegenden Versuchen durch eine Charakterisierung des Transportes von Bicarbonat mit Hilfe von Variationen der Chloridkonzentration in der serosalen Inkubationslösung ergänzend zu den Untersuchungen von TILING (1997) verifiziert werden. In diesen Versuchen wird - wie *in vivo* immer vorhanden - ein Bicarbonatgradient von mukosal nach serosal vorgegeben.

4.2.2.1 Einfluss von Chloridreduktion

4.2.2.1.1 Chloridreduktion 1: 25 mmol·l⁻¹ Chlorid serosal

Der Versuchsansatz entspricht vom Prinzip her dem der Vorversuchsreihe. Der Ansatz des mukosalen Puffers erfolgte mit 25 mmol·l⁻¹ HCO₃⁻ und diesmal nur mit 25 mmol·l⁻¹ Chlorid. Die Versuche wurden bei einer serosalen Chloridkonzentration von 154,8 mmol·l⁻¹ gestartet und nach 90 Minuten durch eine Inkubationslösung mit 25 mmol·l⁻¹ Chlorid ersetzt, so dass der große Chloridgradient (mukosal < serosal) nur zur ersten Fluxperiode bestand und in Fluxperiode 2 und 3 die Chloridkonzentration auf beiden Epithelseiten ausgeglichen war (mukosal = serosal).

