

4 ERGEBNISSE

4.1 Versuche mit isolierten Pansenepthelien von heugefütterten Schafen

4.1.1 Einfluß des osmotischen Gradienten auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Pansenepthels

In der ersten Versuchsserie wurde der Einfluß des osmotischen Gradienten unter Kurzschlußbedingungen ($PD_t = 0 \text{ mV}$) auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Pansenepthels untersucht.

Nach der Äquilibration der Epithelien in den Ussing-Kammern für 20 Minuten unter isoosmotischen Bedingungen (300 mosmol/l auf beiden Epithelseiten) wurde bei den beiden Behandlungsgruppen die Pufferlösung auf der luminalen Gewebeseite durch eine Inkubationslösung ersetzt, die durch Zugabe von Mannit einen erhöhten osmotischen Druck von 350 bzw. 450 mosmol/l aufwies (in der Abbildung 4.1 zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$). In der Kontrollgruppe wurden die isoosmotischen Bedingungen weiterhin aufrechterhalten.

Für die Erhöhung des osmotischen Druckes in der Pufferlösung wurde Mannit verwendet, ein chemisch relativ inerte Zucker, der von den Zellen nicht aufgenommen und nicht metabolisiert wird. Aus diesem Grund können die aufgetretenen Effekte als osmotische Auswirkungen angesehen werden.

Um die Reversibilität der Auswirkungen eines erhöhten osmotischen Druckes auf die elektrophysiologischen Parameter zu prüfen, wurde nach 130 Minuten auf der mukosalen Seite der Puffer mit der erhöhten Osmolarität wieder gegen den Kontrollpuffer ausgetauscht und damit der osmotische Gradient beseitigt.

Die genaue Zusammensetzung der eingesetzten Inkubationslösungen ist dem Anhang (Kapitel Nr. 9.1.2) zu entnehmen.

4.1.1.1 Veränderung der Gewebeleitfähigkeit (G_t) in Abhängigkeit vom osmotischen Druck der mukosalen Pufferlösung

Abbildung 4.1 gibt die Veränderung der Gewebeleitfähigkeit in Abhängigkeit vom osmotischen Druck der luminalen Pufferlösung wieder.

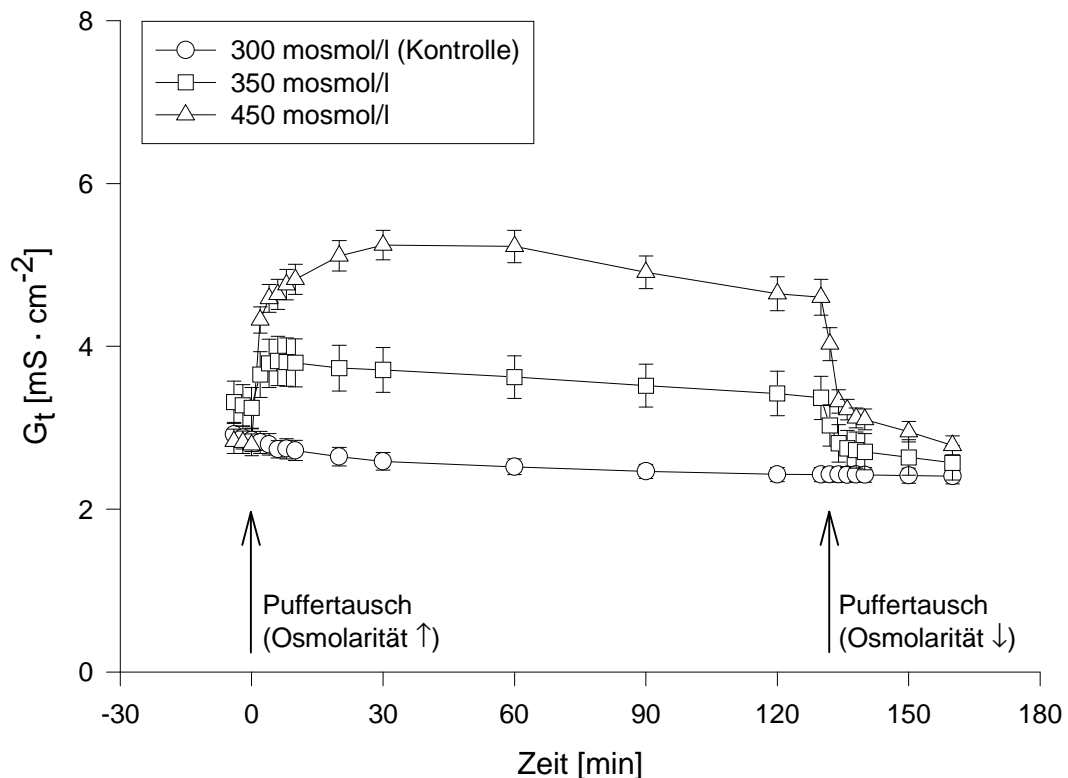


Abbildung 4.1: Veränderung der Gewebeleitfähigkeit (G_t) in Abhängigkeit vom osmotischen Druck der mukosalen Pufferlösung (300, 350 und 450 mosmol/l). Die Erhöhung des osmotischen Druckes wurde durch Mannit vorgenommen. [Mittelwerte \pm SEM, N = 4, n = 16; SEM wird in der Kontrollgruppe durch die Größe des Symbols verdeckt; statistische Beschreibung siehe Text]

Bei beiden Behandlungsgruppen (350 und 450 mosmol/l) erfolgt innerhalb von zwei Minuten nach der Zugabe der hypertonen Lösung eine signifikante Erhöhung der Gewebeleitfähigkeit (G_t) [$p < 0,0001$]. Die Zunahme der Leitfähigkeit stabilisiert sich bei 350 mosmol/l innerhalb von zehn Minuten und bei 450 mosmol/l innerhalb von 30 Minuten und ändert sich dann während der restlichen Versuchszeit von 100 Minuten nur noch gering. In der Kontrollgruppe bleibt dagegen die Leitfähigkeit während des gesamten Versuchszeitraumes von 160 Minuten nahezu unverändert, es erfolgt lediglich eine geringe zeitabhängige Abnahme von G_t .

Während der ganzen Behandlungsdauer (2. bis 130. Minute) bestehen zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen signifikante Unterschiede der Leitfähigkeit [$p < 0,05$]. Dagegen können vor der mukosalen Osmolaritätserhöhung zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede der Leitfähigkeit festgestellt werden.

Die Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen in den beiden Behandlungsgruppen (Puffertausch bei $t = 130$ min) führt sofort zur Abnahme der Gewebeleitfähigkeit [$p < 0,0001$ innerhalb von zwei Minuten], die sich nach 30 Minuten nicht mehr von der G_t der Kontrolle unterscheidet. Mannit bzw. der erhöhte osmotische Druck verursacht somit erhebliche, aber absolut reversible Veränderungen der Leitfähigkeit.

4.1.1.1.1 Mathematische Beschreibung der Gewebeleitfähigkeit als Funktion der Zeit

Für die Anstiegsphase der Gewebeleitfähigkeit (G_t) nach der Osmolaritätserhöhung wurde für die beiden Behandlungsgruppen 350 und 450 mosmol/l jeweils eine Regression mit der Gleichung 4.1 durchgeführt:

$$G_t(t) = G_{\max} + (G_{\min} - G_{\max}) * e^{\left(\frac{-t}{\tau}\right)} \quad (\text{Gleichung 4.1})$$

$G_t(t)$ = Leitfähigkeit (G_t) zum Zeitpunkt t [$\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$]

G_{\max} = maximale Leitfähigkeit [$\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$]

G_{\min} = minimale Leitfähigkeit zur Zeit $t = 0$ min (Ausgangsleitfähigkeit unter isoosmotischen Bedingungen) [$\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$]

t = Zeit [min]

τ = Zeitkonstante [min]

Abbildung 4.2 stellt die Meßwerte und die Regressionskurven (errechnet mit der Gleichung 4.1) für den Anstieg der Gewebeleitfähigkeit dar. Die Meßwerte für den Anstieg von G_t und die Parameter τ , G_{\min} und G_{\max} für die Gleichung 4.1, die sich aus den Regressionen ergeben haben, sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

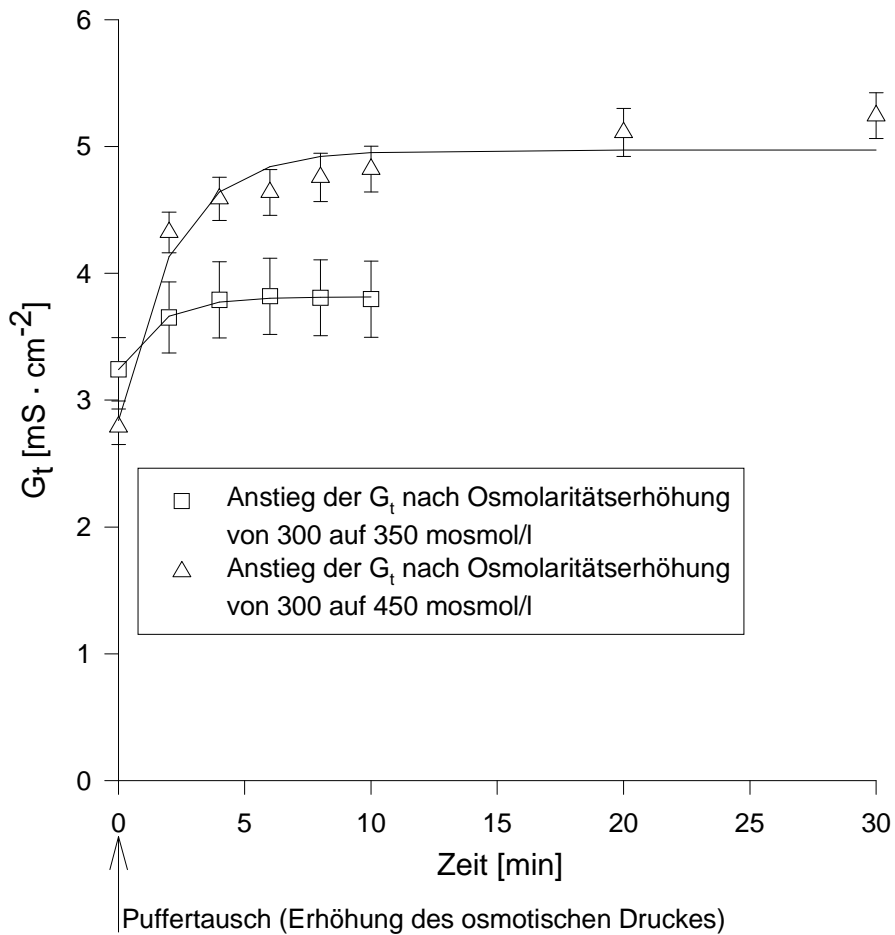


Abbildung 4.2: Anstieg der Gewebeleitfähigkeit (G_t) nach Erhöhung des osmotischen Druckes in der mukosalen Pufferlösung von 300 mosmol/l auf 350 bzw. 450 mosmol/l zum Zeitpunkt $t = 0$ min mit den Regressionen nach Gleichung 4.1 [Mittelwerte \pm SEM, $N = 4$, $n = 16$; für 350 mosmol/l: $r^2 = 1,0$, $SEE = 0,02$, $p = 0,0002$, für 450 mosmol/l: $r^2 = 0,95$, $SEE = 0,21$, $p = 0,0007$]

Tabelle 4.1: Zeitabhängiger Anstieg der Gewebeleitfähigkeit nach Erhöhung des osmotischen Druckes in der mukosalen Pufferlösung von 300 mosmol/l auf 350 bzw. 450 mosmol/l zum Zeitpunkt t = 0 min [Mittelwerte ± SEM, N = 4, n = 16]

Zeit [min]	G _t nach Erhöhung der Osmolarität auf 350 mosmol/l	Regressionsparameter für Gleichung 4.1 bei 350 mosmol/l	G _t nach Erhöhung der Osmolarität auf 450 mosmol/l	Regressionsparameter für Gleichung 4.1 bei 450 mosmol/l
0	3,24 ± 0,25	$\tau = 1,50$ $G_{\min} = 3,24$ $G_{\max} = 3,81$	2,79 ± 0,14	$\tau = 2,15$ $G_{\min} = 2,84$ $G_{\max} = 4,97$
2	3,65 ± 0,28		4,32 ± 0,16	
4	3,79 ± 0,30		4,59 ± 0,17	
6	3,82 ± 0,30		4,64 ± 0,18	
8	3,81 ± 0,30		4,76 ± 0,19	
10	3,80 ± 0,30		4,82 ± 0,18	
20			5,11 ± 0,19	
30			5,24 ± 0,18	

Erläuterung: G_{min} (vor der Osmolaritätserhöhung) sowie G_{max} sind fett gekennzeichnet

Für die Zeit t ≥ 130 min (Abnahme der Gewebeleitfähigkeit) wurde für beide Behandlungsgruppen jeweils eine Regression mit Gleichung 4.2 durchgeführt:

$$G_t(t) = G_{\min} + (G_{\max} - G_{\min}) * e^{\left(\frac{-t}{\tau}\right)} \quad (\text{Gleichung 4.2})$$

G_t(t) = Leitfähigkeit (G_t) zum Zeitpunkt t [mS · cm⁻²]

G_{max} = maximale Leitfähigkeit zur Zeit t = 130 min (vor der Beseitigung des osmotischen Gradienten) [mS · cm⁻²]

G_{min} = minimale Leitfähigkeit [mS · cm⁻²]

t = Zeit [min]

τ = Zeitkonstante [min]

Abbildung 4.3 ist die Darstellung der Meßwerte und der Regressionskurven nach Gleichung 4.2. Tabelle 4.2 enthält die Meßwerte und die Regressionsparameter für die Gleichung 4.2 für die Abnahme der Leitfähigkeit.

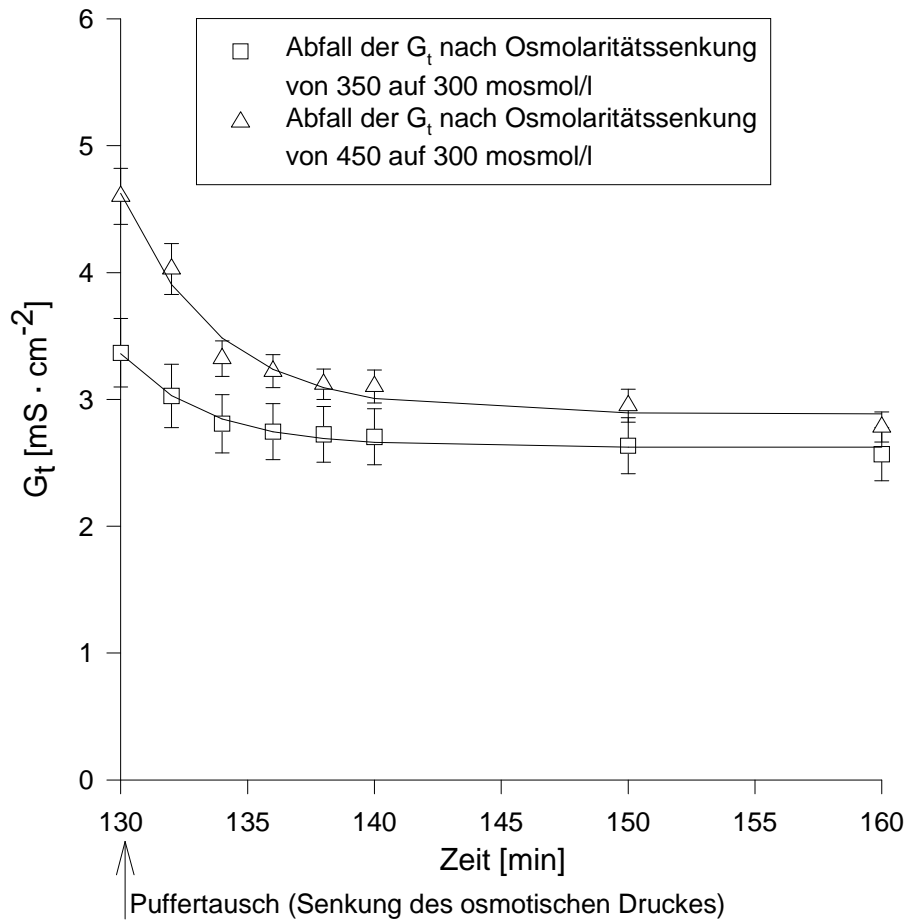


Abbildung 4.3: Abnahme der Gewebeleitfähigkeit (G_t) nach Senkung des osmotischen Druckes in der mukosalen Pufferlösung von 350 bzw. 450 mosmol/l auf 300 mosmol/l zum Zeitpunkt $t = 130$ min mit den Regressionen nach Gleichung 4.2 [Mittelwerte \pm SEM, $N = 4$, $n = 16$; für 350 mosmol/l: $r^2 = 0,98$, $SEE = 0,04$, $p < 0,0001$, für 450 mosmol/l: $r^2 = 0,98$, $SEE = 0,12$, $p < 0,0001$]

Tabelle 4.2: Zeitabhängiger Abfall der Gewebeleitfähigkeit nach Beseitigung des osmotischen Gradienten zum Zeitpunkt $t = 130$ min [Mittelwerte \pm SEM, N = 4, n = 16]

Zeit [min]	G_t nach Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen (Vorbehandlung 350 mosmol/l)	Regressionsparameter für Gleichung 4.2 bei 350 mosmol/l	G_t nach Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen (Vorbehandlung 450 mosmol/l)	Regressionsparameter für Gleichung 4.2 bei 450 mosmol/l
130	3,37 \pm 0,27	$\tau = 3,35$ $G_{\min} = 2,62$ $G_{\max} = 3,36$	4,60 \pm 0,22	$\tau = 3,75$ $G_{\min} = 2,88$ $G_{\max} = 4,62$
132	3,03 \pm 0,25		4,03 \pm 0,20	
134	2,81 \pm 0,23		3,32 \pm 0,14	
136	2,75 \pm 0,22		3,22 \pm 0,13	
138	2,73 \pm 0,22		3,12 \pm 0,12	
140	2,70 \pm 0,22		3,10 \pm 0,13	
150	2,63 \pm 0,22		2,95 \pm 0,13	
160	2,57 \pm 0,21		2,78 \pm 0,12	

Erläuterung: G_{\max} (vor der Beseitigung des osmotischen Gradienten) sowie G_{\min} sind fett gekennzeichnet

In Tabelle 4.3 werden die für den Anstieg und den Abfall der Leitfähigkeit ermittelten τ -Werte der beiden Behandlungsgruppen (350 und 450 mosmol/l) gegenübergestellt.

