

## V. Diskussion

### 5.1 Einleitung

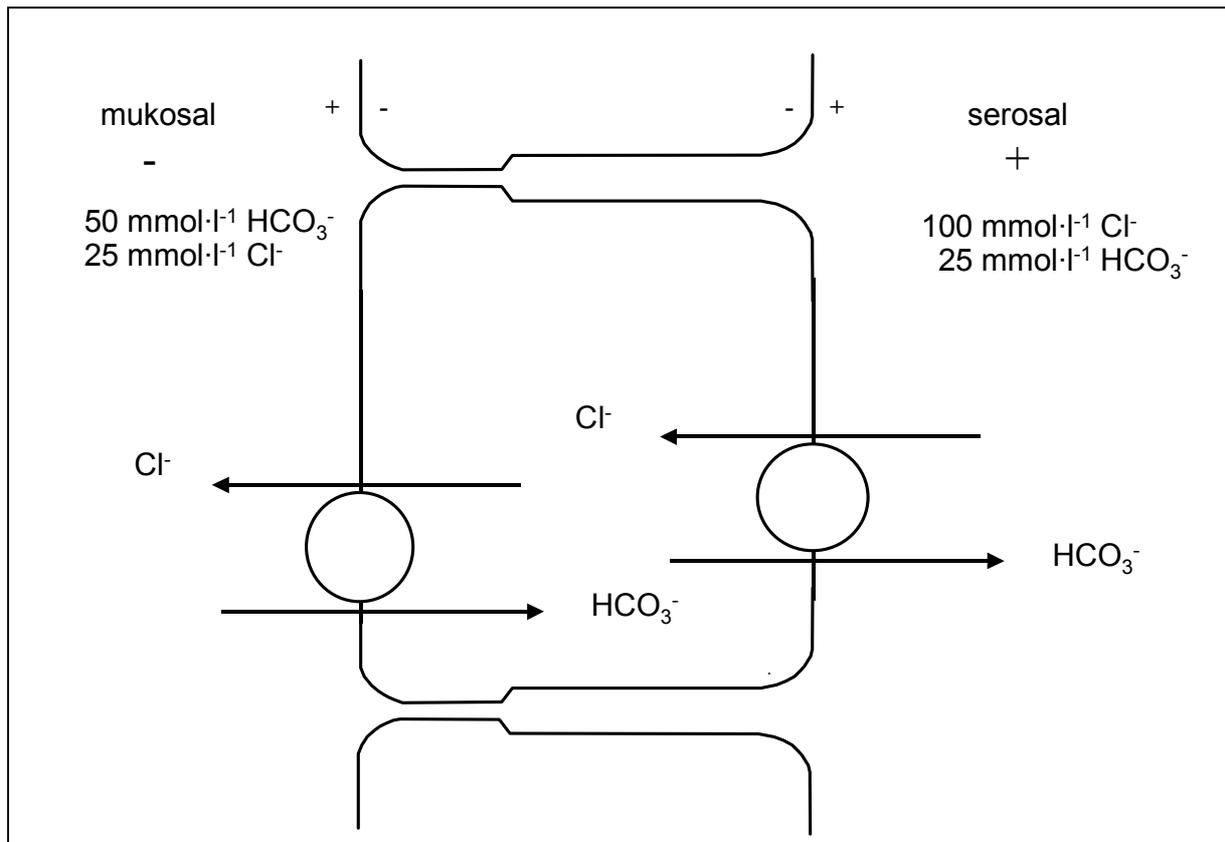
In der Literatur sind Untersuchungen, die sich mit dem Transport von Bicarbonat am Psalterepithel von Schafen befassen, nur in geringem Umfang vorhanden. Messungen am geschlachteten oder lebenden Tier legten die Vermutung einer Resorption von  $\text{HCO}_3^-$  bei gleichzeitiger Chloridsekretion zwar nahe (EDRISE, SMITH und HEWITT, 1986; v. ENGELHARDT und HAUFFE, 1975; EKMAN und SPERBER, 1953). Diese Ergebnisse stehen jedoch in einem gewissen Widerspruch zu Befunden von *in vitro*-Untersuchungen, die im Allgemeinen eine Nettoresorption von Chlorid durch die Blättermagenwand ergaben (HARRISON et al., 1970, HARRISON, 1971; MARTENS und GÄBEL, 1988; HÖFELMEIER, 1991).

Plausible Hinweise für die Ursachen der unterschiedlichen Befunde ergaben sich aufgrund der Untersuchungen von TILING (1997). In diesen *in vitro*-Experimenten mit Blättermagenepithelien von Schafen, die *in vitro in vivo*-Bedingungen simulierten, zeigte sich eindeutig eine Nettosekretion von Chlorid. Der vermutete Gegentransport von  $\text{HCO}_3^-$  (Resorption) konnte in den Versuchen von TILING (1997) aus methodischen Gründen nicht erfasst werden.