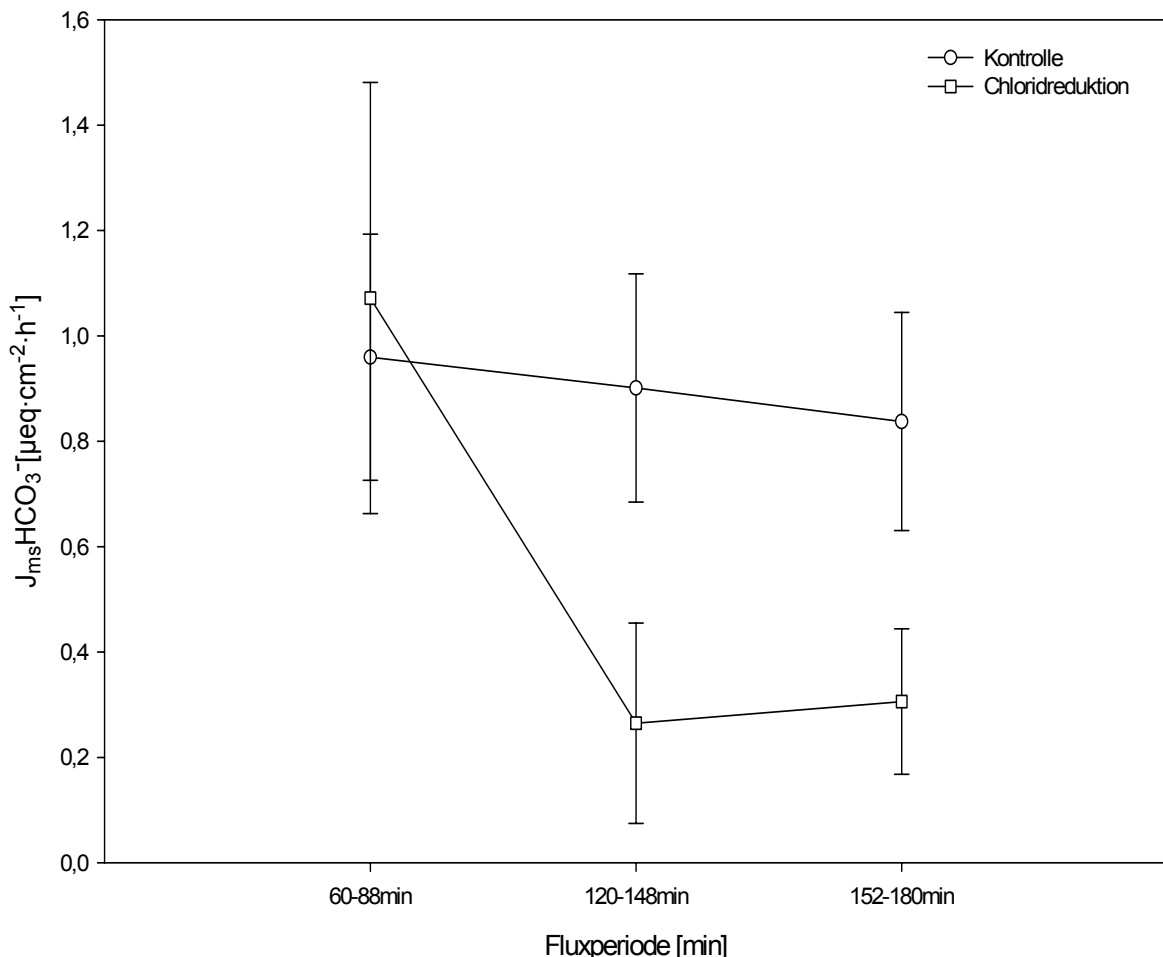


Abb. 6: Darstellung der HCO₃⁻ - Transportraten in µeq·cm⁻²·h⁻¹ der drei Fluxperioden der Kontrollgruppe im Vergleich mit der auf 25mmol·l⁻¹ Chlorid reduzierten Gruppe der zweiten und dritten Fluxperiode; (Mittelwert ± SEM; N = 5, n = 5), Heufütterung; Inkubationslösung Kap. 8.2.1, Tab. 3, 5 und 6

Die Epithelien der Kontrollgruppe bei denen kein Pufferwechsel stattfand und bei denen die serosale Konzentration von Chlorid in allen Fluxperioden bei $154,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ lag, transportierten im Mittel zwischen $0,96 \pm 0,23$ (Flux 1) und $0,84 \pm 0,21$ (Flux 3) $\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ (Mittelwert \pm SEM). Der Verlauf der Bicarbonattransportraten ist in **Abb. 6** grafisch dargestellt.

Es ist erkennbar, dass die Reduktion der serosalen Cl^- - Konzentration von $154,8$ auf $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ den HCO_3^- - Transport von $1,07 \pm 0,41$ auf $0,26 \pm 0,19 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ der 2. Fluxperiode (oder um $0,81\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) reduziert. Dieser reduzierte HCO_3^- - Transport wurde auch in der 3. Fluxperiode beobachtet ($0,31 \pm 0,14 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$).

Die beschriebenen Veränderungen der Fluxe durch die unterschiedliche Behandlung (Chloridreduktion) sind signifikant ($p < 0,05$). (siehe Varianzanalyse im Anhang 8.2)

Tab. 2: Vergleich der Behandlungen bei mukosal $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ und $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid; (Mittelwerte \pm SEM, N = 5, n = 5); Heufütterung; Zusammensetzung der Inkubationslösung siehe Anhang 8.1.2 Tab. 3,5,6)

Behandlung serosal	Fluxperiode 1 $J_{\text{msHCO}_3^-}$ [$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$] 60-88min	Fluxperiode 2 $J_{\text{msHCO}_3^-}$ [$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$] 120-148min	Fluxperiode 3 $J_{\text{msHCO}_3^-}$ [$\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$] 152-180min	n
Kontrolle $154,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$	$0,96 \pm 0,23$	$0,90 \pm 0,22$	$0,84 \pm 0,21$	5
$154,8 /$ $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$	$1,07 \pm 0,41^*$	$0,26 \pm 0,19^{**}$	$0,31 \pm 0,14^{**}$	5

* $154,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid

** $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid

Aufgrund der deutlichen Veränderungen der HCO_3^- - Transportraten nach der Reduzierung des unphysiologischen Chloridgradienten fand in der folgenden Versuchsreihe eine Wiederholung des Versuchsansatzes statt, wobei Zielsetzung war, die *in vivo* -Verhältnisse zu simulieren.

4.2.2.1.2 Chloridreduktion 2: 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid serosal

Für den mukosalen Puffer erfolgte eine Verdopplung der HCO_3^- - Konzentration auf 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCO_3^- (zuvor 25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), um dessen Gradienten (mukosal > serosal) weiter zu erhöhen. Serosal wurde die Konzentration von 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid zu Beginn der Versuche nach 90 min auf 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ gesenkt. Dies bewirkte eine Umkehr des Chloridgradienten von mukosal > serosal während zweiter und dritter Fluxperiode.

Auch unter (in Bezug auf die serosale Chloridkonzentration) simulierten *in vivo* - Bedingungen fällt die Fluxrate von HCO_3^- nach dem Pufferwechsel deutlich ab, während unter Kontrollbedingungen der Transport von HCO_3^- relativ konstant bleibt.