Tabelle 4.3: Gegenüberstellung der für die beiden Behandlungsgruppen (350 und 450 mosmol/l) ermittelten τ -Werte für den Anstieg und den Abfall der Leitfähigkeit

	Gruppe „350 mosmol/l“	Gruppe „450 mosmol/l“
τ für den Anstieg der G_t nach Osmolaritätserhöhung	1,50	2,15
τ für den Abfall der G_t nach Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen	3,35	3,75

Aus dem Vergleich der für τ ermittelten Werte ist zu erkennen, daß in beiden Behandlungsgruppen der Anstieg der Leitfähigkeit nach der Erhöhung des osmotischen Druckes schneller erfolgt als der Abfall der Leitfähigkeit nach der Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen. Das bedeutet, daß die beobachtete Reversibilität der Gewebeleitfähigkeit nach der Beseitigung des osmotischen Gradienten mehr Zeit beansprucht als der vorangegangene Leitfähigkeitsanstieg nach der mukosalen Osmolaritätserhöhung.

Ein Vergleich der τ -Werte zwischen den beiden Behandlungsgruppen ergibt, daß Anstieg und Abfall der Gewebeleitfähigkeit bei der Behandlungsgruppe „350 mosmol/l“ schneller erfolgen als bei den Epithelien, die einem mukosalen osmotischen Druck von 450 mosmol/l ausgesetzt waren.

4.1.1.1.2 Veränderung der Gewebeleitfähigkeit eines Epithels in Abhängigkeit von seiner Ausgangsleitfähigkeit und vom osmotischen Druck

Um zu demonstrieren, daß sich die Gewebeleitfähigkeit (G_t) eines Epithels nach der Erhöhung des osmotischen Druckes unabhängig von seiner Ausgangsleitfähigkeit unter isoosmotischen Bedingungen verändert, wird für jedes Gewebe die Leitfähigkeitsveränderung 60 Minuten nach der Osmolaritätserhöhung [$\Delta G_t(t = 60)$] gegenüber der jeweiligen Ausgangsleitfähigkeit zum Zeitpunkt $t = 0$ min [$G_t(t = 0)$] in der Abbildung 4.4 grafisch dargestellt.

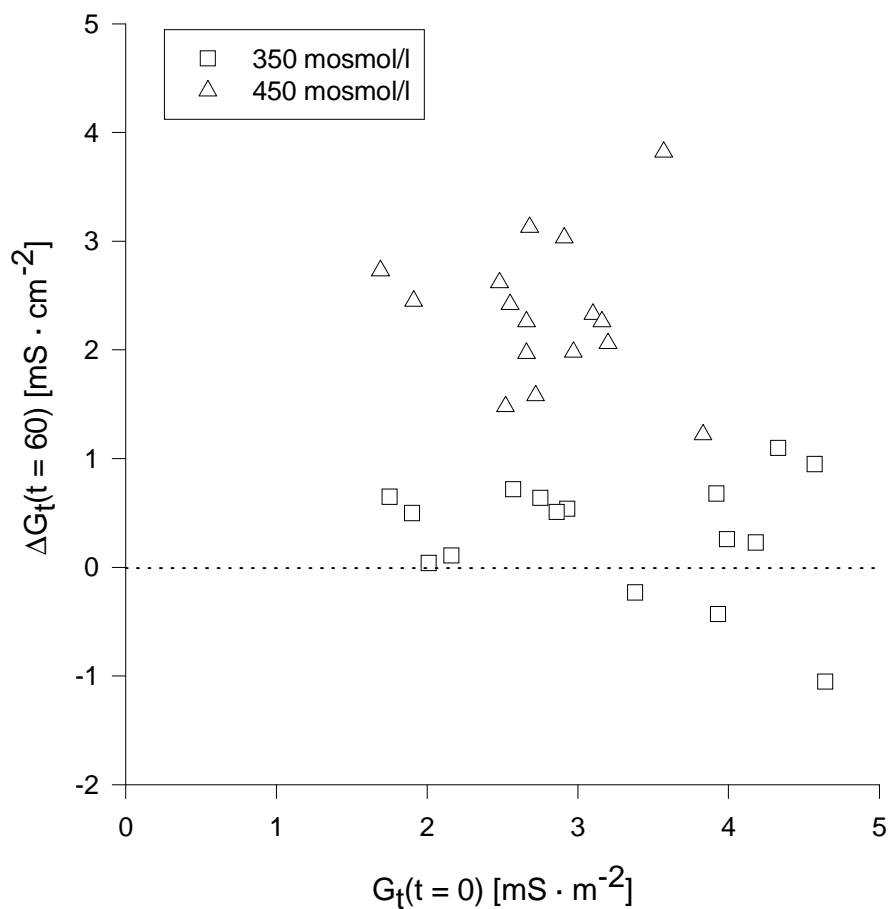


Abbildung 4.4: Leitfähigkeitsveränderung [$\Delta G_t(t = 60)$] 60 Minuten nach Erhöhung des osmotischen Druckes in der mukosalen Pufferlösung (von 300 mosmol/l auf 350 bzw. 450 mosmol/l) in Abhängigkeit von der Ausgangsleitfähigkeit [$G_t(t = 0)$] unter isoosmotischen Bedingungen (300 mosmol/l auf beiden Epithelseiten). [Darstellung der Einzelwerte von 16 Epithelien pro Behandlungsgruppe, $N = 4$, $n = 16$]

Aus der Abbildung geht hervor, daß zwischen Ausgangsleitfähigkeit und Leitfähigkeitsveränderung kein Zusammenhang existiert, daß heißt, ΔG_t bleibt innerhalb einer Behandlungsgruppe, unabhängig von der Höhe der Ausgangsleitfähigkeit, relativ konstant. Die Veränderung der Gewebeleitfähigkeit ist jedoch abhängig von der Höhe des osmotischen Druckes in der luminalen Pufferlösung. Bei gleicher Ausgangsleitfähigkeit fällt ΔG_t nach der Erhöhung auf 450 mosmol/l deutlich höher aus als bei 350 mosmol/l (siehe auch Abbildung 4.5).

Da sich nach 60 Minuten bereits die zeitabhängige Abnahme der Gewebeleitfähigkeit bemerkbar macht, ist bei einigen Epithelien $G_t(t = 60)$ kleiner als $G_t(t = 0)$ und somit $\Delta G_t(t = 60)$ negativ (Abbildung 4.4).

Abbildung 4.5 stellt den linearen Zusammenhang zwischen der Leitfähigkeitsveränderung und der Höhe des osmotischen Druckes in der mukosalen Pufferlösung dar.

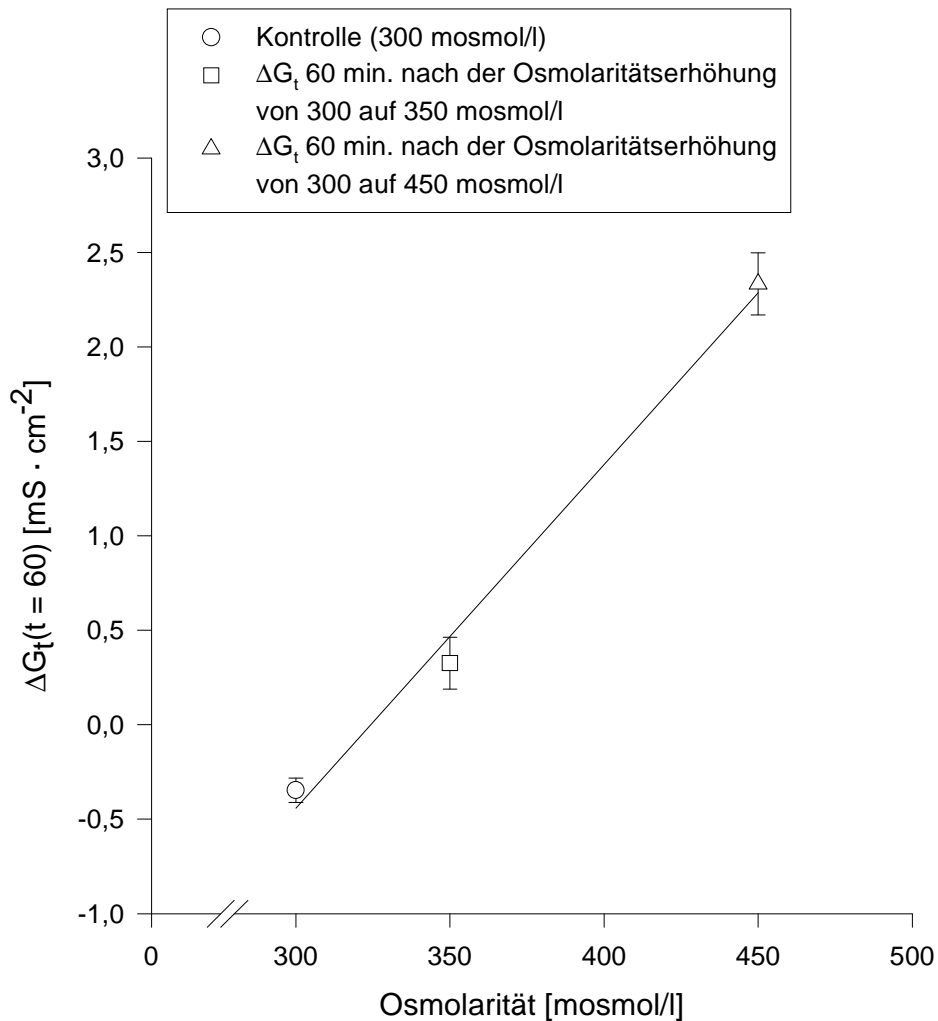


Abbildung 4.5: Leitfähigkeitsveränderung [$\Delta G_t(t = 60)$] 60 Minuten nach Erhöhung des osmotischen Druckes in der luminalen Pufferlösung in Abhängigkeit von der Osmolarität [Mittelwerte \pm SEM, N = 4, n = 16]. Die Regression wurde auf der Basis der Einzelwerte durchgeführt: $y = - 5,90 + (0,02 \cdot x)$, $r^2 = 0,83$, SEE = 0,52, $p < 0,0001$

4.1.1.2 Veränderung des Kurzschlußstromes (I_{sc}) in Abhängigkeit vom osmotischen Druck der mukosalen Pufferlösung

Abbildung 4.6 gibt die Auswirkungen des mukosal erhöhten osmotischen Druckes auf den Kurzschlußstrom wieder.

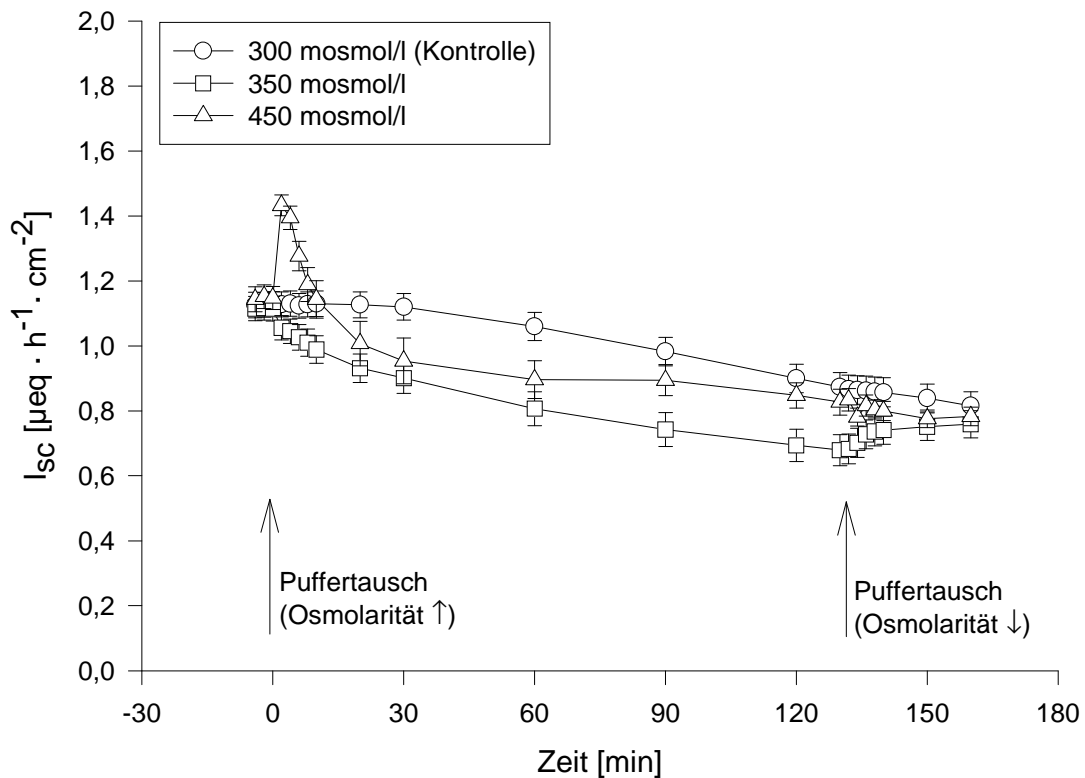


Abbildung 4.6: Veränderung des Kurzschlußstromes (I_{sc}) in Abhängigkeit vom osmotischen Druck in der mukosalen Pufferlösung (300, 350 und 450 mosmol/l). Die Erhöhung des osmotischen Druckes wurde durch Mannit vorgenommen. [Mittelwerte \pm SEM, N = 4, n = 16]

Bei den Epithelien der Kontrollgruppe, die während der gesamten Versuchszeit unter isoosmotischen Bedingungen (bei 300 mosmol/l) inkubiert wurden, ergibt sich nur eine geringe zeitabhängige Abnahme des Kurzschlußstromes (I_{sc}).

Dagegen ist unmittelbar nach der Erhöhung des osmotischen Druckes auf 450 mosmol/l für zwei Minuten ein signifikanter Anstieg des Kurzschlußstromes festzustellen [$p < 0,000,1$]. In den folgenden 20 Minuten fällt der Kurzschlußstrom in dieser Versuchsgruppe jedoch steil ab und

bleibt anschließend bis zur Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen relativ stabil, um dann geringfügig abzunehmen.

In der Behandlungsgruppe „350 mosmol/l“ ergibt sich direkt nach der Zugabe der hypertonen Lösung auf der luminalen Gewebeseite eine signifikante Abnahme des I_{sc} [$p < 0,0001$]. Der Kurzschlußstrom fällt in den folgenden 130 Minuten kontinuierlich ab. Erst die Beseitigung des osmotischen Gradienten bewirkt eine Zunahme des I_{sc} , die nach vier Minuten signifikant ist [$p = 0,0048$]. Während der gesamten Behandlungszeit (2. bis 130. Minute) ist der Kurzschlußstrom in dieser Behandlungsgruppe signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe [$p < 0,05$].

Vor der Osmolaritätserhöhung sowie nach der Wiederherstellung des isoosmotischen Zustandes können zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Behandlungsgruppen hinsichtlich des Kurzschlußstromes keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Für die durch Mannit bzw. durch die verschiedenen osmotischen Gradienten verursachten Veränderungen des Kurzschlußstromes gibt es zur Zeit noch keine Erklärung. Da diese Effekte für die übrigen Ergebnisse der Dissertation nicht von Bedeutung sind, wird der Kurzschlußstrom aus Gründen der Vollständigkeit zwar weiterhin aufgeführt, jedoch nicht näher erläutert.

4.1.2 Einfluß des osmotischen Druckes bzw. der Gewebeleitfähigkeit auf die Ionentransportraten über das isolierte Pansenepithel

Die durch den erhöhten osmotischen Druck bedingte Leitfähigkeitsveränderung kann transzellulär, parazellulär oder transzellulär und parazellulär bedingt sein.

Da die in der Ussing-Kammer gemessene Gewebeleitfähigkeit die Summe der zellulären Leitfähigkeit (G_c) und der Leitfähigkeit des parazellulären Passageweges (des shunts, G_s) ist ($G_t = G_c + G_s$), ist mittels der Ussing-Kammer-Methode zunächst keine genaue Lokalisierung der G_t -Veränderung möglich. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, daß ein großer Teil der Leitfähigkeitsveränderung die parazelluläre Leitfähigkeit betrifft. Hinweise dafür liegen im Institut für Veterinär-Physiologie der FU Berlin anhand von Versuchen mit Mikroelektroden vor, mit deren Hilfe die Teilwiderstände eines Epithels bestimmt werden können. Aus diesen Versuchen ist bisher bekannt, daß der parazelluläre Widerstand bei einer Erhöhung des osmotischen Druckes abnimmt und sich somit die Leitfähigkeit des parazellulären Passageweges erhöht (FREYER, Dissertation in Arbeit). Geringe Effekte auf die zelluläre Leitfähigkeit können jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

Die folgenden Versuche zur Bestimmung der unidirektionalen Fluxraten verschiedener Ionen wurden durchgeführt, um Informationen über die Lokalisierung der Leitfähigkeitsveränderung zu erhalten und um die Arbeitshypothese einer - durch den erhöhten osmotischen Druck bedingten - Zunahme der *parazellulären* Gewebeleitfähigkeit zu bestätigen.

4.1.2.1 Bestimmung der Transportraten von Chrom-EDTA

Um der Vermutung einer parazellulären Leitfähigkeitsveränderung nachzugehen, wurden die Passageraten von ^{51}Cr -EDTA in Abhängigkeit von der Leitfähigkeit bestimmt. ^{51}Cr -EDTA dient als Markersubstanz für den parazellulären Passageweg, da es aufgrund seines großen Molekulargewichtes transzellulär nicht transportiert wird. Die transepitheliale Passage dieses Moleküls erfolgt also ausschließlich parazellulär.