Durch die im Zuge dieser Dissertation erfolgte Etablierung der pH-Stat-Methode zur Erfassung der  $\text{HCO}_3^-$ -Transportraten am Psalterepithel von mukosal nach serosal ( $J_{\text{ms}} \text{HCO}_3^-$ ) war es nun möglich, das von TILING postulierte Austauschmodell Chlorid / Bicarbonat an apikaler und basolateraler Seite des Psalterepithels zu charakterisieren und somit zu bestätigen.

Grundprinzip dieses Modells für den  $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ -Transport (siehe **Abb. 10**) ist der mit Hilfe von Anionenaustauschern in der luminalen und basolateralen Membran vermittelte Austausch von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$ . Dieser Austausch erfolgt passiv und ist daher von den entsprechenden Gradienten der beteiligten Ionen abhängig. Die Gradienten stellen die treibende Kraft für den Transportprozess dar, welcher durch die Affinität der entsprechenden Substrate zu „ihren“ Carriern gekennzeichnet ist.

Obwohl unterschiedliche Angaben bezüglich der Konzentration der beteiligten Ionen vorliegen, ist die generelle Aussage zulässig, dass die serosale  $\text{Cl}^-$ -Konzentration mit  $100 - 110 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  immer höher ausfällt als die  $\text{Cl}^-$ -Konzentration in der Psalterflüssigkeit.



**Abb. 10:** Vereinfachtes Zellmodell der in Serie geschalteten Anionenaustauscher am Blättermagenepithel von Schafen

Die Chloridkonzentration im Blättermagen geben v. ENGELHARDT und HAUFFE (1975) ebenso wie OYAERT und BOUCKAERT (1961) mit 40 – 50 mmol·l<sup>-1</sup> (im Bereich des Psalterausflusses) an. Die Angaben über die Konzentration von Chlorid sind in den Untersuchungen von EKMAN und SPERBER (1953) niedriger, interessanterweise haubennah mit ca. 23 mmol·l<sup>-1</sup> nicht über der vermuteten intrazellulären Chloridkonzentration. Daher kann in jedem Fall von einem von serosal nach mukosal gerichteten transepithelialen Konzentrationsgradienten für Chlorid ausgegangen werden.

Bezüglich der HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> - Konzentration in der Blättermagenflüssigkeit liegen sehr unterschiedliche Angaben vor. So haben v. ENGELHARDT und HAUFFE (1975) im Bereich des Psalterausflusses eine HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> - Konzentration von ca. 22,0 ± 3,2 mmol·l<sup>-1</sup>

gemessen, ein Wert, welcher ca. ein Drittel kleiner ist als der des Pansens ( $32,7 \pm 6,9 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Diese Angaben stimmen weitgehend mit denen von OYAERT und BOUCKAERT (1961) überein. Ihre Untersuchungen am lebenden Tier ergaben variierende  $\text{HCO}_3^-$  - Konzentrationen im Psalter von 21 bis 29  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , was einer Abnahme gegenüber dem Pansen sogar um etwa 50% entspricht.

EKMAN und SPERBER (1953) hingegen kamen zwar auch zu dem Ergebnis, dass  $\text{HCO}_3^-$  im Psalter resorbiert wird, jedoch sind die von den Autoren genannten Werte deutlich geringer. So entsprach die ermittelte  $\text{HCO}_3^-$  - Konzentration in der Pansenflüssigkeit mit 25 – 30  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  etwa der Konzentration im Plasma, die Werte für  $\text{HCO}_3^-$  im Psalter erreichten jedoch im Durchschnitt nur ein Drittel der Plasmakonzentration, also ungefähr 8 bis 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Hierbei ist allerdings anzumerken, dass die Untersuchungen von EKMAN und SPERBER (1953) im Psalterinhalt geschlachteter Kühe ermittelt wurden und ein durch die zeitliche Verzögerung von 30 Minuten zwischen Schlachtung und Probenentnahme bedingter Verlust des flüchtigen  $\text{CO}_2$  in ihren Ergebnissen keine Berücksichtigung gefunden hat.

Bezüglich  $\text{HCO}_3^-$  besteht also ein nach serosal gerichteter transepithelialer Konzentrationsgradient, der sich vom Psaltereingang bis zum Psalterausfluss verringert.

Die Konzentrationsverhältnisse innerhalb der Zelle sind jedoch bezüglich der absoluten Werte sowohl für Chlorid als auch für  $\text{HCO}_3^-$  spekulativ. Dennoch gilt als das wahrscheinlichste Modell, dass die treibende Kraft für die in Serie geschalteten Anionenaustauscher auf **beide** Anionen verteilt ist. Demnach wird an der apikalen Epithelseite der Austausch von Chlorid und Bicarbonat durch den  $\text{HCO}_3^-$  - Gradienten forciert, während serosal der große Chloridgradient als die entscheidende Triebkraft für den Transport von Chlorid in die Zelle hinein und  $\text{HCO}_3^-$  aus der Zelle heraus angesehen werden darf.