(Darstellung der HCO_3^- - Transportraten siehe **Tab. 3**)

Tab. 3: Vergleich der Behandlungen bei mukosal 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCO_3^- und 25 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid; (Mittelwerte \pm SEM, Kontrolle: N = 4, n = 4; Behandlung1: N = 4, n = 8); Heufütterung; Zusammensetzung der Inkubationslösungen siehe im Anhang 8.1.2, Tab. 7 - 9

Behandlung serosal bei 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCO_3^- mukosal	Fluxperiode 1 60-88min	Fluxperiode 2 120-148min	Fluxperiode 3 152-180min	n
Kontrolle 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Cl^-	2,34 \pm 0,33	2,03 \pm 0,41	1,89 \pm 0,40	4
Behandlung 1 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Cl^-	2,47 \pm 0,33*	0,84 \pm 0,24**	0,75 \pm 0,23**	8

* 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid

** 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid

Die Epithelien der Kontrollgruppe mit einer serosalen Chloridkonzentration von 100 mmol·l⁻¹ in allen drei Fluxperioden transportierten im Mittel zwischen 2,34 ± 0,33 (Flux 1) und 1,89 ± 0,40 (Flux 3) μeq·cm⁻²·h⁻¹ HCO₃⁻ .

Demgegenüber bewirkte die Reduktion von Chlorid von 100 auf 10 mmol·l⁻¹ eine deutliche Senkung des HCO₃⁻ - Transportes von 2,47 ± 0,33 (Flux 1) auf 0,84 ± 0,24 (Flux 2) μeq·cm⁻²·h⁻¹.

Auch in Fluxperiode 3 (siehe **Tab. 3**) konnte diese verringerte Transportrate von HCO₃⁻ beobachtet werden (0,75 ± 0,23 μeq·cm⁻²·h⁻¹).

Die statistische Auswertung wurde für beide Versuchsgruppen getrennt durchgeführt. In beiden Gruppen war der erzielte Effekt (konstante Transportraten bei der Kontrolle und reduzierte Transportraten nach Behandlung) signifikant (p < 0,05; siehe auch Anhang Varianzanalyse unter **8.2**). Unterschiede zwischen den Versuchsbedingungen, dass heißt zwischen Behandlung und Kontrolle, sind zudem in ihrer Dimension als sehr deutlich anzusehen.

Des Weiteren wurde exemplarisch der Einfluss der Verringerung der Chloridkonzentration auf den Kurzschlussstrom (I_{sc}) untersucht.

Der gewählte Versuchsansatz unter Kontrollbedingungen sieht immer Gradienten für Anionen vor: Bicarbonat: mukosal > serosal; Chlorid : serosal > mukosal. Diese Gradienten beeinflussen durch Diffusion den Kurzschlussstrom in nicht bekannter Weise. Eine Änderung dieser Gradienten (serosaler Ersatz von Cl⁻ durch Glukonat) nach der ersten Fluxperiode muss zu Veränderungen des I_{sc} führen.

Dieser Effekt zeigt sich im Vergleich der Kontrollgruppe mit der Gruppe der Epithelien, die einer Behandlung durch Reduktion der serosalen Chloridkonzentration unterzogen wurden (siehe **Abb. 7**).

So sank der Kurzschlussstrom der Behandlungsgruppe von anfänglich 1,60 ± 0,10 zur ersten Fluxperiode auf 0,43 ± 0,13 μeq·cm⁻²·h⁻¹ (Flux 2) beziehungsweise 0,28 ± 0,12 μeq·cm⁻²·h⁻¹ (Flux 3), während sich der I_{sc} der Kontrollepithelien nur geringfügig von 1,57 ± 0,28 (Flux 1) auf 1,38 ± 0,20 μeq·cm⁻²·h⁻¹ (Flux 3) verringerte.

Wiederum erfolgte die statistische Auswertung getrennt für Kontrolle und Behandlung. In der Behandlungsgruppe hat sich der Kurzschlussstrom signifikant verringert (siehe Varianzanalyse Anhang unter **8.2**).

Es ist anzumerken, dass die Pufferlösungen auch zu Beginn des Versuches auf beiden Seiten des Epithels nicht identische Ionenkonzentrationen aufwiesen und

somit modifizierte Ussingkammerbedingungen vorherrschten. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Aussage der beschriebenen Beobachtungen.