4.1.2.1.1 Chrom-EDTA-Fluxe und Gewebeleitfähigkeit in Abhängigkeit vom osmotischen Druck der luminalen Lösung

Zunächst wurden die Auswirkungen eines luminal erhöhten osmotischen Druckes und somit einer erhöhten Gewebeleitfähigkeit auf den Transport von $^{51}\text{Cr-EDTA}$ quantitativ erfaßt.

Nach der Äquilibrierung der Pansenepithelien im kurzgeschlossenen Zustand ($\text{PD}_t = 0 \text{ mV}$) unter isoosmotischen Bedingungen (300 mosmol/l beiderseits des Epithels) wurde der osmotische Druck in zwei Behandlungsgruppen auf der mukosalen Gewebeseite durch Mannit auf 350 bzw. 450 mosmol/l erhöht. Anschließend erfolgte die Zugabe von radioaktiv markiertem $^{51}\text{Cr-EDTA}$ und nach einer Adaptationszeit von 30 Minuten wurden zwei Fluxperioden (je 45 min) ermittelt. Tabelle 4.4 enthält die Werte, die für die unidirektionalen Chrom-EDTA-Fluxe sowie für die elektrophysiologischen Parameter ermittelt wurden (Mittelwerte aus den beiden Perioden).

Tabelle 4.4: Auswirkungen eines erhöhten osmotischen Druckes in der luminalen Lösung durch Mannit auf den Transport von $^{51}\text{Cr-EDTA}$ [Mittelwert \pm SEM, unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppen, $p < 0,05$]

Osmolarität [mosmol/l]	$J_{ms}^{\text{Cr}} *1$	$J_{sm}^{\text{Cr}} *1$	$J_{\text{net}}^{\text{Cr}} *1$	G_t [mS \cdot cm $^{-2}$]	$I_{sc} *2$	N/n
300 (Kontrolle)	$0,60 \pm 0,29^a$	$0,24 \pm 0,05^a$	$0,36 \pm 0,32$	$2,46 \pm 0,47^a$	$0,42 \pm 0,15^a$	3/5
350	$0,89 \pm 0,15^a$	$0,61 \pm 0,08^b$	$0,28 \pm 0,19$	$2,87 \pm 0,33^a$	$0,26 \pm 0,17^a$	3/6
450	$2,55 \pm 0,47^b$	$1,29 \pm 0,12^b$	$1,26 \pm 0,39$	$5,44 \pm 0,43^b$	$0,98 \pm 0,14^b$	3/6

*1 [nmol \cdot cm $^{-2}$ \cdot h $^{-1}$]

*2 [μeq \cdot cm $^{-2}$ \cdot h $^{-1}$]

Wie aus den Versuchen zur Elektrophysiologie (Kapitel Nr. 4.1.1.1) bekannt, ergibt sich in Abhängigkeit vom osmotischen Druck eine Erhöhung der Leitfähigkeit (G_t) [$p < 0,05$ zwischen Kontrolle und Versuchsgruppe „450 mosmol/l“]. Parallel dazu erhöhen sich die unidirektionalen $^{51}\text{Cr-EDTA}$ -Transportraten. Da J_{ms}^{Cr} größer als J_{sm}^{Cr} ist, resultiert ein Nettotransport von Chrom-EDTA in die serosale Richtung.

Um die Reversibilität der Effekte eines erhöhten osmotischen Gradienten zu prüfen, wurden nach Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen die Chromtransportraten und die elektrophysiologischen Parameter über zwei Fluxperioden erneut ermittelt. Wie in Tabelle 4.5 zu erkennen ist, können zwischen der Kontrollgruppe und den beiden vorbehandelten Gruppen keine signifikanten Unterschiede mehr festgestellt werden.

Tabelle 4.5: Chromtransport unter Kontrollbedingungen (300 mosmol/l) nach unterschiedlicher osmotischer Vorbehandlung [Mittelwert \pm SEM, keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppen mehr nachzuweisen]

Vorbehandlung (osmotischer Druck in mosmol/l)	$J_{ms}^{Cr} *1$	$J_{sm}^{Cr} *1$	$J_{net}^{Cr} *1$	G_t [mS \cdot cm ⁻²]	$I_{sc} *2$	N/n
300 (Kontrolle)	0,75 \pm 0,32	0,42 \pm 0,07	0,33 \pm 0,39	2,71 \pm 0,43	0,35 \pm 0,15	3/5
350	0,56 \pm 0,16	0,47 \pm 0,06	0,09 \pm 0,13	2,23 \pm 0,21	0,36 \pm 0,17	3/6
450	0,83 \pm 0,16	0,67 \pm 0,09	0,15 \pm 0,09	2,76 \pm 0,31	0,71 \pm 0,10	3/6

*1 [nmol \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹]

*2 [μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹]

Die unidirektionalen Transportraten von ⁵¹Cr-EDTA sind in Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8 in Abhängigkeit von der Gewebeleitfähigkeit dargestellt. Da beide unidirektionalen Chromfluxe linear mit der Erhöhung der Leitfähigkeit zunehmen und eng mit der Leitfähigkeit korrelieren, wird deutlich, daß die Veränderung von G_t überwiegend parazellulär bedingt ist. Weil Chrom-EDTA ausschließlich parazellulär und somit passiv transportiert wird und passive Transportprozesse (Diffusionsprozesse) linearen Gesetzmäßigkeiten folgen, sind die unidirektionalen Fluxraten linear proportional zum osmotischen Gradienten bzw. zur Gewebeleitfähigkeit.

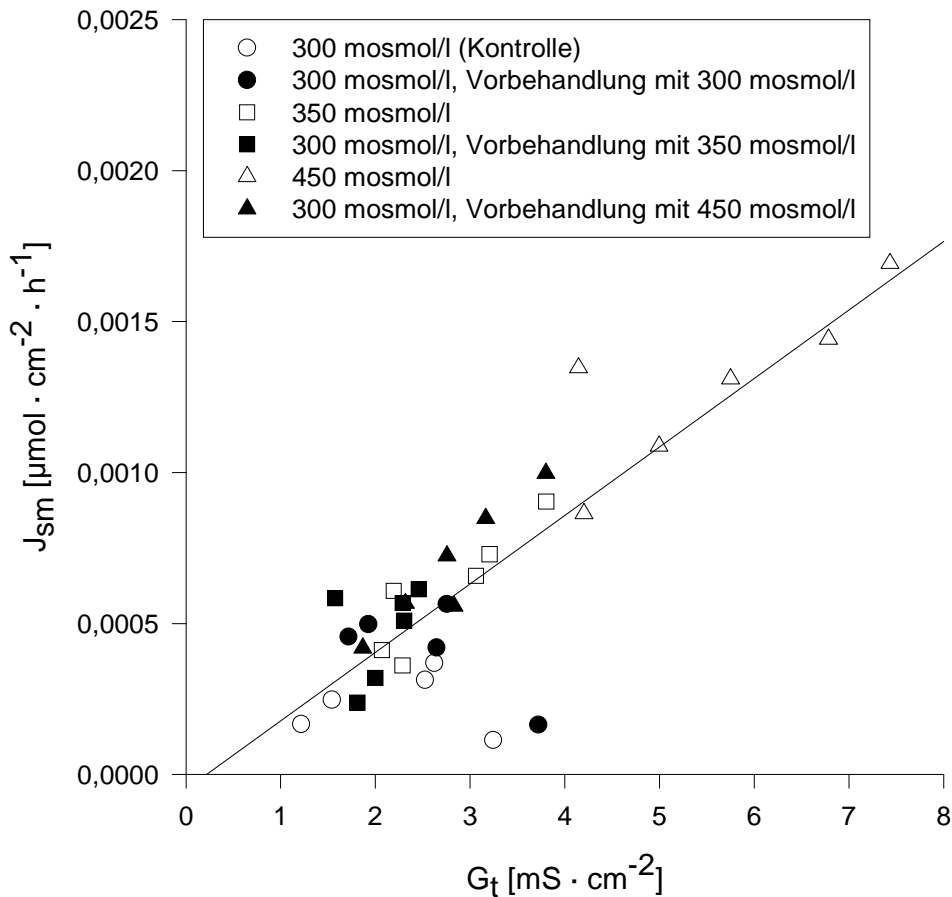


Abbildung 4.7: J_{sm}^{Cr} in Abhängigkeit von der Gewebeleitfähigkeit (G_t); Darstellung der über die beiden Fluxperioden gemittelten Werte für die einzelnen Epithelien [N = 3, n bei 300 mosmol/l = 5, n bei 350 und 450 mosmol/l = 6]. Die verschiedenen unausgefüllten Symbole kennzeichnen die drei Versuchsgruppen (300 = Kontrolle, 350 und 450 mosmol/l). Die entsprechenden schwarzen Symbole stellen diese drei Gruppen nach der Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen bei 300 mosmol/l dar. Es wurde allen Werten eine Regressionsgerade angepaßt: $y = -0,00005 + (0,0002 \cdot x)$, $r^2 = 0,73$, SEE = 0,0002, $p < 0,0001$

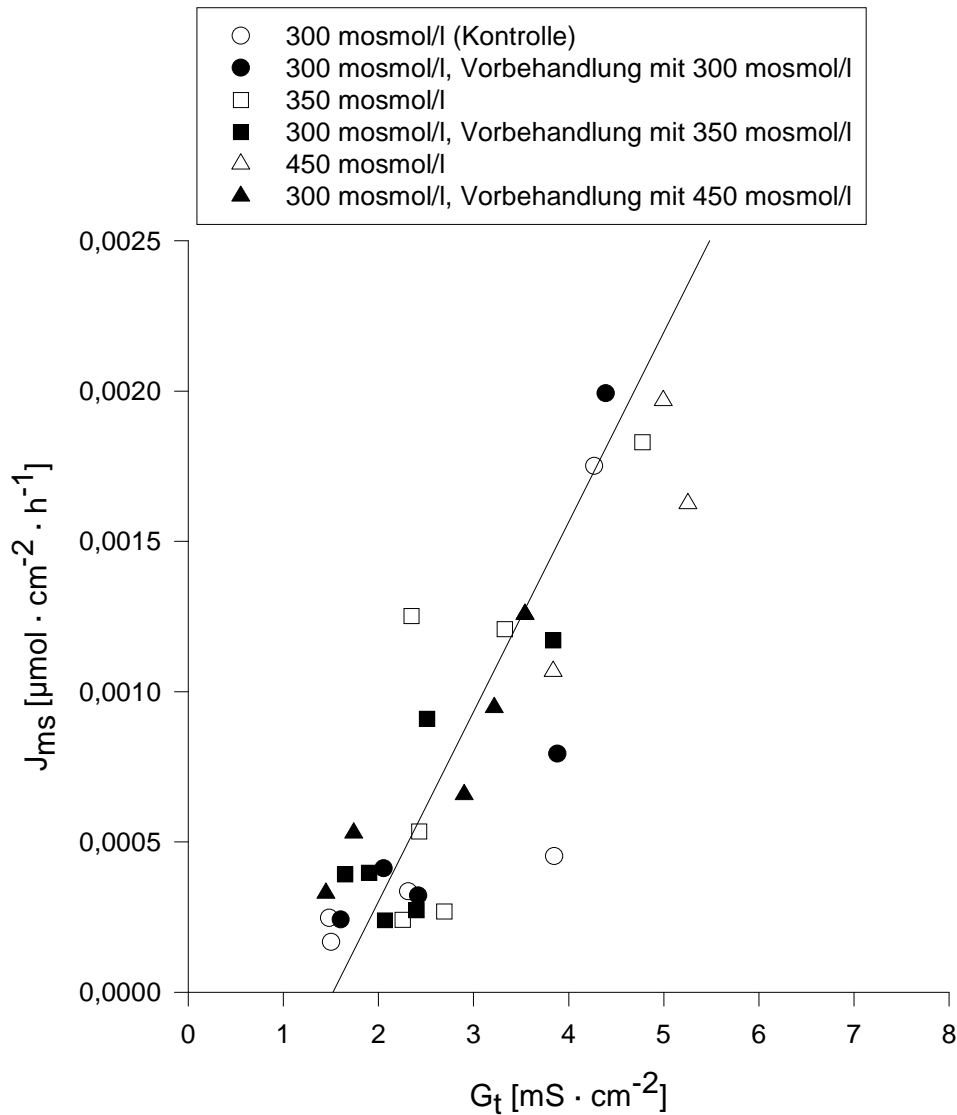


Abbildung 4.8: J_{ms}^{Cr} in Abhängigkeit von der Gewebeleitfähigkeit (G_t); Darstellung der über die beiden Fluxperioden gemittelten Werte für die einzelnen Epithelien [N = 3, n bei 300 mosmol/l = 5, n bei 350 und 450 mosmol/l = 6]. Die verschiedenen unausgefüllten Symbole kennzeichnen die drei Versuchsgruppen (300 = Kontrolle, 350 und 450 mosmol/l). Die entsprechenden schwarzen Symbole stellen diese drei Gruppen nach der Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen bei 300 mosmol/l dar. Es wurde allen Werten eine Regressionsgerade angepaßt: $y = -0,001 + (0,0006 \cdot x)$, $r^2 = 0,81$, $SEE = 0,0004$, $p < 0,0001$

Der statistische Vergleich der beiden Regressionsgeraden (Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8) mit Hilfe des t-Tests nach Student ergibt signifikante Unterschiede sowohl der Schnittpunkte mit der Ordinate als auch der Steigungen der Geraden [$p < 0,0001$].

Da ^{51}Cr -EDTA nur parazellulär transportiert wird, müßten die beiden entgegengerichteten Transportraten von Chrom-EDTA bei einem fehlenden elektrochemischen Gradienten gleich groß sein. Auf den hier beobachteten sogenannten asymmetrischen Effekt der Fluxe wird im Diskussionsteil dieser Arbeit näher eingegangen.

4.1.2.2 Bestimmung der Natriumtransportraten

Natrium ist neben Kalium das wichtigste Kation in der Vormagenflüssigkeit. Es wird in großen Mengen mit dem Speichel sezerniert und gelangt anschließend in die Vormagenabteilungen. Aufgrund der aktiven Natriumresorption ist die Natriumkonzentration im Blutserum (serosal) höher als im Pansenlumen. Intrazellulär wird die Natriumkonzentration durch die basolaterale Na^+ - K^+ -ATPase, die drei Natriumionen im Austausch gegen zwei Kaliumionen aus der Zelle transportiert, niedrig gehalten.

Da In-vitro-Untersuchungen über den Natriumtransport in Abhängigkeit vom osmotischen Druck nicht vorliegen, wurden die Natriumtransportraten bestimmt.

4.1.2.2.1 Natriumtransportraten und Gewebeleitfähigkeit in Abhängigkeit vom osmotischen Druck der luminalen Lösung

Die bisherigen Versuchsergebnisse zeigen, daß die durch die Hyperosmolarität induzierte Erhöhung der Gewebeleitfähigkeit überwiegend parazellulär bedingt ist. Um festzustellen, inwieweit zusätzlich zelluläre Effekte vorhanden sind, wurde die Auswirkung von Mannit auf den Natriumtransport untersucht. Hierfür wurde bei unveränderter Elektrolytkonzentration der osmotische Druck in der luminalen Lösung durch Zugabe von Mannit wieder auf 350 bzw. 450 mosmol/l erhöht. Anschließend wurde radioaktiv markiertes $^{22}\text{Na}^+$ hinzugegeben, und nach erneuter Äquilibration der Gewebe wurden die Transportraten für Natrium über drei Fluxperioden (je 30 min) bestimmt und pro Epithel gemittelt (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Auswirkungen eines erhöhten osmotischen Druckes der luminalen Lösung durch Mannit auf den Natriumtransport [Mittelwert \pm SEM, unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Behandlungsgruppen, $p < 0,05$]

Osmolarität [mosmol/l]	$J_{ms}^{Na} *$	$J_{sm}^{Na} *$	$J_{net}^{Na} *$	G_t [mS \cdot cm ⁻²]	$I_{sc} *$	N/n
300 (Kontrolle)	2,51 \pm 0,13	1,05 \pm 0,06 ^a	1,46 \pm 0,15 ^a	2,42 \pm 0,11 ^a	0,95 \pm 0,05	4/7
350	2,18 \pm 0,30	1,51 \pm 0,21 ^b	0,68 \pm 0,28 ^b	3,46 \pm 0,43 ^b	0,73 \pm 0,07	4/7
450	2,36 \pm 0,22	1,98 \pm 0,08 ^b	0,38 \pm 0,26 ^b	4,96 \pm 0,24 ^b	0,88 \pm 0,06	4/8

* [$\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]

Auch hier ist wieder in Abhängigkeit vom osmotischen Druck ein signifikanter Anstieg der Leitfähigkeit (G_t) festzustellen [$p < 0,05$ zwischen Kontrolle und Behandlung]. Parallel dazu erhöht sich der Natriumtransport von der serosalen zur mukosalen Seite (J_{sm}^{Na}). Weil der Natriumtransport von der mukosalen zur serosalen Seite (J_{ms}^{Na}) nicht entsprechend zunimmt, ergibt sich eine erhebliche und signifikante Reduzierung der Nettoresorption (J_{net}^{Na}) von 1,46 auf 0,38 $\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Da J_{sm}^{Na} linear mit der G_t korreliert (Abbildung 4.9), wird bestätigt, daß die Veränderung der Gewebeleitfähigkeit zum großen Teil parazellulär lokalisiert ist und somit den passiven, parazellulären Natriumtransport von der serosalen zur mukosalen Seite erhöht.