## 5.2 Vorversuche / Methodenerstellung

Bei der Annahme von in Serie geschalteten  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  – Austauschern an apikaler und basolateraler Membran kam es zunächst darauf an, bezüglich der am Transportvorgang beteiligten Ionen Gradienten entsprechend ihrer zu erwartenden

Transportrichtung zu simulieren, um die Triebkraft für die Austauschmechanismen zu erhöhen. Die Konzentration von Chlorid in der serosalen Pufferlösung mit 154,8 gegenüber mukosal 124,8  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  lag für die Vorversuchsreihe jeweils deutlich über dem physiologischen Wert und der Chlorid-Gradient serosal > mukosal fiel verhältnismäßig gering aus. (Zusammensetzung der Inkubationslösungen im Anhang **8.1. 1, Tab. 1** und **2**)

Die Vorversuche führten jedoch zu der Beobachtung, dass die Variabilität der Fluxe der verschiedenen Epithelien auch von einem Tier zum Teil sehr groß ausfiel. Andererseits zeigte sich aber auch trotz anfänglicher absolut unterschiedlicher Transportraten, dass die Transportraten eines Epithels während der gewählten Versuchsdauer relativ konstant waren. Diese Beobachtung führte zu dem generellen Versuchsansatz, nach einer Kontrollperiode die gewünschte Veränderung am gleichen Epithel vorzunehmen (Prinzip „vorher/nachher“).

### **5.3 Veränderungen der Ionengradienten**

TILING (1997) hatte in ihren Untersuchungen gezeigt, dass durch eine systematische Etablierung von chemischen Gradienten für Chlorid von mukosal nach serosal und umgekehrt sich die Transportraten für Chlorid in beide Richtungen reduzierten. Ionenersatzversuche führten zu der Erkenntnis, dass weder Glukonat noch kurzkettige Fettsäuren (SCFA: Propionat, Butyrat, Acetat) Chlorid ersetzen konnten. Dies war nur möglich durch den Ersatz von  $\text{Cl}^-$  durch  $\text{HCO}_3^-$ . Die Zugabe von  $\text{HCO}_3^-$  serosal erhöhte  $J_{\text{ms}}$  für  $\text{Cl}^-$  allerdings in geringerem Maße als mukosal vorgegebenes  $\text{HCO}_3^-$   $J_{\text{sm}}$  für  $\text{Cl}^-$ .

Die Tatsache, dass also das Bestehen eines Chloridgradienten allein nicht zu einer Stimulierung der Transportraten führt (sondern diese reduzierte) und der Chloridtransport nur in Kombination mit  $\text{HCO}_3^-$  als Anionenersatz angeregt werden konnte, sprach deutlich für eine gegenseitige Abhängigkeit dieser Ionen und stand auch im Einklang mit Aussagen aus der Literatur (EKMAN und SPERBER, 1953; OYAERT und BOUCKAERT, 1961; v. ENGELHARDT und HAUFFE, 1975).

Da in den eigenen Versuchsreihen ein signifikanter Unterschied bei variierender mukosaler  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration zwischen 25 und 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  auf den

unidirektionalen Transport von  $\text{HCO}_3^-$  ( $J_{\text{ms}} \text{HCO}_3^-$ ) aufgrund der geringen Versuchszahl nicht festgestellt werden konnte, erfolgte der Einsatz von  $\text{HCO}_3^-$  nur noch in der höheren Konzentration ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Dies gewährleistete bei bicarbonatfreiem serosalem Puffer einen deutlichen chemischen Gradienten für  $\text{HCO}_3^-$  von mukosal nach serosal. Zudem wurde dadurch die Wahrscheinlichkeit erhöht, ohne Kenntnisse der Ionenverhältnisse in der Zelle auch einen nach intrazellulär gerichteten Bicarbonatgradienten an der apikalen Epithelseite etabliert zu haben.

Die eigenen Versuchsreihen mit variierender Konzentration von Chlorid serosal führten immer zu einer Reduzierung der unidirektionalen Transportraten von  $\text{HCO}_3^-$ . Die Reduktion von Chlorid serosal hatte zur Folge, dass der zur ersten Fluxperiode bestehende große Chloridgradient (serosal  $>$  mukosal) nach dem Pufferwechsel eliminiert wurde und entweder gleiche  $\text{Cl}^-$  - Konzentrationen auf beiden Epithelseiten eingesetzt wurden (serosal = mukosal) oder in den meisten Versuchen sogar eine Umkehrung der Konzentrationsverhältnisse stattfand (serosal  $<$  mukosal). Der beobachtete Effekt dieses Eingriffs bei den folgenden Fluxperioden bestand immer in einer massiven Verminderung der  $\text{HCO}_3^-$  -Transportraten. Jedoch erreichten die Transportraten von Bicarbonat ( $J_{\text{ms}}$ ) niemals den Wert Null. Dieser noch vorhandene „Resttransport“ kann durch die Tatsache erklärt werden, dass selbst bei chloridfreiem serosalem Puffer ein deutlicher  $\text{HCO}_3^-$  - Gradient von mukosal nach serosal bestand, der u. U. eine passive und parazelluläre Passage von  $\text{HCO}_3^-$  in geringem Umfang erlaubt.