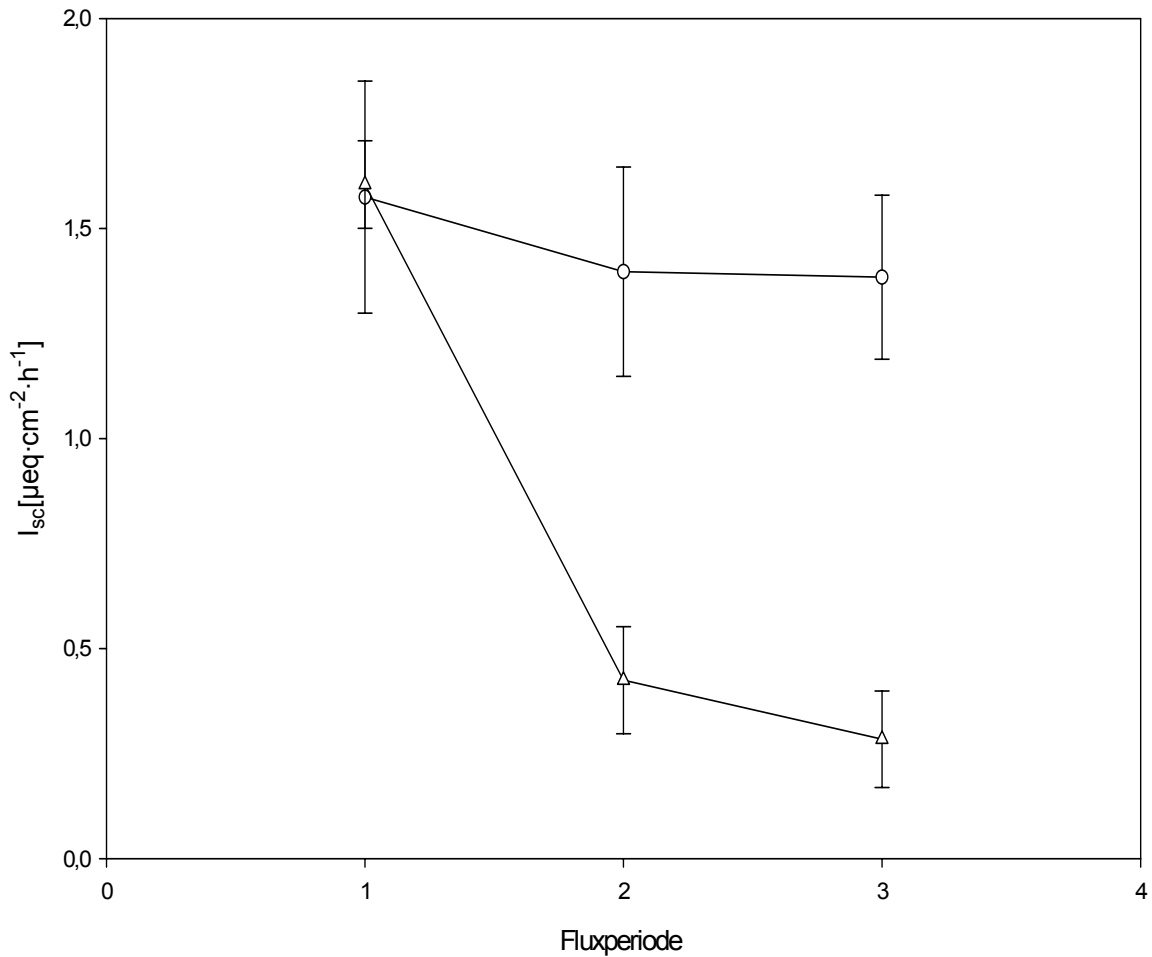


Abb. 7: Darstellung des Kurzschlussstroms (I_{sc}) in $\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ der drei Fluxperioden der Kontrollgruppe (O) im Vergleich mit der auf $10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid reduzierten Gruppe (Δ) der zweiten und dritten Fluxperiode; (Mittelwert \pm SEM; Kontrolle N = 4, n = 4; Behandlung N = 4, n = 8); Heufütterung

4.3 Hemmstoffe

Durch den gezielten Einsatz von Hemmstoffen ist es möglich, aufgrund der ihnen eigenen spezifischen Wirkung Rückschlüsse auf das Vorhandensein/Fehlen bestimmter Transportmechanismen zu ziehen.

4.3.1 DIDS (4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure)

DIDS (4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure) ist ein spezifischer Hemmstoff für Anionenaustauscher, der seine Hemmwirkung über eine kompetitive Verdrängung von Chlorid entfaltet.

Der Hemmstoff DIDS kam nur serosal zum Einsatz. Da die Konzentration von Chlorid auf dieser Seite des Epithels mit $154,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ sehr hoch angesetzt ist und dies zu einer verminderten Wirkung von DIDS führen würde, erfolgte auch die Zugabe des Hemmstoffes mit $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ebenfalls in hoher Dosis.

Der mukosale Puffer entspricht mit $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ und $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid wiederum dem der Versuchsreihe aus Kapitel **4.2.2.1.1**. Die Versuche wurden bei einer serosalen Chloridkonzentration von $154,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ gestartet und nach Ablauf von 90 min mit einem Zusatz von $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DIDS versehen.