Wenn sich die Effekte einer Erhöhung des osmotischen Druckes allein auf die parazelluläre Leitfähigkeit beschränken würden, müßte sich unter den gewählten Versuchsbedingungen, also bei einem fehlenden elektrochemischen Gradienten, J_{ms}^{Na} um den gleichen Betrag wie J_{sm}^{Na} erhöhen. Die Versuchsergebnisse deuten jedoch eine Verringerung von J_{ms}^{Na} an, was auf eine Störung des aktiven transzellulären Natriumtransportes schließen läßt. Die Bestimmung der Natriumtransportraten (zwei halbstündige Perioden) nach der Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen bei 300 mosmol/l unterstützt diese Schlußfolgerung (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: Natriumtransport unter Kontrollbedingungen (300 mosmol/l) nach unterschiedlicher osmotischer Vorbehandlung [Mittelwert \pm SEM, es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Behandlungsgruppen mehr festgestellt]

Vorbehandlung (osmotischer Druck in mosmol/l)	$J_{ms}^{Na} *$	$J_{sm}^{Na} *$	$J_{net}^{Na} *$	G_t [mS \cdot cm ⁻²]	$I_{sc} *$	N/n
300 (Kontrolle)	2,48 \pm 0,15	1,14 \pm 0,09	1,34 \pm 0,22	2,39 \pm 0,16	0,76 \pm 0,05	4/7
350	2,40 \pm 0,24	1,17 \pm 0,16	1,24 \pm 0,18	2,41 \pm 0,33	0,77 \pm 0,07	4/7
450	2,09 \pm 0,17	1,11 \pm 0,06	0,98 \pm 0,13	2,60 \pm 0,14	0,83 \pm 0,03	4/8

* [μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹]

Die Beseitigung des osmotischen Gradienten bewirkt eine Normalisierung von G_t und von J_{sm}^{Na} . Zwischen Kontrolle und Behandlung bestehen bei diesen Parametern keine Unterschiede mehr. Dagegen normalisiert sich J_{ms}^{Na} nach einer Vorbehandlung mit 450 mosmol/l nicht. Die vermutete Störung des aktiven Natriumtransportes wird demnach innerhalb von 60 Minuten nicht vollständig beseitigt; die verursachte Hemmung bleibt offensichtlich bestehen.

Abbildung 4.9 zeigt J_{sm}^{Na} in Abhängigkeit von G_t .

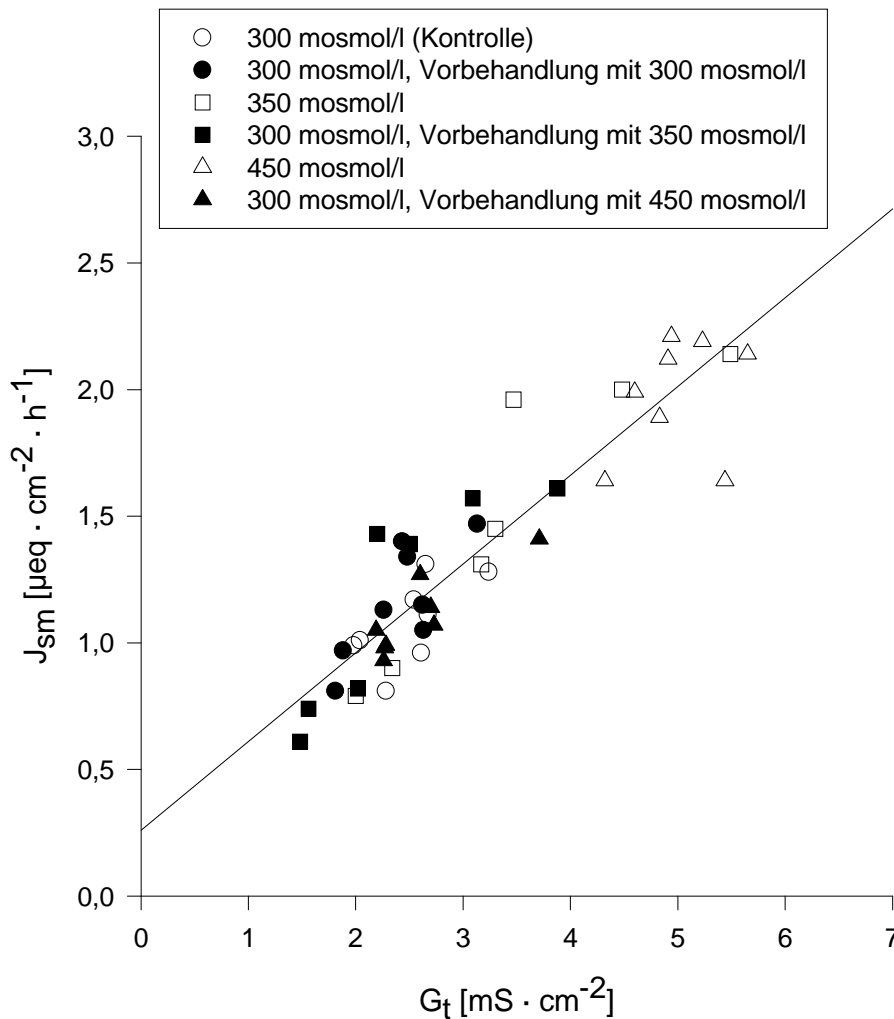


Abbildung 4.9: J_{sm}^{Na} in Abhängigkeit von der Gewebeleitfähigkeit (G_t); Darstellung der über die drei Fluxperioden gemittelten Werte für die einzelnen Epithelien [$N = 4$, n bei 300 und 450 mosmol/l = 8, n bei 350 mosmol/l = 7]. Die verschiedenen unausgefüllten Symbole kennzeichnen die drei Versuchsgruppen (300 = Kontrolle, 350 und 450 mosmol/l). Die entsprechenden schwarzen Symbole stellen diese drei Gruppen nach der Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen bei 300 mosmol/l dar. Es wurde allen Werten eine Regressionsgerade angepaßt: $y = 0,26 + (0,35 \cdot x)$, $r^2 = 0,84$, $SEE = 0,18$, $p < 0,0001$

Die enge Korrelation zwischen J_{sm}^{Na} und G_t läßt die Schlußfolgerung zu, daß zumindest ein Teil der G_t -Veränderung parazellulär lokalisiert ist und dadurch den passiven Natriumtransport von der serosalen zur mukosalen Seite erhöht.

J_{ms}^{Na} setzt sich aus zwei parallelen Komponenten zusammen: der transzellulären Komponente (ein aktiver Transport) und der parazellulären Komponente (ein passiver Transport). Der erhöhte osmotische Druck bewirkt wahrscheinlich eine Hemmung des aktiven transzellulären Natriumtransportes und gleichzeitig die Zunahme des passiven, parazellulären Transportes von Natrium über eine Steigerung der Durchlässigkeit des parazellulären Passageweges. Da diese beiden Effekte nebeneinander vorliegen, besteht zwischen J_{ms}^{Na} und G_t kein linearer Zusammenhang.

Abbildung 4.10 stellt J_{sm}^{Na} für die verschiedenen Behandlungsgruppen über den Zeitraum von fünf Fluxperioden dar. Die Fluxperioden 1 bis 3 wurden bei luminal erhöhtem osmotischen Druck und die Fluxperioden 4 und 5 nach dem Pufferwechsel unter isoosmotischen Bedingungen bestimmt.

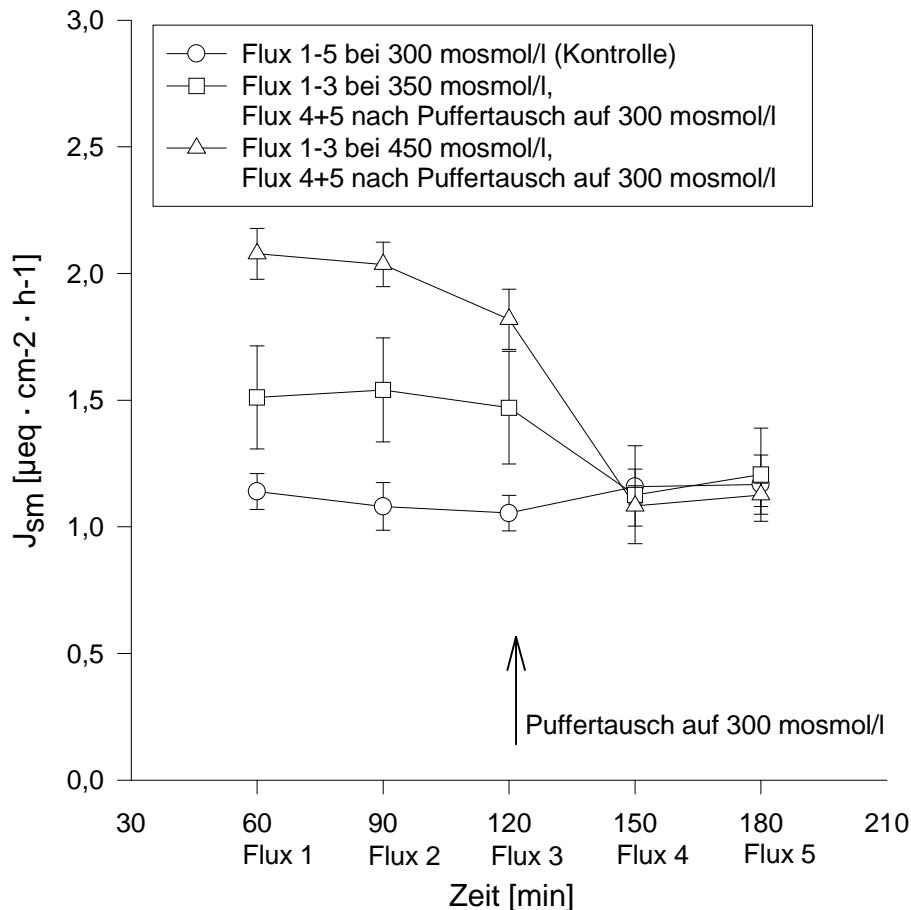


Abbildung 4.10: Darstellung der Fluxperioden für J_{sm}^{Na} im zeitlichen Verlauf unter Berücksichtigung des osmotischen Druckes. Die Fluxe 1 bis 3 wurden bei luminal erhöhtem osmotischen Druck bestimmt, die Fluxe 4 und 5 nach dem Pufferwechsel unter isoosmotischen Bedingungen (300 mosmol/l) [Mittelwerte \pm SEM, N = 4, n bei 300 und 450 mosmol/l = 8, n bei 350 mosmol/l = 7]

Die ersten drei Fluxperioden weisen in jeder Behandlungsgruppe relativ konstante Fluxraten bzw. eine nur geringe zeitabhängige Abnahme des Natriumfluxes auf. Zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Behandlungsgruppen sind deutliche Unterschiede der Transportraten zu erkennen [$p < 0,05$]. Nach der Wiederherstellung isoosmotischer Verhältnisse

(Fluxe 4 und 5) können statistisch keine Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppen hinsichtlich der Natriumtransportraten mehr festgestellt werden.

4.1.2.2 Einfluß von Amilorid auf die Natriumtransportraten unter Berücksichtigung des osmotischen Druckes

Die bisherigen Versuchsergebnisse deuten darauf hin, daß ein erhöhter osmotischer Druck eine Hemmung des aktiven transzellulären Natriumtransportes verursacht. Für Natrium existiert am Pansenepithel über einen Na^+/H^+ -Austauscher ein elektroneutraler Transportmechanismus (MARTENS et al., 1991). Amilorid ist in einer Konzentration von $> 10^{-6}$ mol/l ein spezifischer Hemmstoff des Na^+/H^+ -Austauschers (BENOS, 1982). Durch den Einsatz von Amilorid bei unterschiedlichen osmotischen Bedingungen soll geprüft werden, inwieweit dieser Hemmstoff bzw. bereits der erhöhte osmotische Druck negative Auswirkungen auf den zellulären Natriumtransport hat. Hierfür wurden in Abhängigkeit vom osmotischen Druck der luminalen Pufferlösung zwei Gruppen gebildet (300 mosmol/l = Kontrolle und 450 mosmol/l). Jeweils eine Hälfte jeder Gruppe wurde mukosal mit 1mmol/l Amilorid behandelt, der anderen Hälfte wurde nur das Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) zugesetzt. 20 Minuten nach der Zugabe des Hemmstoffes wurden die Transportraten und die elektrophysiologischen Parameter über drei Fluxperioden bestimmt und die Werte gemittelt (Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: Einfluß von Amilorid auf die Natriumtransportraten unter Berücksichtigung des osmotischen Druckes in der mukosalen Pufferlösung [Mittelwert ± SEM, unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte - bei gleichem osmotischen Druck - kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen „mit/ohne Amilorid“, $p < 0,05$]

Osmolarität [mosmol/l]	mit/ohne Amilorid	$J_{ms}^{Na} *$	$J_{sm}^{Na} *$	$J_{net}^{Na} *$	G_t [mS · cm ⁻²]	$I_{sc} *$	N/n
300	ohne Amilorid	3,51 ± 0,62 ^a	1,26 ± 0,37	2,25 ± 0,35 ^a	2,39 ± 0,31	0,66 ± 0,13	4/4
300	mit Amilorid	1,72 ± 0,18 ^b	1,08 ± 0,22	0,64 ± 0,11 ^b	2,52 ± 0,30	0,64 ± 0,15	3/6
450	ohne Amilorid	3,07 ± 0,52	1,54 ± 0,14	1,53 ± 0,40	3,58 ± 0,33 ^a	0,63 ± 0,21	4/4
450	mit Amilorid	2,98 ± 0,12	1,84 ± 0,32	1,14 ± 0,25	4,55 ± 0,16 ^b	0,86 ± 0,09	3/5

* [µeq · cm⁻² · h⁻¹]

Amilorid verursacht bei einer Osmolarität von 300 mosmol/l eine signifikante Abnahme von J_{ms}^{Na} und auch von J_{net}^{Na} . J_{sm}^{Na} , G_t und I_{sc} werden nicht beeinflusst. Bei einem osmotischen Druck von 450 mosmol/l hat Amilorid keinen Einfluß auf die Natriumtransportraten und den Kurzschlußstrom. Es ist lediglich eine signifikante Erhöhung von G_t festzustellen, die jedoch eher auf Epithelunterschiede als auf einen Effekt durch Amilorid zurückzuführen ist. Der elektroneutrale transzelluläre Natriumtransport wird demnach bereits durch den erhöhten osmotischen Druck gestört, so daß die Zugabe von Amilorid bei diesem osmotischen Druck keinen Effekt mehr hat. Der Kurzschlußstrom und damit der elektrogene Natriumtransport wird in beiden Gruppen nicht durch Amilorid beeinflusst.

Bei der Durchführung dieser Versuchsreihe wurden, abweichend von allen anderen Versuchen, bikarbonathaltige Pufferlösungen eingesetzt (siehe Kapitel Nr. 9.1.3), um die Effekte des Amilorids auf den elektroneutralen, transzellulären, mukoserosalen Natriumtransport (J_{ms}^{Na}) deutlicher darzustellen. Bikarbonat erhöht über das indirekt gekoppelte Austauschersystem Na^+/H^+ und Cl^-/HCO_3^- den elektroneutralen transzellulären Natriumtransport in die serosale Richtung. Aus diesem Grund fallen J_{ms}^{Na} und J_{net}^{Na} bei 300 und 450 mosmol/l (ohne Behandlung

mit Amilorid) deutlich höher aus als in den Versuchen Kapitel Nr. 4.1.2.2.1 (Tabelle 4.6), in denen bikarbonatfreie Inkubationslösungen verwendet wurden.

4.1.2.2.3 Einfluß von Ouabain auf die Natriumtransportraten unter Berücksichtigung des osmotischen Druckes

In einer weiteren Versuchsserie wird der Einfluß von Ouabain, einem Hemmstoff der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase, auf die Natriumtransportraten untersucht. Die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase schleust am Pansenepithel durch die hydrolytische Spaltung von ATP Natrium aktiv im Austausch gegen Kalium aus der Zelle aus und hält dadurch einen Konzentrationsgradienten für Natrium über der basolateralen und apikalen Zellmembran aufrecht ($[\text{Na}^+]_{\text{außen}} > [\text{Na}^+]_{\text{innen}}$).

Die unidirektionalen Natriumtransportraten wurden nach Zugabe von 0,1 mmol/l Ouabain in die serosale Pufferlösung unter Kurzschlußbedingungen bei 300 mosmol/l (Kontrolle) und bei 450 mosmol/l bestimmt. Da Ouabain den aktiven transzellulären Transport von Natrium vollständig hemmt, stellen die unidirektionalen Ionenfluxe den parazellulären und passiven Natriumtransport dar.

Bei einem ausschließlich parazellulären Transport und einem fehlenden elektrochemischen Gradienten erhöht sich $J_{\text{ms}}^{\text{Na}}$ in Abhängigkeit vom osmotischen Druck bzw. von der Gewebeleitfähigkeit um den gleichen Betrag wie $J_{\text{sm}}^{\text{Na}}$ (Abbildung 4.11). Der Einsatz von Ouabain bestätigt somit, daß die durch den osmotischen Druck bedingte Zunahme der Gewebeleitfähigkeit überwiegend durch eine Erhöhung der parazellulären Leitfähigkeit zustande kommt.