Bei sehr hohem chemischen Gradienten für Chlorid von mukosal  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  zu serosal  $154,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  und einer mukosalen  $\text{HCO}_3^-$  - Konzentration von  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (5% Carbogen) fand im Mittel nur ein geringer Transport ( $J_{\text{ms}}\text{HCO}_3^-$ ) statt, der Unterschied zwischen Behandlung ( $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{Cl}^-$  serosal) und Kontrolle ( $154,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{Cl}^-$  serosal) ist jedoch charakteristisch (siehe **Tab. 2** in **Kap. 4.2.2.1.1**). Auch bei physiologischer Chloridkonzentration von  $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  serosal zu Versuchsbeginn mit anschließender Reduktion auf  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , also der identischen mukosalen Konzentration für Chlorid, fallen die  $\text{HCO}_3^-$  - Fluxe ähnlich signifikant ab (siehe **Tab. 3**, **Kap. 4.2.2.1.1**). Insgesamt jedoch sind die Transportraten in letzterer Gruppe höher. Als Erklärung kommt der stärkere mukosale  $\text{HCO}_3^-$  - Gradient in Betracht ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , 10% Carbogen). Aufgrund der relativ geringen Versuchszahl

können Unterschiede zwischen den Versuchstieren (Alter, Gesundheit, Geschlecht) in höherem Maße Einfluss auf die erzielten Effekte genommen haben.

Es ist bekannt, dass Änderungen der Gradienten (Ersatz von Chlorid durch Glukonat) Einfluss auf den Kurzschlussstrom haben. Der  $I_{sc}$  dient in diesem Sinne als Indikator für Reaktionsmuster des Epithels auf modifizierte Verhältnisse seiner „Lebensbedingungen“. Da Glukonat kein Substrat für Anionenaustauscher darstellt, ist es wahrscheinlich, dass ein in geringem Umfang stattfindender parazellulärer Transport von Chlorid nach serosal die Veränderung des Kurzschlussstroms hervorruft (TILING, 1997 ).

Ussing-Kammer-Bedingungen bedeuten im ursprünglichen Versuchsansatz immer gleiche Pufferzusammensetzung auf beiden Seiten des Epithels. Diese Bedingung wird in den Versuchsansätzen dieser Versuche nicht erfüllt. In Konsequenz dessen ist bei bestehenden Gradienten (hier insbesondere Anionengradienten von Bicarbonat und Chlorid) mit parazellulären Diffusionsvorgängen zu rechnen. Diese passiven Bewegungen der genannten Ionen beeinflussen den gemessenen Kurzschlussstrom, der auf aktive Ionentransportraten zurückzuführen ist. Aufgrund der gewählten Versuchsbedingungen ist somit der Kurzschlussstrom die Summe der aktiven Ionentransportraten und der passiven Diffusionsvorgänge. Eine quantitative Differenzierung ist nicht möglich. Die Veränderung des  $I_{sc}$  nach dem Pufferwechsel und damit der jeweiligen Gradienten gibt Hinweise für den passiven Anteil des  $I_{sc}$ , wenn man annimmt, dass dadurch aktive Transportvorgänge nicht beeinflusst werden. Die beobachteten Veränderungen des  $I_{sc}$  (siehe **Abb. 7, Kap. 4.2.2.1.2**) sind also unter diesen Vorbehalten zu betrachten. Da sie qualitativ immer den zu erwartenden Veränderungen aufgrund des Wechsels der Gradienten entsprachen, ist die Annahme von passiven Diffusionsvorgängen berechtigt.

Eine Änderung der Konzentrationsverhältnisse und damit einhergehend auch der Gradienten, zum Beispiel hervorgerufen durch einen Chloridentzug in der serosalen Pufferlösung, muss zwangsläufig eine Veränderung des  $I_{sc}$  nach sich ziehen. In diesem Fall wird der Gradient für Chlorid aufgehoben bzw. sogar umgekehrt. Die „Wanderung“ negativer Ladung (in unbekannter Größe) durch passiven Transport von Chlorid von mukosal nach serosal (zuvor serosal nach mukosal) begünstigt eine Reduktion des  $I_{sc}$ .

Ionentransporte von  $\text{HCO}_3^-$  und Chlorid, die über den Anionenaustauscher vermittelt werden, laufen elektroneutral ab und haben keinen Einfluss auf den Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ).

#### **5.4 Erhöhung der Osmolarität mukosal durch Mannit**

Neben dem transzellulären Transport existiert die Möglichkeit der parazellulären Passage von  $\text{HCO}_3^-$ . Kenntnisse über die parazelluläre Permeabilität für  $\text{HCO}_3^-$  am Psalterepithel sind nicht vorhanden. Um den potentiellen Anteil dieses Transportweges am gemessenen Gesamttransport zu ermitteln, wurde in weiteren Versuchen durch Mannit die Osmolarität der mukosalen Inkubationslösung erhöht, um hypertone Bedingungen zu erstellen.