Wie bei allen Versuchen üblich, wurde die erste halbe Stunde nach Hemmstoffgabe nicht in die Wertung einbezogen, sondern diente allein der Anpassung des Psalterepithels an die veränderten Bedingungen.

In der **Abb. 8** sind die unidirektionalen Transportraten der drei Fluxperioden (x – Achse) dargestellt. Neben der mit DIDS behandelten Gruppe werden zum Vergleich auch die Kontrollgruppe sowie die Epithelien, die einer Behandlung durch Chloridreduktion auf $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ unterzogen wurden, abgebildet (siehe auch **Abb. 6**). Wie ersichtlich reduziert sich die Fluxrate von HCO_3^- von $1,00 \pm 0,34$ (Flux 1) trotz der sehr hohen Chloridkonzentration auf $0,62 \pm 0,30$ (Flux 2) beziehungsweise $0,52 \pm 0,21$ (Flux 3) $\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Dies ist deshalb von Bedeutung, da der Einsatz des Hemmstoffes bei niedrigerer Konzentration von Cl^- einen deutlicheren Abfall der HCO_3^- -Fluxrate vermuten lässt.

Der beobachtete Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung mit DIDS ist im Sinne der Varianzanalyse statistisch nicht abgesichert ($p = 0,053$). Ein systematischer Effekt zeigt sich nur bezüglich des Faktors Zeit (fallende HCO_3^- -Transportraten; siehe Varianzanalyse im Anhang **8.2**).

Es ist interessant festzustellen, dass der Effekt von DIDS nur geringfügig schwächer ausfällt als die serosale Reduktion von Cl^- .