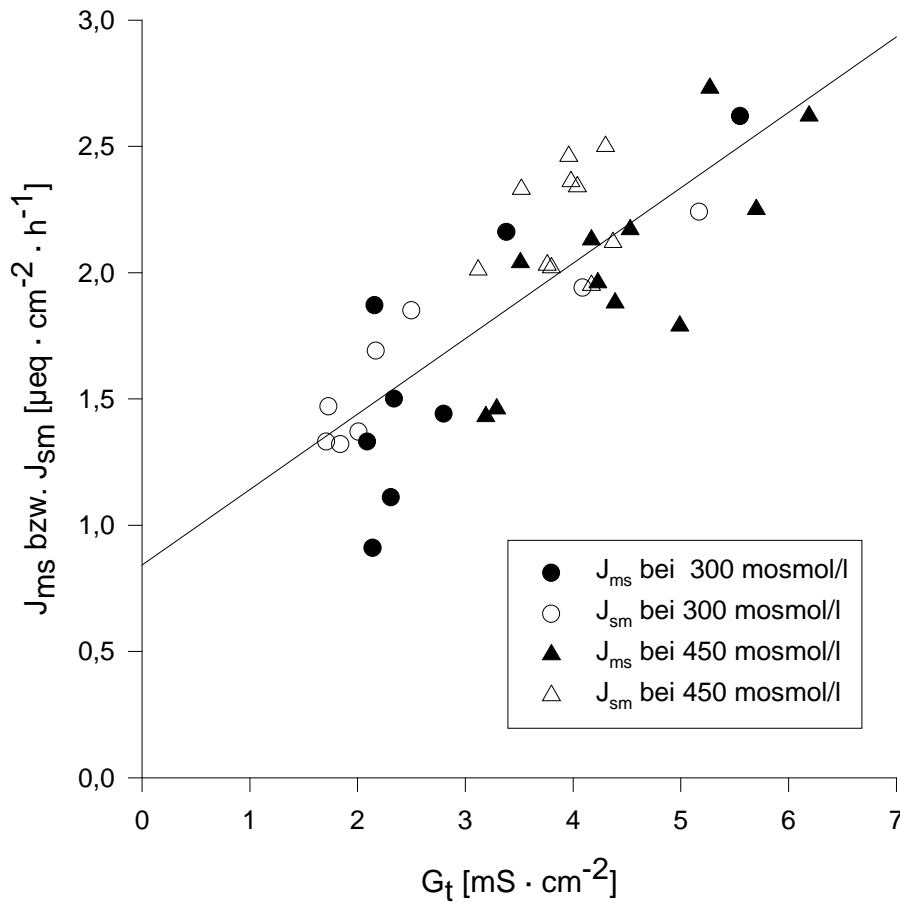


Abbildung 4.11: Unidirektionale Natriumfluxe unter dem Einfluß von Ouabain bei 300 und 450 mosmol/l in Abhängigkeit von G_t ; Darstellung der Fluxraten pro Epithel [N = 4, n bei 300 mosmol/l für J_{ms}^{Na} und für $J_{sm}^{Na} = 8$, n bei 450 mosmol/l für $J_{ms}^{Na} = 11$ und für $J_{sm}^{Na} = 10$]. Es wurde allen Daten eine Regression angepaßt: $y = 0,84 + (0,3 \cdot x)$, $r^2 = 0,64$, SEE = 0,28, $p < 0,0001$

4.1.2.2.4 Natriumtransportraten in Abhängigkeit vom osmotischen Druck und von der transepithelialen Potentialdifferenz (PD_t)

Die bisherigen Versuchsergebnisse lassen die Vermutung zu, daß die durch den osmotischen Druck bedingte Leitfähigkeitsveränderung überwiegend die parazelluläre Leitfähigkeit betrifft.

Zur genaueren Differenzierung der parazellulären und transzellulären Fluxanteile wurden die Natriumtransportraten bei unterschiedlichen transepithelialen Potentialdifferenzen bestimmt. Hierfür wurden die Epithelpaare beider Versuchsgruppen (300 und 450 mosmol/l) in zufälliger Reihenfolge jeweils für 45 Minuten auf drei verschiedene transepitheliale Potentialdifferenzen (PD_t) geklemmt (+ 40 mV, 0 mV, - 40 mV). Diese Klemmversuche basieren

auf einem von FRIZZEL und SCHULTZ (1972) entwickelten Modell, in dem die PD_t -unabhängige Komponente eines Ionenfluxes elektroneutral und somit an zelluläre Transportmechanismen gebunden ist (= transzellulär), während die durch die PD_t beeinflussbare Komponente den elektrogenen Anteil des Fluxes darstellt (= parazellulär und/oder transzellulär).

Die PD_t -unabhängigen und -abhängigen Fluxanteile lassen sich aus den ermittelten Transportraten und den zugehörigen Werten für ξ mit Hilfe der Formel von FRIZZEL und SCHULTZ (1972), modifiziert nach JACKSON und NORRIS (1985), (siehe Kapitel Nr. 3.9.2) errechnen:

$$J_{sm}^{Na} \text{ bei } 450 \text{ mosmol/l} = 0,52 (\pm 0,22) + \xi \cdot 1,32 (\pm 0,17) \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1},$$
$$r^2 = 0,7, \text{ SEE} = 0,55, p < 0,0001$$

$$J_{sm}^{Na} \text{ bei } 300 \text{ mosmol/l} = 0,44 (\pm 0,19) + \xi \cdot 0,7 (\pm 0,15) \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1},$$
$$r^2 = 0,64, \text{ SEE} = 0,36, p = 0,0004$$

$$J_{ms}^{Na} \text{ bei } 450 \text{ mosmol/l} = 0,52 (\pm 0,33) + \xi \cdot 2,65 (\pm 0,26) \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1},$$
$$r^2 = 0,81, \text{ SEE} = 0,82, p < 0,0001$$

$$J_{ms}^{Na} \text{ bei } 300 \text{ mosmol/l} = 1,58 (\pm 0,33) + \xi \cdot 1,15 (\pm 0,26) \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1},$$
$$r^2 = 0,61, \text{ SEE} = 0,62, p = 0,0006$$

Diese Regressionsgleichungen sind in Abbildung 4.12 grafisch dargestellt. Die Steigungen der Regressionsgeraden stellen das Maß für die PD_t -abhängigen, elektrogenen Fluxanteile ($J_d \cdot \xi$) dar, die mit ξ variieren, während die Schnittpunkte mit der y-Achse den PD_t -unabhängigen Anteilen (J_m) entsprechen.

Bei einem osmotischen Druck von 300 mosmol/l wird Natrium überwiegend elektroneutral und transzellulär in mukoserosaler Richtung transportiert. Durch eine Erhöhung des osmotischen Druckes auf 450 mosmol/l wird der PD_t -unabhängige, transzelluläre Anteil des ms-Fluxes gehemmt, Natrium wird überwiegend parazellulär transportiert.

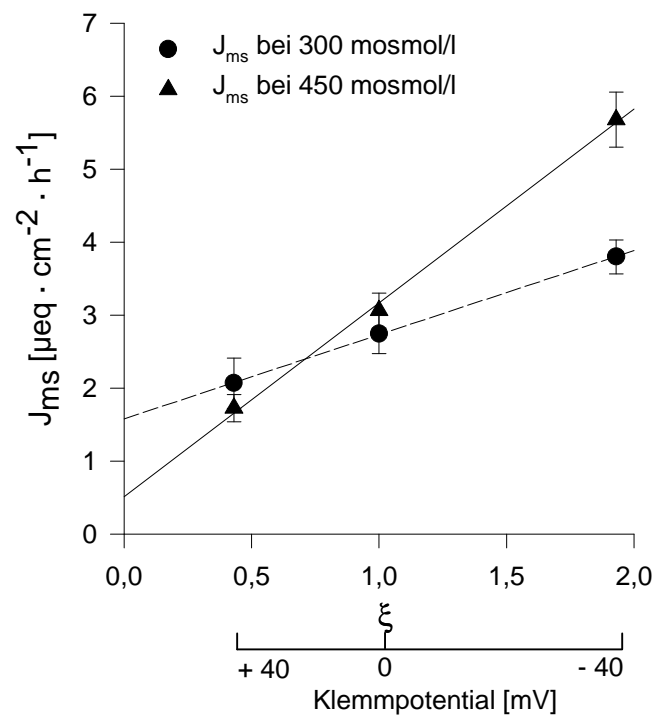
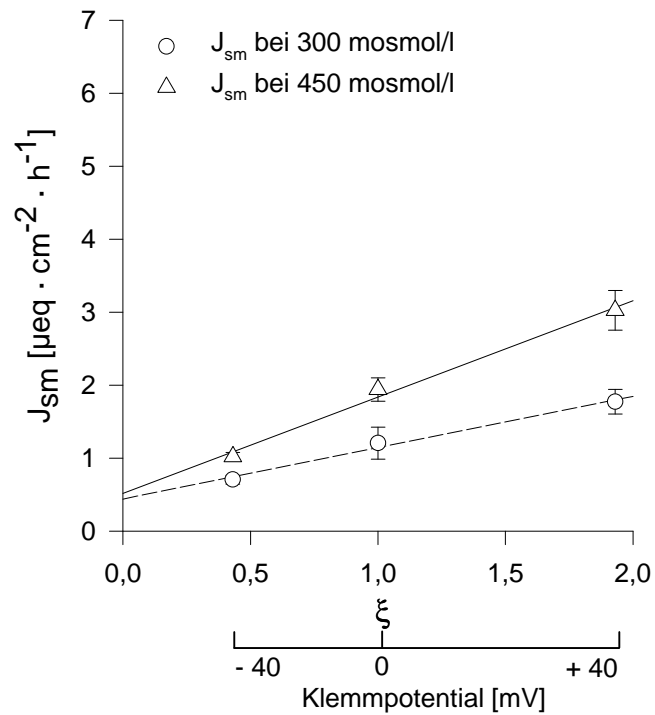


Abbildung 4.12: Darstellung der unidirektionalen Natriumfluxe (J_{sm}^{Na} und J_{ms}^{Na}) in Abhängigkeit vom osmotischen Druck und von ξ bzw. vom Klemmpotential [Mittelwert \pm SEM, bei 300 mosmol/l (Kontrolle): N = 3, n = 5, bei 450 mosmol/l: N = 4, n = 9; Regressionsgleichungen und statistische Beschreibung siehe Text]

Die Erhöhung des osmotischen Druckes von 300 auf 450 mosmol/l verursacht einen signifikanten Anstieg des PD_t -abhängigen Anteils des seromukosalen Natriumtransportes [$p = 0,0146$]. Der elektroneutrale Anteil des sm-Fluxes wird kaum beeinflusst [$p = 0,6851$]. Dagegen bewirkt der erhöhte osmotische Druck bei dem mukoserosalen Natriumtransport zwar ebenfalls eine signifikante Zunahme des PD_t -abhängigen Anteils [$p = 0,0001$], der PD_t -unabhängige, transzelluläre Anteil des ms-Fluxes wird jedoch signifikant reduziert [$p = 0,0163$].

Die lineare Abhängigkeit der unidirektionalen Fluxes von dem Klemmpotential läßt sich auf die zunehmende elektrische Triebkraft über den parazellulären Passageweg zurückführen, die bei einem osmotischen Druck von 450 mosmol/l noch verstärkt wird. Durch diese Klemmversuche wird die Annahme bestätigt, daß durch die Erhöhung des osmotischen Druckes die parazelluläre Leitfähigkeit ansteigt, während der transzelluläre Natriumtransport gehemmt wird.

Tabelle 4.9 gibt die ermittelten Natriumtransportraten und die Gewebeleitfähigkeit bei den verschiedenen osmotischen Zuständen unter Kurzschlußbedingungen und bei einer physiologischen transepithelialen Potentialdifferenz von + 40 mV wieder.

Tabelle 4.9: Natriumtransportraten in Abhängigkeit von dem osmotischen Druck und von der transepithelialen Potentialdifferenz [Mittelwert ± SEM]

Osmotischer Druck [mosmol/l]	Klemmpotential [mV]	$J_{ms}^{Na} *$	$J_{sm}^{Na} *$	$J_{net}^{Na} *$	G_t [mS · cm ⁻²]	N/n
300 (Kontrolle)	0	2,75 ± 0,27 ^c	1,21 ± 0,22 ^{a c}	1,54 ± 0,26 ^c	2,99 ± 0,42 ^a	3/5
450	0	3,06 ± 0,24 ^e	1,94 ± 0,16 ^{b e}	1,12 ± 0,17 ^e	5,08 ± 0,51 ^{b e}	4/9
300 (Kontrolle)	40	2,07 ± 0,34 ^d	1,77 ± 0,17 ^{a d}	0,29 ± 0,37 ^{a d}	2,71 ± 0,28 ^a	3/5
450	40	1,73 ± 0,19 ^f	3,03 ± 0,27 ^{b f}	-1,30 ± 0,29 ^{b f}	4,68 ± 0,46 ^{b f}	4/9

* [μeq · cm⁻² · h⁻¹]

a/b: signifikanter Unterschied zur entsprechenden Kontrolle bei gleichem Klemmpotential [p < 0,05]

c/d: signifikanter Unterschied in der Kontrollgruppe bei verschiedenen Klemmpotentialen [p < 0,05]

e/f: signifikanter Unterschied in der Versuchsgruppe „450 mosmol/l“ bei verschiedenen Klemmpotentialen [für J_{ms} und J_{net} : p < 0,0001, für J_{sm} und G_t : p < 0,05]

Die Steigerung der PD_t von 0 auf + 40 mV führt in der Kontrollgruppe (300 mosmol/l) und in der Behandlungsgruppe (450 mosmol/l) aufgrund einer signifikanten Verminderung des ms-Fluxes bei einem gleichzeitigen signifikanten Anstieg des sm-Fluxes zu einer signifikanten Abnahme des Nettonatriumtransportes. Aus den aufgeführten Daten geht hervor, daß bei einer Erhöhung des osmotischen Druckes unter Kurzschlußbedingungen die Nettoresorption von Natrium abnimmt. Bei einer physiologischen Potentialdifferenz von + 40 mV verursacht ein erhöhter osmotischer Druck sogar eine Nettosekretion von Natrium.

4.1.2.3 Bestimmung der Chloridtransportraten

Die vorherigen Ergebnisse (Kapitel Nr. 4.1.2.2.4) zeigen deutlich, daß eine Erhöhung des osmotischen Druckes zu einer Reduzierung des aktiven transzellulären Natriumtransportes führt. Durch zahlreiche In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen ist bekannt, daß Natrium am Pansenepithel über einen Na^+/H^+ -Austauscher resorbiert wird, der an einen parallel arbeitenden $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher gekoppelt ist (CHIEN und STEVENS, 1972, GÄBEL et al., 1991b, MARTENS et al., 1991). In dieser Versuchsreihe soll daher geprüft werden, ob auch die Transportraten von Chlorid durch den osmotischen Druck und die transepitheliale Potentialdifferenz beeinflußt werden.

4.1.2.3.1 Chloridtransportraten und Gewebeleitfähigkeit in Abhängigkeit vom osmotischen Druck der luminalen Lösung

Nach der Erhöhung des mukosalen osmotischen Druckes in der Behandlungsgruppe auf 450 mosmol/l und der Zugabe des radioaktiv markierten Isotops $^{36}\text{Cl}^-$ in der Kontroll- und Behandlungsgruppe wurden die Transportraten von Chlorid über drei Fluxperioden bestimmt und pro Epithel gemittelt. Die genaue Versuchsdurchführung ist den Kapiteln Nr. 3.7 und Nr. 3.8 zu entnehmen.

Durch die Erhöhung des osmotischen Druckes werden beide unidirektionalen Ionenfluxe signifikant vermindert, die Nettoresorption von Chlorid weist nur eine geringe Abnahme auf. G_t zeigt den bereits bekannten Effekt einer signifikanten Zunahme, während I_{sc} von dem osmotischen Druck unbeeinflußt bleibt (Tabelle 4.10).

Tabelle 4.10: Auswirkungen eines erhöhten osmotischen Druckes der luminalen Lösung durch Mannit auf den Chloridtransport [Mittelwert \pm SEM, unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppe, $p \leq 0,0001$]

Osmolarität [mosmol/l]	$J_{ms}^{Cl} *$	$J_{sm}^{Cl} *$	$J_{net}^{Cl} *$	G_t [mS \cdot cm ⁻²]	$I_{sc} *$	N/n
300	6,92 \pm 0,38 ^a	5,29 \pm 0,21 ^a	1,57 \pm 0,31	2,50 \pm 0,20 ^a	0,70 \pm 0,07	5/14
450	4,81 \pm 0,30 ^b	3,71 \pm 0,26 ^b	1,03 \pm 0,34	4,08 \pm 0,26 ^b	0,71 \pm 0,05	5/13

* [$\mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]

4.1.2.3.2 Chloridtransportraten in Abhängigkeit vom osmotischen Druck und von der transepithelialen Potentialdifferenz

Die Anwendung der Formel nach FRIZZEL und SCHULTZ (1972) (Kapitel Nr. 3.9.2) für die Bestimmung der PD_r-unabhängigen und der PD_r-abhängigen Anteile der Chloridtransportraten ergibt folgende Regressionsgleichungen:

$$J_{sm}^{Na} \text{ bei } 450 \text{ mosmol/l} = 3,03 (\pm 0,39) + \xi \cdot 0,56 (\pm 0,31) \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1},$$
$$r^2 = 0,11, \text{ SEE} = 1,03, p = 0,0763$$

$$J_{sm}^{Na} \text{ bei } 300 \text{ mosmol/l} = 4,98 (\pm 0,32) + \xi \cdot 0,55 (\pm 0,25) \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1},$$
$$r^2 = 0,13, \text{ SEE} = 0,9, p = 0,0364$$

$$J_{ms}^{Na} \text{ bei } 450 \text{ mosmol/l} = 3,82 (\pm 0,43) + \xi \cdot 1,05 (\pm 0,34) \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1},$$
$$r^2 = 0,26, \text{ SEE} = 1,13, p = 0,0039$$

$$J_{ms}^{Na} \text{ bei } 300 \text{ mosmol/l} = 6,18 (\pm 0,6) + \xi \cdot 1,04 (\pm 0,47) \mu\text{eq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1},$$
$$r^2 = 0,14, \text{ SEE} = 1,65, p = 0,0324$$

In Abbildung 4.13 sind die Regressionsgeraden eingezeichnet.