Mannit bewirkt über eine Steigerung der Osmolarität eine Erhöhung der Gewebeleitfähigkeit ( $G_t$ ), die auch eine Zunahme der parazellulären Leitfähigkeit,  $G_s$ , einschloss (BENDZKO, 1998). Bei entsprechend vorhandener parazellulärer Leitfähigkeit für  $\text{HCO}_3^-$  würde also eine osmotisch bedingte Zunahme der  $G_s$  den möglichen parazellulären passiven Transport von  $\text{HCO}_3^-$  erhöhen. Die Veränderung des osmotischen Druckes der mukosalen Inkubationslösung von 300 auf 450  $\text{mosmol}\cdot\text{l}^{-1}$  verursachte eine signifikante Erhöhung der Gewebeleitfähigkeit ( $G_t$ ) von 1,61 auf 3,18  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Der Transport von  $\text{HCO}_3^-$  änderte sich dadurch jedoch nicht (siehe **Abb. 9, Kap. 4.4**). Aus diesem Grunde ist die Schlussfolgerung zulässig, dass die Permeabilität des parazellulären Passageweges für  $\text{HCO}_3^-$  offensichtlich gering ist.

Diese Beobachtung überrascht etwas, weil die Untersuchungen von BENDZKO (1998) gezeigt haben, dass sehr viel größere Moleküle durchaus in der Lage sind, diesen Transportweg zu nutzen. In den Untersuchungen von BENDZKO ergaben sich für  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ , das ausschließlich parazellulär transportiert wird, mit zunehmender  $G_t$  des Psalterepithels eine lineare Erhöhung der Passageraten für  $^{51}\text{Cr-EDTA}$ . Diese Zunahme war besonders ausgeprägt nach einer Erhöhung der  $G_t$  durch einen osmotischen Gradienten (mukosal  $\gg$  serosal) (BENDZKO, 1998).

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ergibt sich aufgrund von Untersuchungsergebnissen mit Epithelien des Darmes (siehe Review POWELL, 1981). Demzufolge besteht für die meisten Epithelien eine sogenannte Kationen-

Selektivität des parazellulären Passageweges. Anionen werden aufgrund der negativen Festladung dieses Passageweges in ihrer Fähigkeit zur passiven Bewegung zwischen den Zellen hindurch benachteiligt, Kationen dagegen begünstigt. Diese Selektivität ist vor allem in Epithelien des Magens und des Dünndarms zu beobachten (POWELL, 1981). Es ist daher durchaus denkbar, dass die entsprechende negative Festladung auch am Psalterepithel einer parazellulären Diffusion von  $\text{HCO}_3^-$  entgegensteht.

### **5.5 Hemmung der Anionenaustauscher serosal (DIDS)**

Versuche mit dem Stilben-Derivat DIDS (4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure) haben einen ähnlichen Effekt hervorgerufen wie der teilweise oder vollkommene Entzug von Chlorid aus der serosalen Pufferlösung.

Der Einsatz von DIDS erfolgte in einer Konzentration von  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ausschließlich auf der serosalen Seite des Epithels. Da die Wirkung des Hemmstoffs über eine kompetitive Verdrängung von Chlorid erfolgt, ist eine Konkurrenz von DIDS mit  $\text{Cl}^-$  um die Bindungsstelle daher auch abhängig von der Konzentration des entsprechenden Ions. Trotz der hohen  $\text{Cl}^-$ -Konzentration von  $154 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  ergab sich eine signifikante Hemmung des  $\text{HCO}_3^-$ -Transportes, wie sie auch von anderen Autoren in verschiedenen Geweben/Zellen beobachtet wurde. (WINTERHAGER, STEWART, HEINTZE und PETERSEN, 1986; HEINTZE, OLLES, PETERSEN und WOOD, 1978; VOGLER, 1991; TILING, 1997).

Die benutzte Konzentration von DIDS ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) ist sehr hoch und kann auch unspezifische Reaktionen verursachen. So haben CABANTCHIK und GREGER (1992) festgestellt, dass bei Konzentrationen des Hemmstoffs von  $> 100 \mu\text{M}$  chemische Modifikationen hervorgerufen werden können, die den Vorgang der Blockierung von Anionenaustauschern irreversibel machen.

Dennoch fügt sich der erzielte Effekt durch den Einsatz von DIDS in der Konzentration von  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  in das Gesamtbild der Untersuchungen ein. Wichtig ist die Tatsache, dass mit hohen Konzentrationen von Chlorid gearbeitet wurde und dies auch eine erhöhte Konzentration von DIDS erforderte, um Effekte zu ermöglichen (CABANTCHIK und GREGER, 1992).