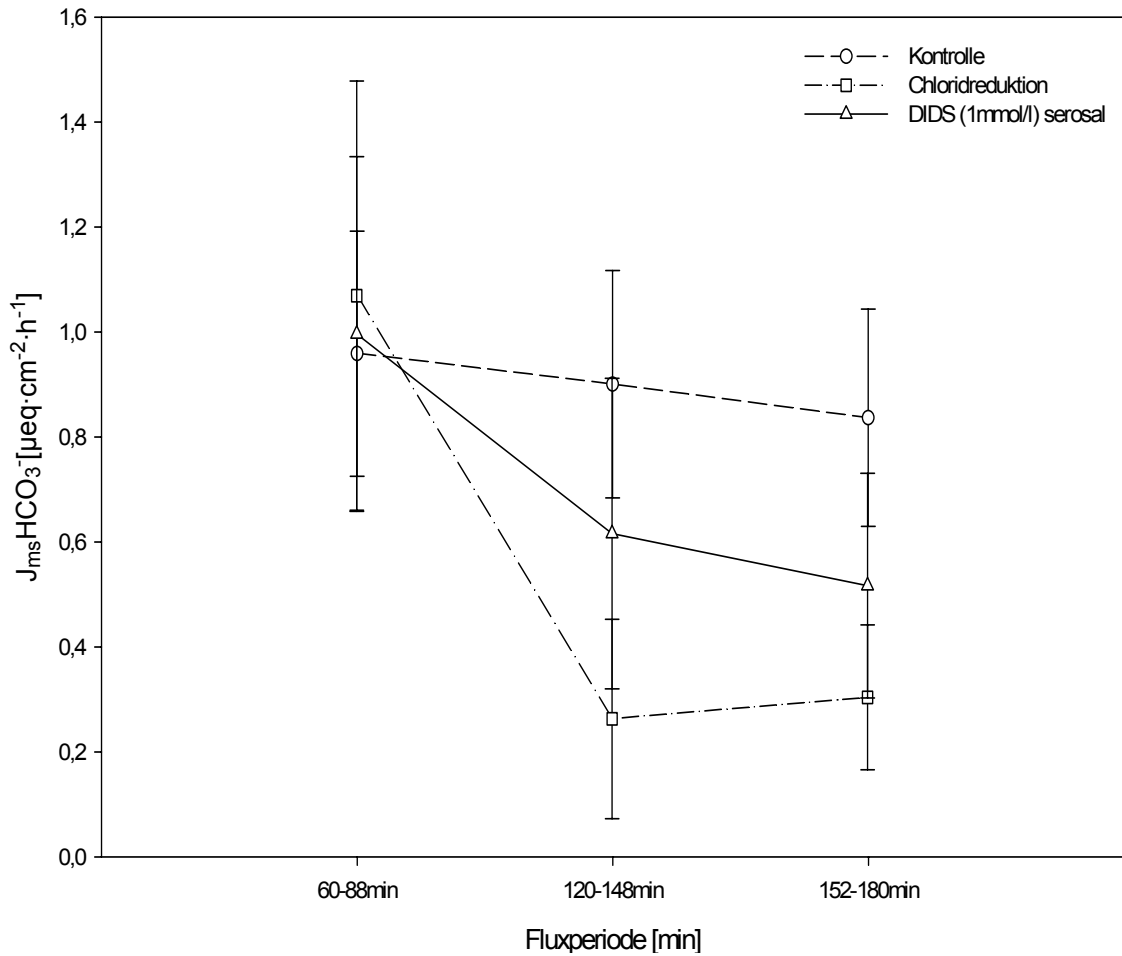


Abb. 8: Darstellung der HCO_3^- - Transportraten in $\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ der drei Fluxperioden der Kontrollgruppe im Vergleich mit Behandlung 1 aus Abb. 3 ($25\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid Flux 2 und 3) und Behandlung 2 ($1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DIDS Flux 2 und 3); Kontrolle und Behandlung 1 N = 5, n = 5 ; Behandlung 2 N = 4, n = 4; (Mittelwert \pm SEM); Heufütterung; Inkubationslösung siehe Anhang 8.1.2, Tab. 3, 5 und 6

4.3.2 Bumetanid

Der Hemmstoff des $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ - Cotransporters Bumetanid gehört zur Gruppe der Schleifendiuretika und wurde in einer Konzentration von $0,1\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ auf der serosalen Seite des Epithels zugegeben.

Die Zusammensetzung der Pufferlösungen erfolgte in der selben Weise wie zuvor in Kapitel 4.2.2.1.2 beschrieben, das heißt $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ und $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid mukosal sowie $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid serosal. Es wurden in dieser Versuchsreihe zwei Behandlungsgruppen gebildet: a) Behandlung 1 mit serosaler Konzentration von $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid in allen drei Fluxperioden. Bei diesen Epithelien kam nur bei Flux 3 Bumetanid als Hemmstoff in einer Konzentration von $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zum Einsatz, und b) Behandlung 2 mit serosaler Chloridkonzentration von $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zur ersten, $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zur zweiten und $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ zur dritten Fluxperiode. Wiederum erfolgte der Zusatz von $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Bumetanid bei Flux 3.

Die HCO_3^- - Transportraten der Behandlungsgruppe 1 halbieren sich nach Zugabe von Bumetanid ($1,69 \pm 0,33$ Flux 1 bzw. $1,60 \pm 0,37$ Flux 2) auf $0,79 \pm 0,26$ (Flux 3) $\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.

Der wesentliche Effekt der Behandlungsgruppe 2 wird demgegenüber aufgrund der Reduktion der serosalen Konzentration von Chlorid zur zweiten Fluxperiode erzielt, nämlich von $1,54 \pm 0,22$ (Flux 1) auf $0,32 \pm 0,10$ (Flux 2) $\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Der Effekt von Bumetanid auf den HCO_3^- - Transport bei $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid (Flux 3) fällt dagegen sehr gering aus ($0,12 \pm 0,05 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$; siehe **Tab. 4**).

Tab. 4: Vergleich der Behandlungen bei mukosal $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ und $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid; (Mittelwerte \pm SEM, Behandlung 1: N = 4, n = 4; Behandlung 2: N = 4, n = 8); Heufütterung; Zusammensetzung der Inkubationslösung siehe Anhang 8.1.2, Tab. 7 - 9

Behandlung serosal bei $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HCO}_3^-$ mukosal	Fluxperiode 1 60-88min	Fluxperiode 2 120-148min	Fluxperiode 3 152-180min	n
Behandlung 1 $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$ und Bumetanid	$1,69 \pm 0,33$	$1,60 \pm 0,37$	$0,79 \pm 0,26^2$	4
Behandlung 2 $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cl}^-$ und Bumetanid	$1,54 \pm 0,22$	$0,32 \pm 0,10^1$	$0,12 \pm 0,05^3$	8

¹ = $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid

² = $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid und $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Bumetanid

³ = $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid und $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Bumetanid

Die Varianzanalyse, die für beide Behandlungsgruppen getrennt durchgeführt wurde, ergab bei beiden Gruppen einen systematischen Effekt der Bicarbonatfluxe in Abhängigkeit zur Zeit ($p = 0,01$). Die Effekte durch Bumetanid bei Behandlung 1 sowie Chloridreduktion bei Behandlung 2 sind signifikant. (siehe Varianzanalyse Anhang **8.2**)

4.4 Mannit

Mannit, ein Zuckeralkohol (Alditol), bewirkt über eine Anhebung des osmotischen Druckes in der mukosalen Pufferlösung eine Erhöhung der Leitfähigkeit (G_t) und damit einhergehend auch eine Steigerung der parazellulären Permeabilität des Gewebes (MARTENS et al., 2001). Wenn eine physiologisch bedeutende parazelluläre Permeabilität für HCO_3^- vorliegt, müsste durch Zugabe von Mannit der Transport von HCO_3^- erhöht werden.