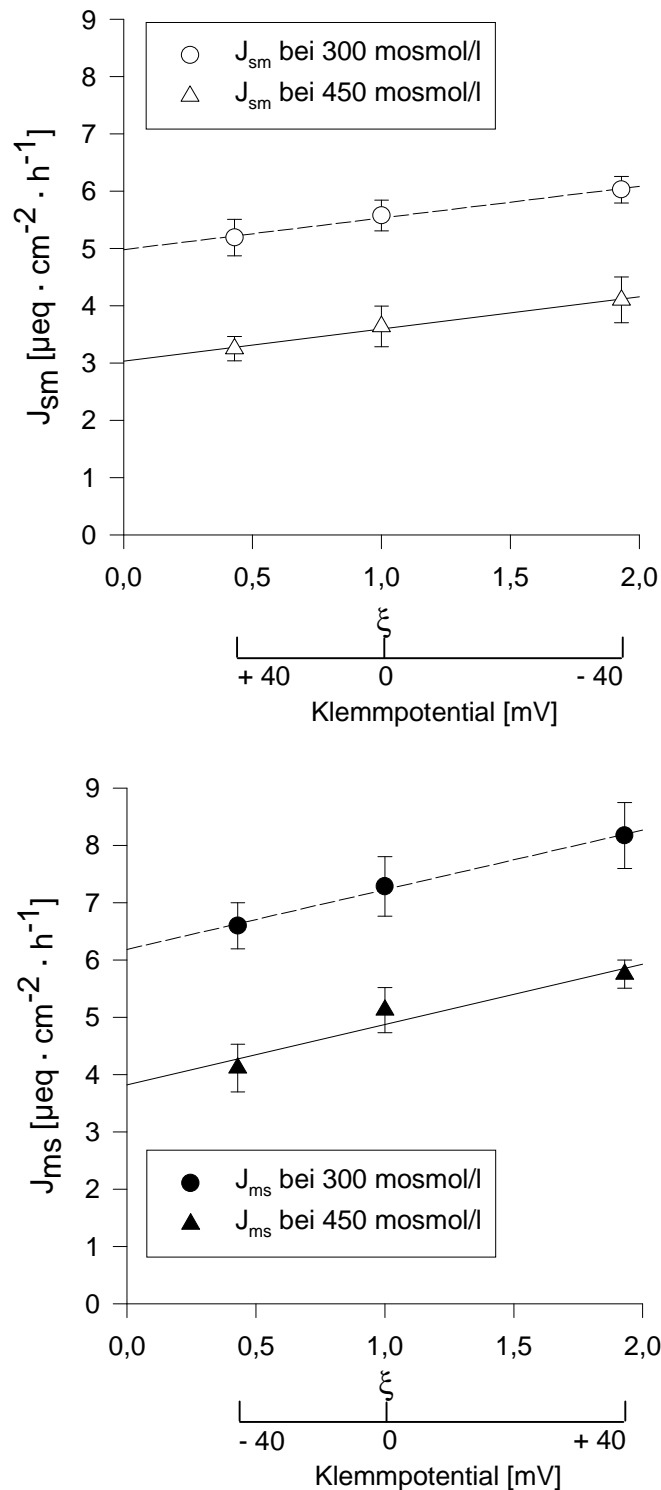


Abbildung 4.13: Darstellung der unidirektionalen Chloridfluxe (J_{sm}^{Cl} und J_{ms}^{Cl}) in Abhängigkeit vom osmotischen Druck und von ξ bzw. vom Klemmpotential [Mittelwert \pm SEM, bei 300 mosmol/l (Kontrolle): N = 4, n = 11, bei 450 mosmol/l: N = 4, n = 10; Regressionsgleichungen und statistische Beschreibung siehe Text]. **Achtung:** andere Achsenskalierung als in Abbildung 4.12!

Bei einem erhöhten osmotischen Druck von 450 mosmol/l wird der elektroneutrale, transzelluläre Chloridtransport in beiden Transportrichtungen signifikant reduziert [für J_{sm}^{Cl} : $p = 0,0006$, für J_{ms}^{Cl} : $p = 0,0012$]. Dieser Befund unterstützt die Annahme einer Störung des transzellulären Transportmechanismus für Chlorid und Natrium; der Na^+/H^+ -Austauscher, der mit einem Cl^-/HCO_3^- -Austauscher verbunden ist, wird gehemmt. Da die transzellulären Anteile der unidirektionalen Chloridfluxe gekoppelt sind, beeinflusst der gestörte Transport durch die Zelle die beiden Fluxrichtungen in gleichem Maße.

Die Steigung der Regressionsgeraden und damit der PD_t -abhängige, passive Chloridtransport bleibt in beiden Fluxrichtungen von dem erhöhten osmotischen Druck unbeeinflusst. Die in dem Versuch vorgegebene Potentialdifferenz von 80 mV (Klemmpotential von - 40 mV bis + 40 mV) reicht scheinbar nicht aus, um eine Veränderung der parazellulären Chloridtransportraten zu bewirken.

Tabelle 4.11 führt die Chloridtransportraten und die Gewebeleitfähigkeit in Abhängigkeit vom osmotischen Druck unter Kurzschlußbedingungen und bei einer physiologischen transepithelialen Potentialdifferenz von + 40 mV auf.

Tabelle 4.11: Chloridtransportraten in Abhängigkeit von dem osmotischen Druck und von der transepithelialen Potentialdifferenz [Mittelwert ± SEM]

Osmotischer Druck [mosmol/l]	Klemmpotential [mV]	J_{ms}^{Cl} *	J_{sm}^{Cl} *	J_{net}^{Cl} *	G_t [mS · cm ⁻²]	N/n
300 (Kontrolle)	0	7,28 ± 0,52 ^a	5,57 ± 0,27 ^a	1,71 ± 0,44	2,29 ± 0,25 ^a	4/11
450	0	5,13 ± 0,39 ^b	3,64 ± 0,36 ^b	1,49 ± 0,44	3,70 ± 0,19 ^{b c}	4/10
300 (Kontrolle)	40	8,17 ± 0,58 ^a	5,19 ± 0,32 ^a	2,98 ± 0,64	2,28 ± 0,20 ^a	4/11
450	40	5,75 ± 0,25 ^b	3,25 ± 0,21 ^b	2,50 ± 0,22	3,33 ± 0,15 ^{b d}	4/10

* [μeq · cm⁻² · h⁻¹]

a/b: signifikanter Unterschied zur entsprechenden Kontrolle bei gleichem Klemmpotential [p < 0,05]

c/d: signifikanter Unterschied in der Versuchsgruppe „450 mosmol/l“ bei verschiedenen Klemmpotentialen [p < 0,05]

In der Kontrollgruppe besteht bei verschiedenen Klemmpotentialen kein signifikanter Unterschied.

Die Erhöhung des osmotischen Druckes führt bei einem gleichen Klemmpotential, trotz einer signifikanten Zunahme der Gewebeleitfähigkeit [bei 0 mV: p = 0,0003; bei + 40 mV: p = 0,0005; zu entsprechender Kontrolle], zur signifikanten Abnahme der unidirektionalen Fluxraten [bei 0 mV: für J_{ms}^{Cl} : p = 0,0042, für J_{sm}^{Cl} : p = 0,0003; bei + 40 mV: für J_{ms}^{Cl} : p = 0,0015, für J_{sm}^{Cl} : p < 0,0001; zur jeweiligen Kontrolle]. Bei einem gleichen osmotischen Druck bewirkt die Erhöhung der transepithelialen Potentialdifferenz von 0 mV auf + 40 mV dagegen keine signifikanten Unterschiede.

4.2 Ergebnisse aus Versuchen mit isolierten Pansenepithelien von kraftfuttergefütterten Schafen

Aus zahlreichen In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen ist bekannt, daß sich das Vormagenepithel in Abhängigkeit von der Fütterung in seiner Morphologie (Anzahl und Länge der Zotten) und Funktion verändert (DIRKSEN et al., 1984, LIEBICH et al., 1987, GÄBEL, 1988). Folglich müßte das Pansenepithel in der Lage sein, sich funktionell an die fütterungsbedingt veränderten luminalen Verhältnisse (Erhöhung des osmotischen Druckes) zu adaptieren. Für diese Fragestellung wurden einige der zuvor mit Pansenepithelien von heugefütterten Schafen durchgeführten Versuche mit Pansenepithelien von Schafen wiederholt, die mit geringen Mengen Kraftfutter (200 - 400 g/Tag) und Heu ad libitum gefüttert wurden. Die Versuchsabläufe und die verwendeten Pufferlösungen (Kapitel Nr. 9) entsprachen denen in den zuvor beschriebenen Kapiteln. Für die grafische Darstellung werden zur besseren Vergleichbarkeit die gleichen Achsenskalierungen wie bei den vorherigen Abbildungen verwendet. Die Ergebnisse dieser Versuche werden mit den an Pansenepithelien von heugefütterten Schafen gewonnenen Ergebnissen verglichen.

4.2.1 Einfluß des osmotischen Gradienten auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Pansenepithels

Zunächst soll untersucht werden, ob der osmotische Gradient an den Pansenepithelien von kraftfuttergefütterten Schafen ähnliche Effekte auf die elektrophysiologischen Parameter ausübt wie bei den heugefütterten Schafen.

Nach der Äquilibrierung der Epithelien in den Ussing-Kammern unter Kurzschlußbedingungen und bei isoosmotischen Druckverhältnissen (300 mosmol/l) wurde die Inkubationslösung auf der mukosalen Gewebeseite in einigen Kammern durch eine Lösung ersetzt (Zeitpunkt $t = 0$ min), die einen, durch die Zugabe von Mannit, erhöhten osmotischen Druck von 350 bzw. 450 mosmol/l aufwies. Als Kontrolle wurde eine entsprechend große dritte Gruppe von Epithelien unter isoosmotischen Bedingungen untersucht. Nach 130 Minuten wurden bei den beiden Behandlungsgruppen durch einen mukosalen Pufferwechsel wieder isoosmotische Bedingungen geschaffen, um die Reversibilität der Effekte eines erhöhten osmotischen Druckes zu prüfen.

4.2.1.1 Veränderung der Gewebeleitfähigkeit (G_t) in Abhängigkeit vom osmotischen Druck der mukosalen Pufferlösung

Die Veränderung von G_t in Abhängigkeit vom osmotischen Druck ist in der Abbildung 4.14 eingezeichnet.

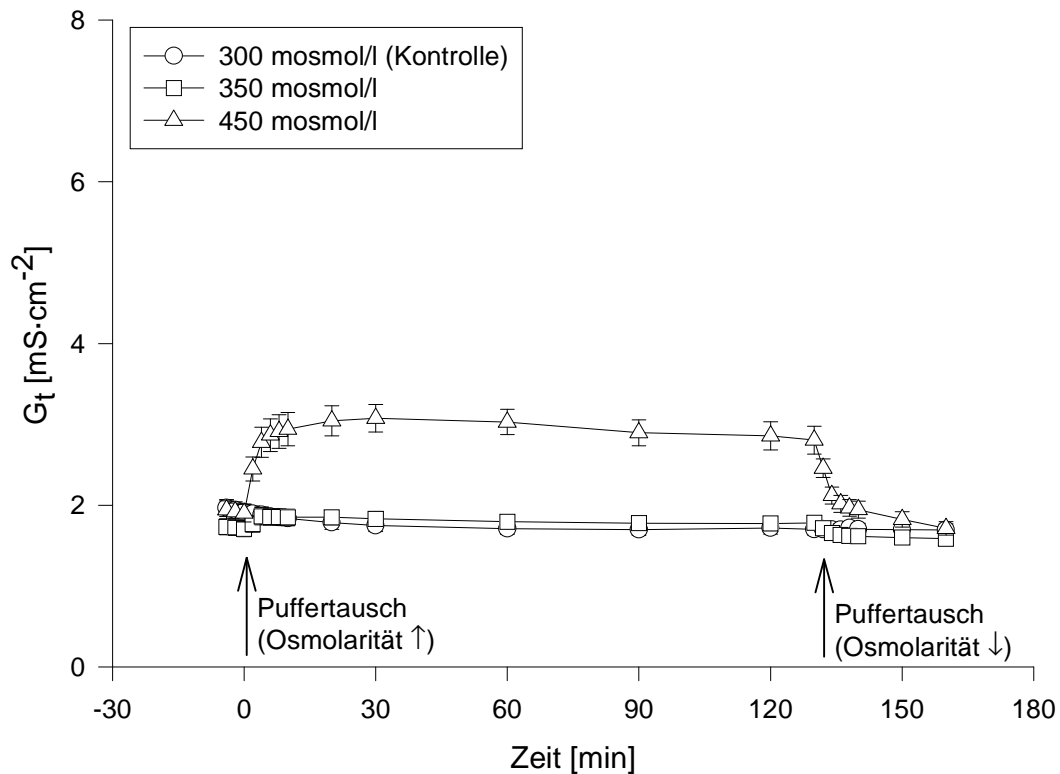


Abbildung 4.14: Veränderung der Gewebeleitfähigkeit (G_t) in Abhängigkeit vom osmotischen Druck in der mukosalen Pufferlösung (300, 350 und 450 mosmol/l). Die Erhöhung des osmotischen Druckes wurde durch Mannit vorgenommen. [Mittelwerte \pm SEM, N = 6, n = 24; SEM wird teilweise durch die Größe des Symbols verdeckt; statistische Beschreibung siehe Text]

Wie der Abbildung 4.14 zu entnehmen ist, steigt die Gewebeleitfähigkeit innerhalb von zwei Minuten nach der Erhöhung des osmotischen Druckes auf 450 mosmol/l signifikant an [$p < 0,0001$] und fällt bereits zwei Minuten nach der Beseitigung des osmotischen Gradienten wieder deutlich ab [$p = 0,0007$]. Während der gesamten Behandlungsdauer (2. - 130. min) unterscheidet sich die Leitfähigkeit bei 450 mosmol/l signifikant von der G_t bei 300 mosmol/l (Kontrolle) [$p < 0,05$]. Unter isoosmotischen Bedingungen (zu Beginn und am Ende des

Versuches) kann hinsichtlich der G_t kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlungsgruppe „450 mosmol/l“ und der Kontrolle festgestellt werden.

Die Veränderung des osmotischen Druckes hat bei der Behandlungsgruppe „350 mosmol/l“ zwar einen wesentlich geringeren Effekt auf die Leitfähigkeit, bewirkt jedoch auch hier innerhalb von zwei Minuten einen signifikanten Anstieg [$p = 0,0024$] bzw. Abfall der G_t [$p = 0,0056$]. Zwischen dieser Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe besteht während der gesamten Versuchsdauer hinsichtlich der Gewebeleitfähigkeit kein signifikanter Unterschied. Bei der Kontrollgruppe findet im Verlauf des Versuches nur ein geringer zeitabhängiger Abfall der Leitfähigkeit statt.

Der Vergleich der Abbildung 4.14 mit Abbildung 4.1 (Kapitel Nr. 4.1.1.1) bestätigt die Vermutung, daß das Pansenepithel von kraftfuttergefütterten Tieren in der Lage ist, sich an die veränderten luminalen osmotischen Bedingungen zu adaptieren. Die Effekte einer Osmolariätserhöhung fallen bei diesen Epithelien deutlich geringer aus als bei den Pansenepithelien von den heugefütterten Tieren.

Die Ausgangsleitfähigkeiten der beiden Fütterungsgruppen „Heu“ und „Kraftfutter + Heu“ unterscheiden sich bereits zu Versuchsbeginn, unter isoosmotischen Verhältnissen, deutlich voneinander. Für den statistischen Vergleich der entsprechenden osmotischen Behandlungen zwischen den beiden Fütterungsgruppen wird deshalb nur die durch den erhöhten osmotischen Druck bedingte Veränderung der Gewebeleitfähigkeit verglichen, unberücksichtigt der absoluten Werte von G_t .

Die Anwendung des t-Testes nach Student ergibt in den Behandlungsgruppen „350 mosmol/l“ und „450 mosmol/l“ hinsichtlich des Leitfähigkeitsanstieges einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Fütterungsgruppen, wobei der Effekt des erhöhten osmotischen Druckes bei den Pansenepithelien aus der „Heugruppe“ durchweg größer ausfällt [bei 350 mosmol/l: $p = 0,0088$, bei 450 mosmol/l: $p < 0,0001$].

4.2.1.1.1 Mathematische Beschreibung der Gewebeleitfähigkeit als Funktion der Zeit

Für die Anstiegsphase der Gewebeleitfähigkeit nach der Osmolaritätserhöhung sowie für die Abnahme der Leitfähigkeit nach der Beseitigung des osmotischen Gradienten wurden für die beiden Behandlungsgruppen „350 mosmol/l“ und „450 mosmol/l“ Regressionen mit Hilfe der in dem Kapitel Nr. 4.1.1.1.1 aufgeführten Gleichungen 4.1 und 4.2 durchgeführt.

Abbildung 4.15 ist die Darstellung der Meßwerte und der Regressionskurven (errechnet nach der Gleichung 4.1) für den Anstieg der Gewebeleitfähigkeit. Die Meßwerte für den Anstieg von G_t und die Parameter τ , G_{\min} und G_{\max} für die Gleichung 4.1 sind in der Tabelle 4.12 aufgelistet.