Die Zugabe von  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  DIDS serosal verursachte eine Reduzierung der  $\text{HCO}_3^-$  - Fluxe um ca. 40 % gegenüber der Kontrolle (siehe **Abb. 8, Kap. 4.3.1**). Der Effekt fällt damit nicht so stark aus wie bei der Manipulation des  $\text{Cl}^-$  - Gradienten, verweist aber zumindest tendenziell auf das Bestehen eines  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  - Austauschers an der basolateralen Seite des Epithels und entspricht Resultaten der Untersuchungen von TILING (1997).

In der Arbeit von TILING führten sowohl ein beidseitiger Einsatz von DIDS ( $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) als auch der einseitige Hemmstoffeinsatz ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) bei einer Konzentration von  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Chlorid (beidseitig) zu einer deutlichen Reduktion der  $\text{Cl}^-$  - Transportraten.

Der Effekt ist bei mukosalem Einsatz von DIDS geringfügig, nicht aber signifikant stärker. Bei der Annahme, dass am apikalen Zellpol Bicarbonat und am basolateralen Zellpol Chlorid die dominierend treibende Kraft der Anionenaustauscher darstellt, hätte eigentlich der serosale Einsatz von DIDS größeren Einfluss auf den Anionentransport (Chloridionentransport) haben sollen.

Dass dies offensichtlich nicht der Fall ist, kann auf den ebenfalls basolateral lokalisierten  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  - Cotransporter zurückzuführen sein. Das Diuretikum Furosemid in einer Konzentration von  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  erniedrigte die unidirektionalen Transportraten nur serosal signifikant. Zudem wurde ein synergistischer Effekt bei kombiniertem Einsatz von DIDS und Furosemid serosal bewirkt (TILING, 1997). Gerade diese verstärkte Hemmwirkung gegenüber alleiniger Gabe von Furosemid ( $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) oder DIDS ( $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) kann als Beleg für einen basolateralen  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  - Cotransporter interpretiert werden.

## **5.6 Hemmung des $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$ - Cotransporters durch Bumetanid**

Wie TILING vermutet hat, wird der Transport von Chlorid am Psalterepithel von Schafen durch in Serie geschaltete Anionenaustauscher vermittelt. Da ein direkter Austausch von Chlorid gegen Bicarbonat im Verhältnis 1 : 1 elektroneutral abläuft, käme zusätzlich auch ein Transport von Chlorid in Betracht, der durch einen basolateral lokalisierten  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  - Cotransporter unterhalten wird.

Von TILING durchgeführte Untersuchungen legen diese Vermutung nahe. In Versuchen, in denen Chlorid durch Glukonat ersetzt wurde, führte die serosale Substitution zu einer deutlich stärkeren Abnahme von  $J_{sm}$  und  $J_{ms}$  als bei mukosalem Ersatz. Dieser erste Hinweis auf das Vorhandensein eines zweiten Chloridtransporters an der basolateralen Epithelseite fand bei nachfolgenden Hemmstofftests Bestätigung. DIDS hatte seine effizientere Wirksamkeit auf unidirektionale Chloridfluxe bei mukosaler Applikation. Zudem konnte der Einsatz des Schleifendiuretikums Furosemid, serosal appliziert, die Chloridtransportraten noch deutlicher hemmen als dies bei DIDS serosal der Fall war. Den Nachweis einer fehlenden Wirkung von Furosemid bei mukosaler Verwendung hatten bereits MARTENS und GÄBEL (1988) erbracht.

Insbesondere die durch die kombinierte serosale Gabe von DIDS ( $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) und Furosemid ( $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) erzielten additiven Effekte auf den Transport von Chlorid unterstützten die These, dass basolateral zwei getrennte Systeme für den Chloridionentransport am Psalterepithel existieren müssen.

Dennoch sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten. Das Schleifendiuretikum Furosemid in einer Konzentration von  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  erniedrigte die unidirektionalen Transportraten zwar nur serosal signifikant, dennoch kann eine eventuelle Hemmwirkung auch auf den Anionenaustauscher nicht gänzlich ausgeschlossen werden. So betonen CABANTCHIK und GREGER (1992) die durch Schleifendiuretika hervorgerufenen vielfältigen Effekte.

In den eigenen Untersuchungen wurde an Stelle von Furosemid Bumetanid eingesetzt. Bumetanid hat eine Hemmwirkung, die jene von Furosemid um ein Vielfaches übersteigt, auf den  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  - Cotransport in unterschiedlichen Geweben und gilt heute als der klassische Vertreter aus der Gruppe der Schleifendiuretika (O'GRADY, PALFREY und FIELD, 1987).