Die Versuche wurden mit $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCO_3^- und $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid mukosal sowie $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Chlorid serosal bei $300 \text{ mosmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (beidseitig) gestartet (Flux 1). Anschließend erfolgte serosal der Entzug von Chlorid (Flux 2) und schließlich mukosal die Erhöhung der Osmolarität auf $450 \text{ mosmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Flux 3).

Das Ergebnis ist der **Abb. 9** zu entnehmen. So sinkt die HCO_3^- - Transportrate bei konstanter Leitfähigkeit ($1,79 \pm 0,12$ bzw. $1,61 \pm 0,14 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) nach serosalem Chloridentzug deutlich (von $3,54 \pm 0,20$ auf $0,99 \pm 0,23 \mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$). Eine Beeinflussung der Transportrate von HCO_3^- nach Erhöhung der Osmolarität durch mukosalen Pufferwechsel findet jedoch trotz einer deutlichen Zunahme der Gewebeleitfähigkeit von $1,79 \pm 0,12$ auf $3,18 \pm 0,22 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ nicht statt.

Die beschriebenen Veränderungen der Gewebeleitfähigkeit sind signifikant ($p < 0,05$) wie auch der Entzug von Chlorid serosal. Ein Einfluss von Mannit auf die Fluxraten nach Chloridentzug zeigt sich jedoch nicht. (siehe Varianzanalyse im Anhang unter **8.2**)