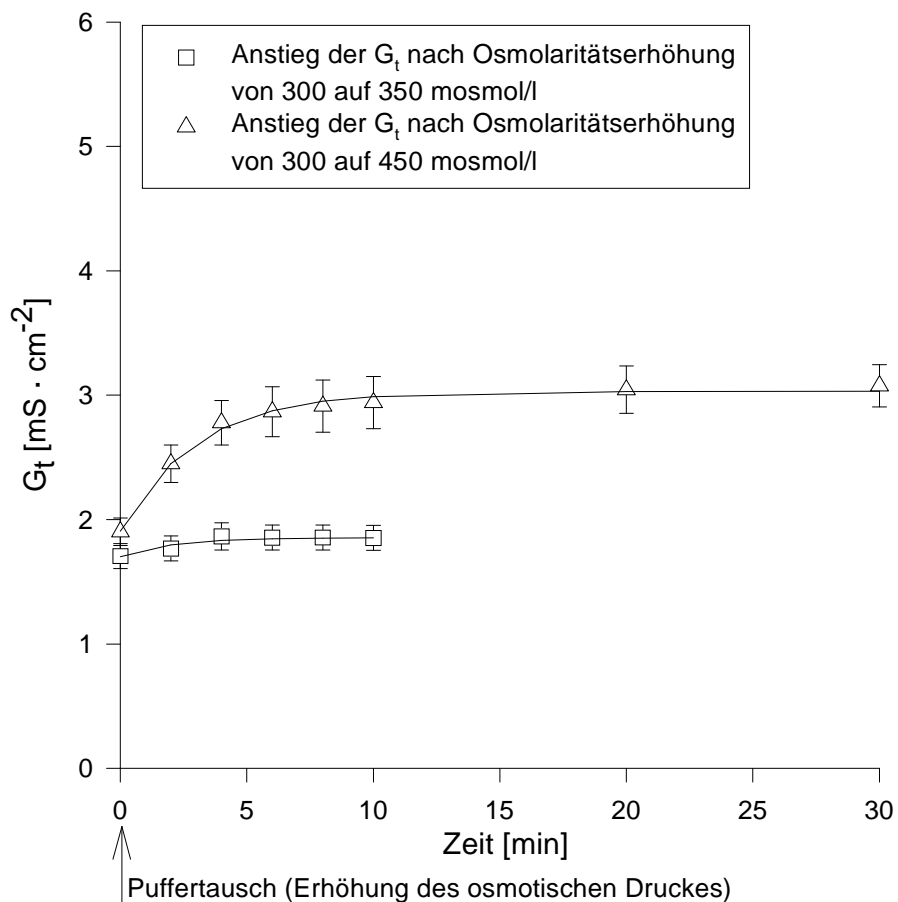


Abbildung 4.15: Anstieg der Gewebeleitfähigkeit (G_t) nach Erhöhung des osmotischen Druckes in der mukosalen Pufferlösung von 300 mosmol/l auf 350 bzw. 450 mosmol/l zum Zeitpunkt $t = 0$ min mit den Regressionen nach Gleichung 4.1 aus Kapitel Nr. 4.1.1.1.1 [Mittelwerte \pm SEM, $N = 6$, $n = 24$; für 350 mosmol/l: $r^2 = 0,92$, $SEE = 0,02$, $p = 0,0234$, für 450 mosmol/l: $r^2 = 0,99$, $SEE = 0,04$, $p < 0,0001$]

Tabelle 4.12: Zeitabhängiger Anstieg der Gewebeleitfähigkeit nach Erhöhung des osmotischen Druckes in der mukosalen Pufferlösung von 300 mosmol/l auf 350 bzw. 450 mosmol/l zum Zeitpunkt t = 0 min [Mittelwerte ± SEM, N = 6, n = 24]

Zeit [min]	G _t nach Erhöhung der Osmolarität auf 350 mosmol/l	Regressionsparameter für Gleichung 4.1 bei 350 mosmol/l	G _t nach Erhöhung der Osmolarität auf 450 mosmol/l	Regressionsparameter für Gleichung 4.1 bei 450 mosmol/l
0	1,71 ± 0,10	τ = 2,03	1,90 ± 0,11	τ = 3,03
2	1,77 ± 0,10	G _{min} = 1,70	2,45 ± 0,15	G _{min} = 1,91
4	1,86 ± 0,11	G _{max} = 1,85	2,78 ± 0,18	G _{max} = 3,03
6	1,85 ± 0,10		2,87 ± 0,20	
8	1,86 ± 0,10		2,91 ± 0,21	
10	1,85 ± 0,10		2,94 ± 0,21	
20			3,04 ± 0,19	
30			3,07 ± 0,17	

Erläuterung: G_{min} (vor der Osmolaritätserhöhung) sowie G_{max} sind fett gekennzeichnet

In Abbildung 4.16 sind die Meßwerte und die Regressionskurven für die Abnahme der Leitfähigkeit eingezeichnet. Tabelle 4.13 führt die Meßwerte und die Regressionsparameter für die Abnahme von G_t nach Gleichung 4.2 auf.

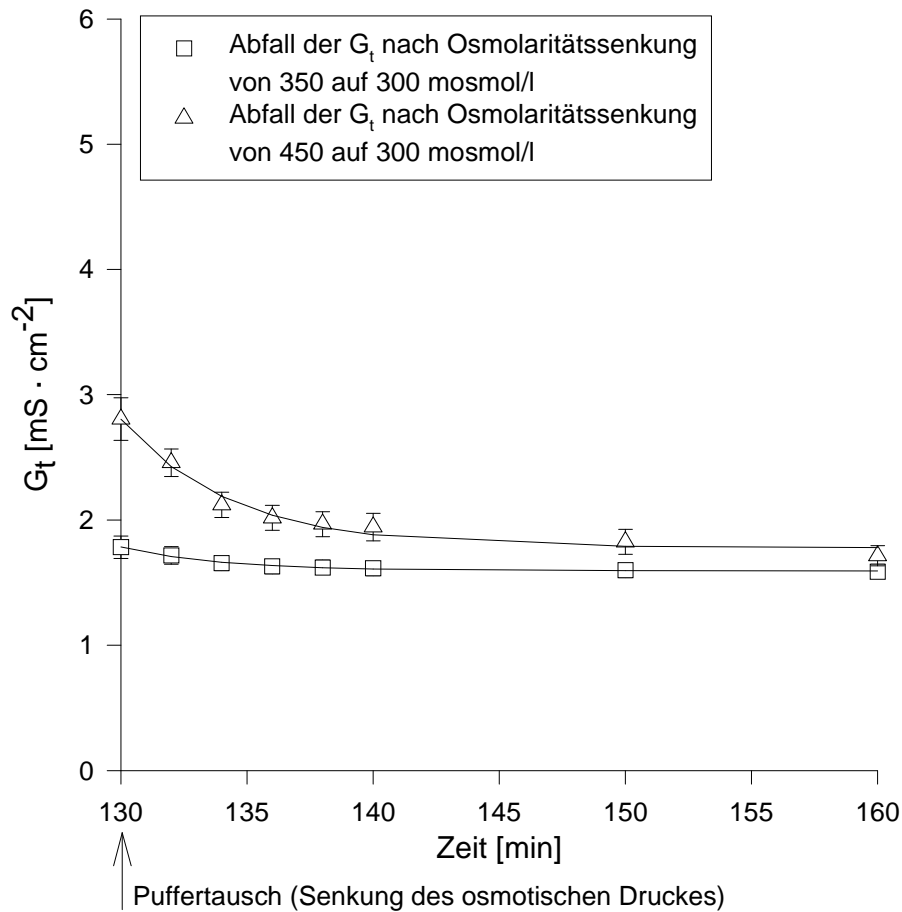


Abbildung 4.16: Abnahme der Gewebeleitfähigkeit (G_t) nach Senkung des osmotischen Druckes in der mukosalen Pufferlösung von 350 bzw. 450 mosmol/l auf 300 mosmol/l zum Zeitpunkt $t = 130$ min mit den Regressionen nach Gleichung 4.2 [Mittelwerte \pm SEM, $N = 6$, $n = 24$, SEM wird teilweise von der Größe der Symbole verdeckt; für 350 mosmol/l: $r^2 = 0,99$, $SEE = 0,01$, $p < 0,0001$, für 450 mosmol/l: $r^2 = 0,98$, $SEE = 0,06$, $p < 0,0001$]

Tabelle 4.13: Zeitabhängiger Abfall der Gewebeleitfähigkeit nach Beseitigung des osmotischen Gradienten zum Zeitpunkt t = 130 min [Mittelwerte ± SEM, N = 6, n = 24]

Zeit [min]	G_t nach Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen (Vorbehandlung 350 mosmol/l)	Regressionsparameter für Gleichung 4.2 bei 350 mosmol/l	G_t nach Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen (Vorbehandlung 450 mosmol/l)	Regressionsparameter für Gleichung 4.2 bei 450 mosmol/l
130	1,78 ± 0,09	$\tau = 3,97$	2,81 ± 0,17	$\tau = 4,35$
132	1,72 ± 0,07	$G_{\min} = 1,59$	2,46 ± 0,11	$G_{\min} = 1,78$
134	1,65 ± 0,06	$G_{\max} = 1,78$	2,12 ± 0,10	$G_{\max} = 2,80$
136	1,63 ± 0,06		2,02 ± 0,10	
138	1,62 ± 0,06		1,97 ± 0,10	
140	1,61 ± 0,06		1,94 ± 0,11	
150	1,60 ± 0,06		1,82 ± 0,10	
160	1,59 ± 0,06		1,71 ± 0,08	

Erläuterung: G_{\max} (vor der Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen) sowie G_{\min} sind fett gekennzeichnet.

Tabelle 4.14 faßt die für den Anstieg und den Abfall der Leitfähigkeit ermittelten Werte für τ für beide Behandlungsgruppen (350 und 450 mosmol/l) zusammen.

Tabelle 4.14: Gegenüberstellung der für die beiden Behandlungsgruppen (350 und 450 mosmol/l) ermittelten τ -Werte für den Anstieg und den Abfall der Leitfähigkeit

	Gruppe „350 mosmol/l“	Gruppe „450 mosmol/l“
τ für den Anstieg der G_t nach Osmolaritätserhöhung	2,03	3,03
τ für den Abfall der G_t nach Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen	3,97	4,35

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, reagiert die Gewebeleitfähigkeit schneller auf die Erhöhung des osmotischen Druckes als auf die Senkung der Osmolarität. Der Anstieg der Leitfähigkeit auf einen Maximalwert benötigt weniger Zeit als die Normalisierung der G_t nach der Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen.

Wie bei den Versuchen mit den Pansenepithelien von heugefütterten Schafen ist auch aus den hier aufgeführten τ -Werten zu erkennen, daß sowohl Anstieg als auch Abfall der Leitfähigkeit bei der Behandlungsgruppe „350 mosmol/l“ schneller erfolgen als bei einem osmotischen Druck von 450 mosmol/l.

Ein Vergleich mit den τ -Werten aus Tabelle 4.3 (Kapitel Nr. 4.1.1.1.1) ergibt, daß die Pansenepithelien von den kraftfuttergefütterten Tieren langsamer auf eine Veränderung des osmotischen Druckes reagieren als die Epithelien der heugefütterten Tiere. Dieser Befund unterstützt die Annahme einer fütterungsbedingten Adaptationsfähigkeit des Epithels an die veränderten osmotischen Bedingungen.

4.2.1.1.2 Veränderung der Gewebeleitfähigkeit eines Epithels in Abhängigkeit von seiner Ausgangsleitfähigkeit und vom osmotischen Druck

In der Abbildung 4.17 wird die Veränderung der Gewebeleitfähigkeit 60 Minuten nach der Erhöhung des osmotischen Druckes [$\Delta G_t(t = 60)$] gegenüber der Ausgangsleitfähigkeit unter isoosmotischen Bedingungen zum Zeitpunkt $t = 0$ min [$G_t(t = 0)$] für jedes Epithel aufgetragen.

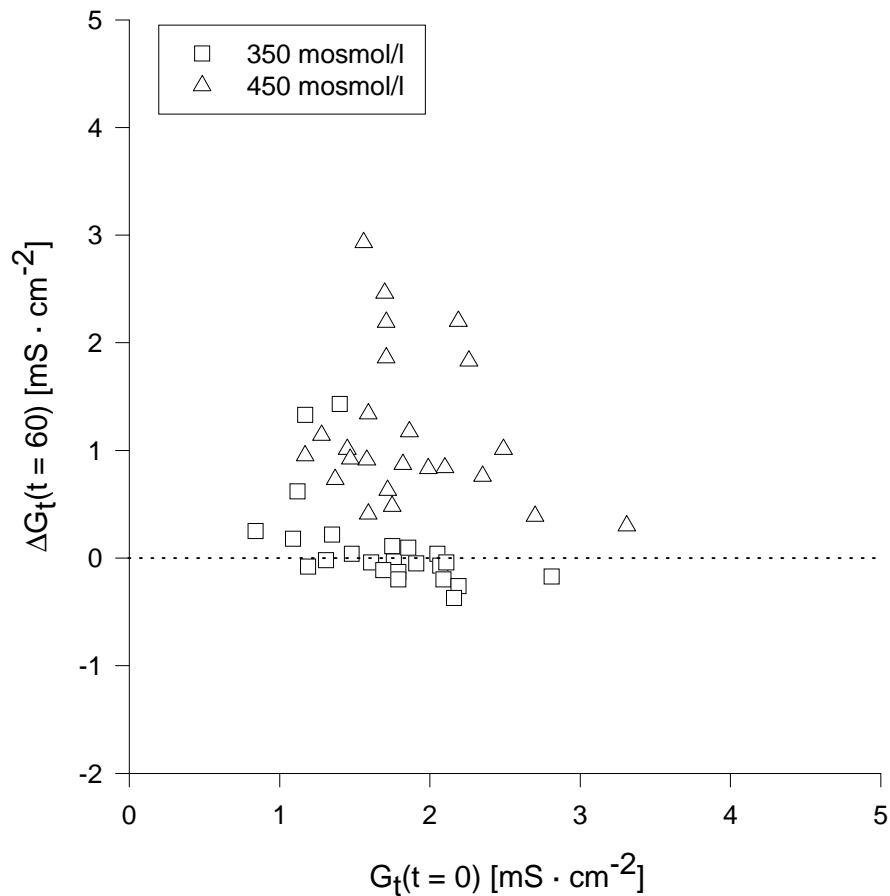


Abbildung 4.17: Leitfähigkeitsveränderung [$\Delta G_t(t = 60)$] 60 Minuten nach Erhöhung des osmotischen Druckes in der mukosalen Pufferlösung (von 300 mosmol/l auf 350 bzw. 450 mosmol/l) in Abhängigkeit von der Ausgangsleitfähigkeit [$G_t(t = 0)$] unter isoosmotischen Bedingungen (300 mosmol/l auf beiden Epithelseiten) [Darstellung der Einzelwerte von 24 Epithelien pro Behandlungsgruppe, $N = 6$, $n = 24$]

Aus der Abbildung läßt sich die gleiche Beobachtung ableiten wie aus der Abbildung 4.4 bei den „Heutieren“ (Kapitel Nr. 4.1.1.1.2). Zwischen der Leitfähigkeitsveränderung und der

Ausgangsleitfähigkeit besteht kein linearer Zusammenhang. ΔG_t ist jedoch abhängig von der Höhe des osmotischen Druckes in der mukosalen Pufferlösung.

In Abbildung 4.18 ist die lineare Beziehung zwischen der Leitfähigkeitsveränderung und der Höhe des osmotischen Druckes in der mukosalen Pufferlösung dargestellt.

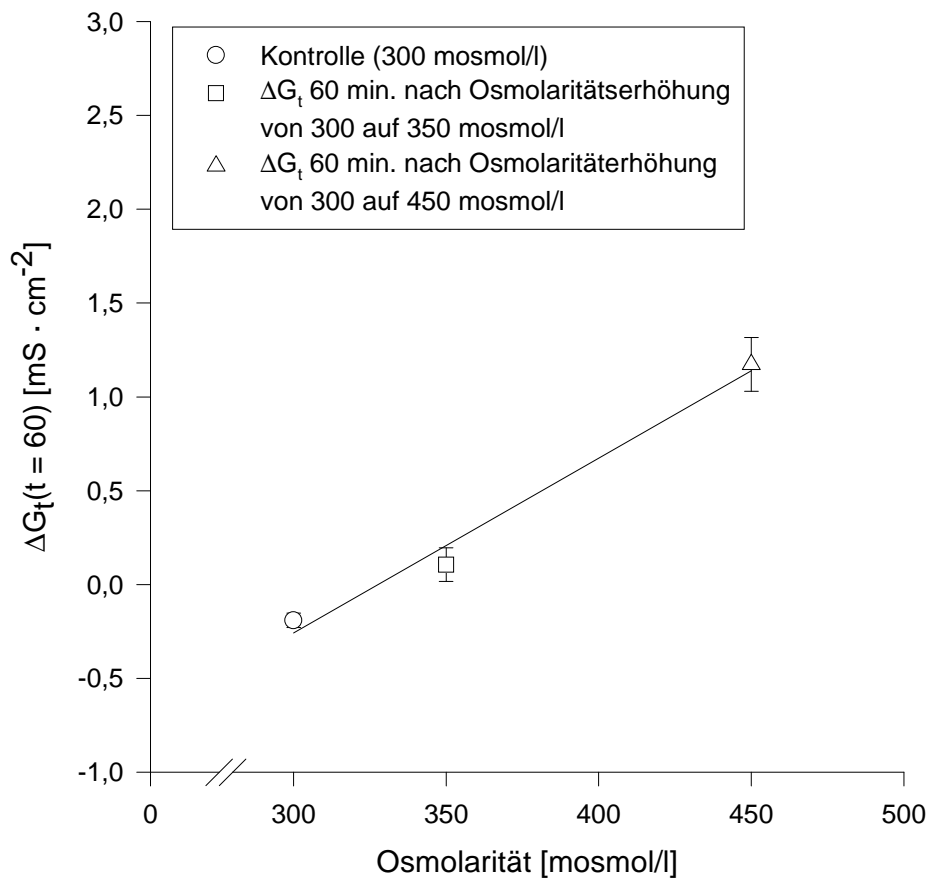


Abbildung 4.18: Leitfähigkeitsveränderung [$\Delta G_t(t = 60)$] 60 Minuten nach Erhöhung des osmotischen Druckes in der luminalen Pufferlösung in Abhängigkeit von der Osmolarität [Mittelwerte \pm SEM, N = 6, n = 24]. Die Regression wurde auf der Basis der Einzelwerte durchgeführt: $y = -3,05 + (0,01 \cdot x)$, $r^2 = 0,59$, SEE = 0,49, $p < 0,0001$

4.2.1.2 Veränderung des Kurzschlußstromes (I_{sc}) in Abhängigkeit vom osmotischen Druck der mukosalen Pufferlösung

In Abbildung 4.19 ist die Veränderung des Kurzschlußstromes in Abhängigkeit vom osmotischen Druck in der luminalen Pufferlösung gegen die Zeit aufgetragen.