Die Addition von  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Bumetanid serosal in Anwesenheit von hohen ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) Chloridkonzentrationen hatte einen deutlich stärkeren Effekt auf die Bicarbonattransportraten als bei reduziertem ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) Chloridangebot (siehe **Kap. 4.3.2**). Ein Einfluss auf die Bicarbonatfluxe durch Bumetanid ist demnach bei beiden Gruppen vorhanden. Der erzielte Effekt wird zudem statistisch abgesichert ( $p < 0,05$ ). Es lassen sich aber weder Rückschlüsse auf die über diesen Cotransporter vermittelte Menge der Anionenbewegungen ziehen noch sind Aussagen

darüber möglich, zu welchen Anteilen Anionenaustauscher und  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  - Cotransporter in den Versuchen dieser Arbeit für den unidirektionalen Transport von  $\text{HCO}_3^-$  verantwortlich sind. Die Ergebnisse korrelieren jedoch mit der Annahme von TILING, wonach basolateral beide Transportsysteme existieren.

Für den kontinuierlichen Austausch von Chlorid und Bicarbonat im Psalter ist dieses Modell durchaus sinnvoll. So ist ein System allein aus in Serie geschalteten Anionenaustauschern anfällig für Änderungen der Ionenkonzentrationen intra- oder extrazellulär.

Für den Fall, dass FFS im Vormagensystem undissoziiert in die Zelle diffundieren und dort mit  $\text{HCO}_3^-$  reagieren, käme es aufgrund des anschließenden Zerfalls zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  zu einer drastischen Senkung der intrazellulären  $\text{HCO}_3^-$  -Konzentration. Folglich könnte nun auch Chlorid nicht mehr in die Zelle gelangen, wenn Bicarbonat als Substrat für den Austausch durch die basolaterale Membran fehlt. Dies hätte die unmittelbare Konsequenz, dass auch der apikale Anionenaustauscher ohne ausreichende Chloridzufuhr gehemmt würde.

Ein basolateraler  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  - Cotransporter wäre dann in der Lage, den Transport von Chlorid in die Zelle aufrechtzuerhalten und dadurch eine über den apikalen Austauscher vermittelte  $\text{HCO}_3^-$  - Resorption weiterhin zu gewährleisten.

### 5.7 Kritische Anmerkungen

Die relativ große Variation der gemessenen Bicarbonat-Fluxe innerhalb der Tiere aber auch zwischen den Tieren wurde bereits angesprochen. Es ist bekannt, dass unterschiedliche Fütterung (stärkereiche Kraftfutter mit geringem Rohfaseranteil oder Heu als Futtermittel mit geringer Energiedichte und hohem Rohfaseranteil) hinsichtlich Quantität und Qualität Einfluss nehmen auf das Fermentationsgeschehen in den Vormägen und dies auch Auswirkungen hat auf die Transportphysiologie von Reticulorumen und Psalter. DIRKSEN et al. (1984) ermittelte durch *in vivo* -Versuche an Kühen bei Futterumstellung von energiearmen zu energiereichen Rationen bereits innerhalb weniger Wochen sowohl Proliferationsprozesse an der Mukosa als auch Umbauvorgänge an den Pansenzotten bezüglich ihrer Größe und Anzahl. LODEMANN (2001) konnte durch Untersuchungen am isolierten Pansenepithel von

Schafen u.a. nachweisen, dass Krafffuttergaben den Nettotransport von  $\text{Na}^+$  insgesamt erhöhen und die osmotische Resistenz des Epithels mit steigenden Krafffuttergaben zunimmt. Die Fähigkeit des Psalters, in ähnlicher Weise wie der Pansen an modifiziertes Futterangebot zu adaptieren, wird vermutet.