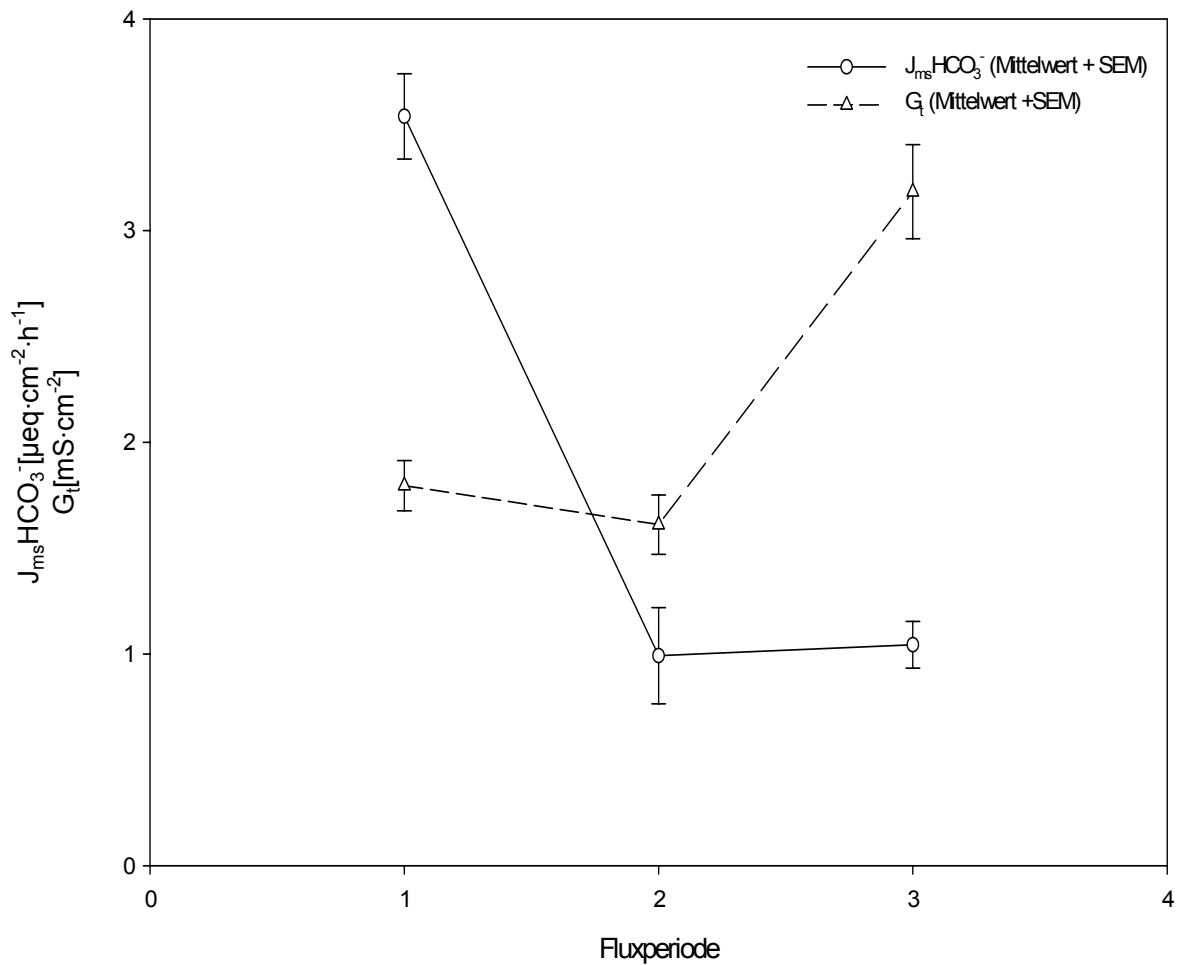


Abb. 9: Darstellung der HCO_3^- - Transportraten in $\mu\text{eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ und der Gewebeleitfähigkeit (G_t) der drei Fluxperioden. Flux 1 und 2: $300 \text{ mosmol}\cdot\text{l}^{-1}$, Flux 3: $450 \text{ mosmol}\cdot\text{l}^{-1}$; $N = 3$, $n = 9$; (Mittelwert \pm SEM); Heufütterung; Zusammensetzung der Inkubationslösung im Anhang unter 8.1.2 Tab. 7,8 und 10

4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Das Psalterepithel zeichnet sich durch eine hohe Variabilität der unidirektionalen Bicarbonattransportraten sowohl zwischen den Tieren als auch innerhalb der Tiere aus. Charakteristisch ist die Konstanz der HCO_3^- -Transporte in Abhängigkeit von der

Zeit. Der Transport von HCO_3^- , die Gewebeleitfähigkeit und auch der Kurzschlussstrom zeigten in der Kontrolle nur verhältnismäßig geringfügige Veränderungen.

- Die fehlende Beziehung zwischen Bicarbonattransportraten und der Gewebeleitfähigkeit weist auf einen Transportvorgang hin, der überwiegend transzellulär verläuft.
- Die Erhöhung der mukosalen HCO_3^- - Konzentration von 25 auf 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ hatte (aufgrund der geringen Versuchszahl) keinen signifikanten Effekt auf die gemessenen unidirektionalen Bicarbonattransportraten.
- Eine Reduzierung der serosalen Chloridkonzentration wirkte sich sowohl unter artifiziellen (deutlich erhöhte Chloridkonzentration serosal) als auch bei annähernd simulierten *in vivo* -Bedingungen charakteristisch im Sinne einer massiven Verringerung auf die HCO_3^- - Transportraten aus.
- Das Epithel reagierte auf die Veränderung resp. Aufhebung des Chloridgradienten mukosal > serosal nach serosalem Chloridentzug resp. serosaler Chloridreduktion mit einer Verringerung des Kurzschlussstromes (I_{sc}).
- Die serosale Applikation von 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DIDS bewirkte eine Verringerung der unidirektionalen HCO_3^- - Transportraten. Dieser Effekt trat trotz sehr hoher Chloridkonzentrationen auf (154,8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) und kann als deutlicher Beleg für einen basolateralen Anionenaustauscher gewertet werden.
- Bumetanid in einer serosalen Konzentration von 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ reduzierte die unidirektionalen HCO_3^- - Transportraten effektiv nur in Gegenwart hoher Chloridkonzentrationen (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Bei Umkehrung des Gradienten von Chlorid (mukosal > serosal) konnte eine Wirkung von Bumetanid nicht festgestellt werden.
- Eine Erhöhung der Leitfähigkeit (G_t) von $1,79 \pm 0,12$ auf $3,18 \pm 0,22$ $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Mittelwert \pm SEM) durch Mannit beeinflusste die unidirektionalen HCO_3^- - Transportraten nicht. Daraus ist zu schließen, dass eine bedeutsame physiologische parazelluläre Permeabilität für Bicarbonat am Blättermagenepithel nicht vorliegt und HCO_3^- überwiegend transzellulär transportiert wird.

Die vorliegenden Ergebnisse harmonieren mit den Untersuchungsergebnissen von TILING (1997). Sie bestätigen die Annahme, wonach eine Resorption von HCO_3^- elektroneutral und transzellulär erfolgt und durch $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - Austauscher an apikaler und basolateraler Seite des Paltterepithels vermittelt wird.

Ferner ergeben sich Hinweise, dass basolateral ein $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ - Cotransporter zusätzlich zu dem Anionenaustauscher vorliegt.