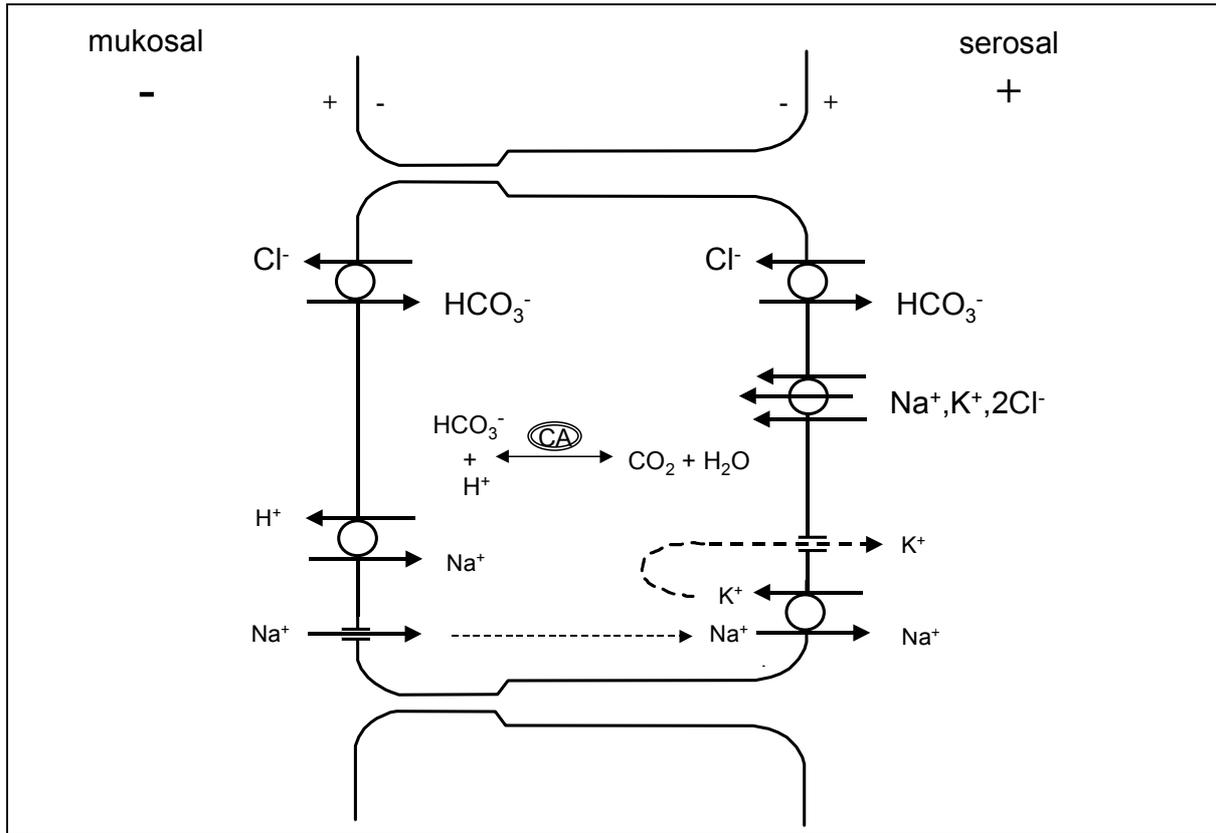
Die in diesen Versuchen zum Einsatz gekommenen Epithelien stammen von Tieren, die anfangs unterschiedlichen Fütterungsbedingungen ausgesetzt waren (siehe **Kap. 3, „Material und Methoden“**). Aufgrund der generell variablen Transportrate von  $\text{HCO}_3^-$  erschien es sinnvoll, sich auf Tiere mit Heufutterration zu beschränken. Dies geschah auch im Sinne einer Standardisierung des Verfahrens. Dass Effekte bei Krafffutterrationen generell höhere Fluxwerte hervorrufen, wird jedoch aus oben genannten Gründen angenommen.

Die dennoch prägnante Variabilität von Ionentransporten am Psalter wird auch von anderen Autoren beschrieben (TILING, 1997; KRÜTZFELDT, 2002).

Daher kann und soll aus den gewonnenen Resultaten dieser Untersuchung keine quantitative Aussage abgeleitet werden. Dies auch deshalb nicht, da vollständige Kenntnisse aller Transportmechanismen am Psalterepithel nicht vorhanden sind. Eine quantitative Minderung der Ergebnisse wäre beispielsweise durch einen basolateralen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  - Austauscher (NHE1) zu erklären. NHE1 sind ubiquitär vorhanden und spielen u. a. eine zentrale Rolle bei der Regulierung des intrazellulären pH ( $\text{pH}_i$ ) (PUTNEY, DENKER und BARBER, 2002) und können an verschiedenen Geweben sowohl apikal als auch basolateral auftreten (WAKABAYASHI, MUNEKAZU und POUYSSEGUR, 1997).

Trotz der Variabilität stellt sich in allen Versuchen der Verlauf der Fluxraten in Abhängigkeit von der Zeit als sehr konstant dar. Zudem sind alle Effekte nach Behandlungen (Ionenkonzentrationen, Hemmstoffe) reproduzierbar.

Das in **Abb. 11** dargestellte Zellmodell der in Serie geschalteten Anionenaustauscher kann durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Die Hinweise auf einen basolateral lokalisierten  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  - Cotransporter am Psalterepithel korrelieren mit den Resultaten von TILING (1997).



**Abb. 11:** Zellmodell für in Serie geschalteten Anionenaustauscher  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  an mukosaler (apikaler) und serosaler (basolateraler) Seite des Blättermagenepithels von Schafen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben somit lediglich qualitativen Charakter. Hinsichtlich einer quantitativen Beurteilung ist die Feststellung von Bedeutung, dass unter reinen Ussingkammerbedingungen *in vitro* nicht *in vivo* –Verhältnissen gleichzustellen sind, da weitere übergeordnete Regulationsmechanismen des Organismus in der Versuchsdurchführung keine Berücksichtigung finden.

Bezüglich der statistischen Auswertung der Ergebnisse muss angemerkt werden, dass Grundlage der Varianzanalyse die Annahme war, dass die Varianzen der einzelnen Epithelien pro Behandlungsgruppe gleich sind. Dieser Nachweis konnte jedoch aufgrund der zum Teil fehlenden Wiederholungsmessungen (evtl. nur ein Epithel pro Tier) nicht immer erbracht werden. Von daher bestehen gewisse Zweifel, dass die Annahme der Varianzhomogenität immer zutreffend war.