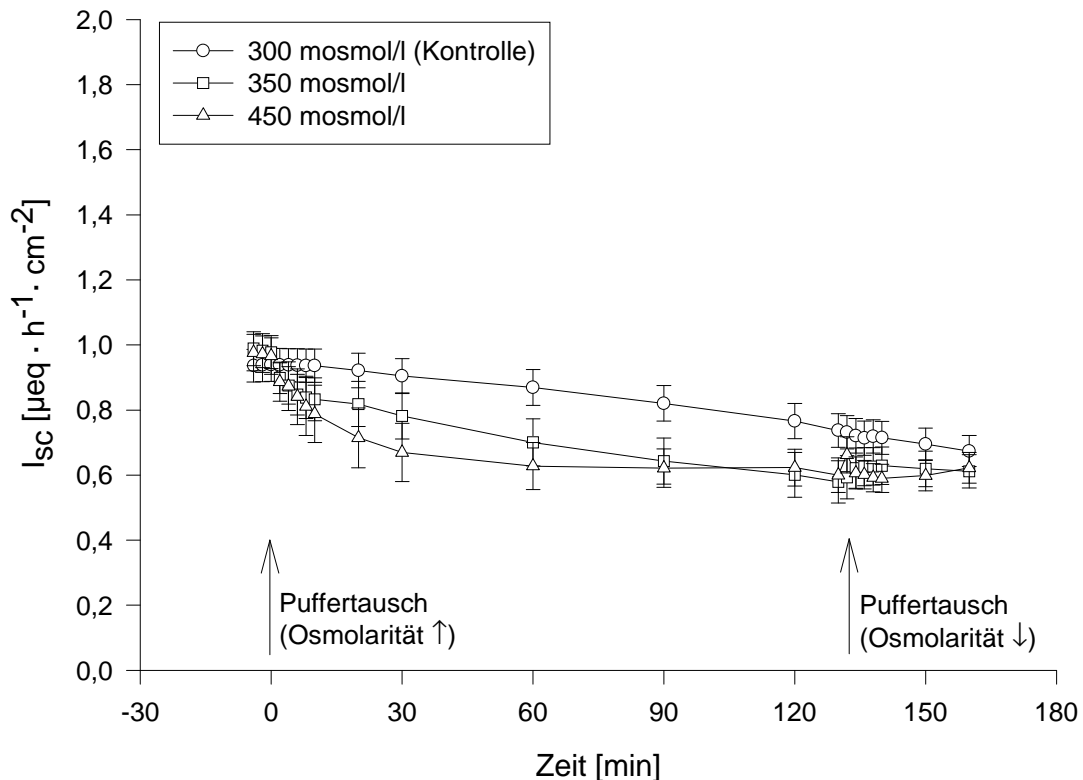


Abbildung 4.19: Veränderung des Kurzschlußstromes (I_{sc}) in Abhängigkeit vom osmotischen Druck in der mukosalen Pufferlösung (300, 350 und 450 mosmol/l). Die Erhöhung des osmotischen Druckes wurde durch Mannit vorgenommen. [Mittelwerte \pm SEM, N = 6, n = 24]

Die Erhöhung des osmotischen Druckes in der luminalen Pufferlösung auf 350 bzw. 450 mosmol/l bewirkt innerhalb von zwei Minuten eine signifikante Abnahme des Kurzschlußstromes [für 350 mosmol/l: $p < 0,0001$, für 450 mosmol/l: $p = 0,0043$]. Nach der Beseitigung des osmotischen Gradienten nimmt der Kurzschlußstrom in diesen beiden Behandlungsgruppen nur geringfügig zu.

Bei den Epithelien der Kontrollgruppe, die konstant unter isoosmotischen Bedingungen bei 300 mosmol/l inkubiert wurden, ist nur eine geringfügige zeitabhängige Abnahme von I_{sc} zu

beobachten. Zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen läßt sich statistisch kein Unterschied hinsichtlich des Kurzschlußstromes absichern.

Der bei den „Heutieren“ in der Abbildung 4.6 (Kapitel Nr. 4.1.1.2) durch die Erhöhung des osmotischen Druckes auf 450 mosmol/l verursachte kurzfristige steile Anstieg der Leitfähigkeit wird hier nicht beobachtet.

4.2.2 Einfluß des osmotischen Druckes bzw. der Gewebeleitfähigkeit auf die Ionentransportraten über das isolierte Pansenepithel

Nach der Äquilibration der in die Ussing-Kammern eingebauten Epithelien unter Kurzschlußbedingungen ($PD_t = 0$ mV) und der mukosalen Erhöhung des osmotischen Druckes in zwei Behandlungsgruppen auf 350 bzw. 450 mosmol/l erfolgte wieder die Zugabe der radioaktiv markierten Isotope $^{51}\text{Cr-EDTA}$ bzw. $^{22}\text{Na}^+$.

Die Transportraten von Chrom-EDTA wurden über zwei Fluxperioden (je 45 min) und die von Natrium über drei Fluxperioden (je 30 min) bestimmt, bevor der osmotische Gradient durch einen mukosalen Pufferwechsel ausgeschaltet wurde. Anschließend wurden zwei weitere Fluxperioden (bei ^{51}Cr je 45 min, bei $^{22}\text{Na}^+$ je 30 min) bestimmt, um zu prüfen, ob die Effekte des erhöhten osmotischen Druckes auf die Transportraten und die elektrophysiologischen Parameter reversibel sind.

4.2.2.1 Bestimmung der Transportraten von Chrom-EDTA

4.2.2.1.1 Chrom-EDTA-Fluxe und Gewebeleitfähigkeit in Abhängigkeit vom osmotischen Druck der luminalen Lösung

Die über die Fluxperioden gemittelten Werte für den Chrom-EDTA-Transport sowie für die Leitfähigkeit sind in Tabelle 4.15 enthalten.

Tabelle 4.15: Auswirkungen eines erhöhten osmotischen Druckes in der luminalen Lösung durch Mannit auf den Transport von ^{51}Cr -EDTA [Mittelwert \pm SEM, unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppen, $p < 0,05$]

Osmolarität [mosmol/l]	$J_{ms}^{\text{Cr}} *1$	$J_{sm}^{\text{Cr}} *1$	$J_{net}^{\text{Cr}} *1$	G_t [mS \cdot cm $^{-2}$]	$I_{sc} *2$	N/n
300 (Kontrolle)	0,34 \pm 0,08 ^a	0,54 \pm 0,10 ^a	-0,14 \pm 0,07 ^a	2,54 \pm 0,14 ^a	0,76 \pm 0,19	3/6
350	0,55 \pm 0,15 ^a	0,60 \pm 0,07 ^a	-0,05 \pm 0,11 ^a	2,64 \pm 0,24 ^a	0,62 \pm 0,17	3/6
450	1,54 \pm 0,20 ^b	0,93 \pm 0,12 ^b	0,61 \pm 0,15 ^b	4,05 \pm 0,18 ^b	0,80 \pm 0,13	3/6

*1 [nmol \cdot cm $^{-2}$ \cdot h $^{-1}$]

*2 [μ eq \cdot cm $^{-2}$ \cdot h $^{-1}$]

Wie aus Kapitel Nr. 4.2.1.1 bekannt, erhöht sich auch in dieser Versuchsserie die Gewebeleitfähigkeit in Abhängigkeit vom osmotischen Druck [$p < 0,05$ zwischen Kontrolle und Versuchsgruppe „450 mosmol/l“]. Gleichzeitig nehmen beide unidirektionalen Chromfluxe sowie der Nettotransport zu.

Ergebnisse

Die durch den erhöhten osmotischen Druck bedingten Veränderungen der G_t und der Transportraten normalisieren sich nach der Beseitigung des osmotischen Gradienten wieder, so daß bei diesen Parametern statistisch keine Unterschiede mehr nachgewiesen werden können (Tabelle 4.16).

Tabelle 4.16: Chromtransport unter Kontrollbedingungen (300 mosmol/l) nach unterschiedlicher osmotischer Vorbehandlung [Mittelwert \pm SEM, keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppen mehr nachzuweisen]

Vorbehandlung (osmotischer Druck in [mosmol/l])	J_{ms}^{Cr} *1	J_{sm}^{Cr} *1	J_{net}^{Cr} *1	G_t [mS \cdot cm ⁻²]	I_{sc} *2	N/ n
300 (Kontrolle)	0,38 \pm 0,05	0,46 \pm 0,09	-0,10 \pm 0,11	2,26 \pm 0,13	0,62 \pm 0,15	3/6
350	0,27 \pm 0,02	0,19 \pm 0,11	0,08 \pm 0,12	1,91 \pm 0,13	0,63 \pm 0,12	3/6
450	0,46 \pm 0,10	0,42 \pm 0,13	0,04 \pm 0,07	2,19 \pm 0,24	0,83 \pm 0,07	3/6

*1 [nmol \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹]

*2 [μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹]

In Abbildung 4.20 und Abbildung 4.21 werden die unidirektionalen ^{51}Cr -EDTA-Transportraten in Abhängigkeit vom osmotischen Druck gegenüber der Gewebeleitfähigkeit dargestellt. Aus der linearen Beziehung der unidirektionalen Chromfluxe zu der Gewebeleitfähigkeit wird deutlich, daß die Leitfähigkeitsveränderung überwiegend parazellulär bedingt ist.

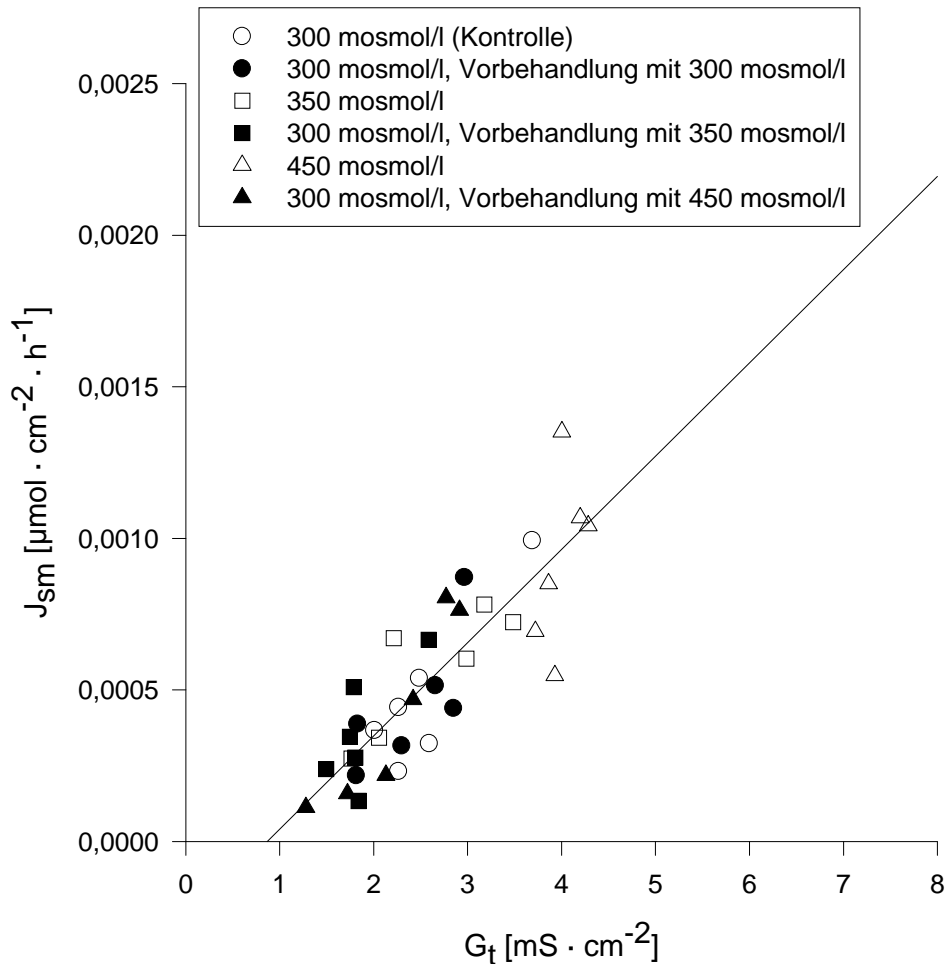


Abbildung 4.20: J_{sm}^{Cr} in Abhängigkeit von der Gewebeleitfähigkeit (G_t); Darstellung der über die beiden Fluxperioden gemittelten Werte für die einzelnen Epithelien [$N = 3$, $n = 6$]. Die verschiedenen unausgefüllten Symbole kennzeichnen die drei Versuchsgruppen (300 = Kontrolle, 350 und 450 mosmol/l). Die entsprechenden schwarzen Symbole stellen diese drei Gruppen nach der Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen bei 300 mosmol/l dar. Es wurde allen Werten eine Regressionsgerade angepaßt: $y = -0,000266 + (0,000307 \cdot x)$, $r^2 = 0,73$, $\text{SEE} = 0,0002$, $p < 0,0001$

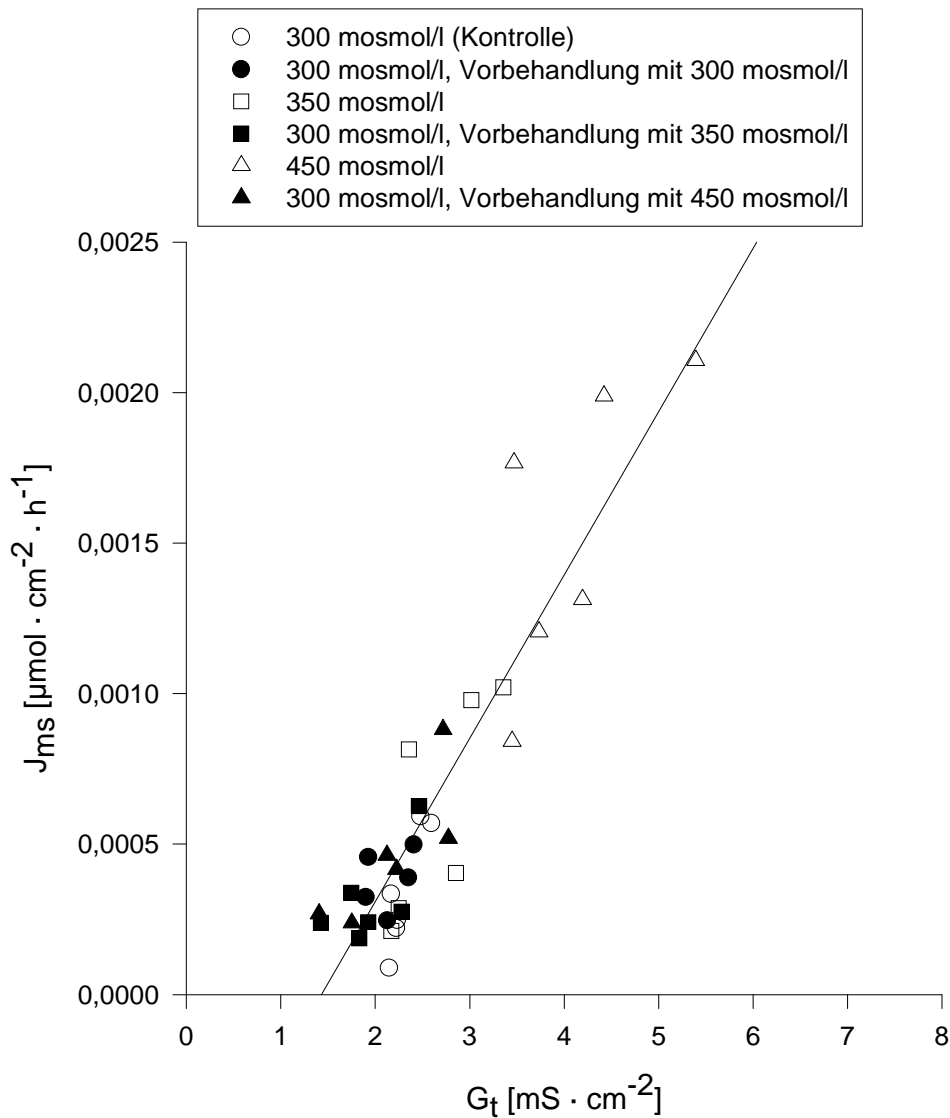


Abbildung 4.21: J_{ms}^{Cr} in Abhängigkeit von der Gewebeleitfähigkeit (G_t); Darstellung der über die beiden Fluxperioden gemittelten Werte für die einzelnen Epithelien [$N = 3, n = 6$]. Die verschiedenen unausgefüllten Symbole kennzeichnen die drei Versuchsgruppen (300 = Kontrolle, 350 und 450 mosmol/l). Die entsprechenden schwarzen Symbole stellen diese drei Gruppen nach der Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen bei 300 mosmol/l dar. Es wurde allen Werten eine Regressionsgerade angepaßt: $y = -0,000777 + (0,000543 \cdot x)$, $r^2 = 0,83$, $SEE = 0,0002$, $p < 0,0001$

Die Anwendung des t-Tests nach Student für den statistischen Vergleich der beiden Regressionsgeraden (Abbildung 4.20 und Abbildung 4.21) zeigt einen mit $p = 0,0007$ signifikanten Unterschied der Schnittpunkte mit der Ordinate; die Steigungen der Geraden unterscheiden sich mit $p < 0,0001$ ebenfalls signifikant voneinander.

4.2.2.2 Bestimmung der Natriumtransportraten

4.2.2.2.1 Natriumtransportraten und Gewebeleitfähigkeit in Abhängigkeit vom osmotischen Druck der luminalen Lösung

Die Tabelle 4.17 faßt die über die drei Fluxperioden gemittelten unidirektionalen Natriumtransportraten und die Gewebeleitfähigkeit für die drei Versuchsgruppen (300, 350 bzw. 450 mosmol/l) zusammen.

Tabelle 4.17: Auswirkungen eines erhöhten osmotischen Druckes der luminalen Lösung durch Mannit auf den Natriumtransport [Mittelwert \pm SEM, unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Spalte kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Behandlungsgruppen, $p < 0,05$]

Osmolarität [mosmol/l]	J_{ms}^{Na} *	J_{sm}^{Na} *	J_{net}^{Na} *	G_t [mS \cdot cm ⁻²]	I_{sc} *	N/n
300 (Kontrolle)	2,60 \pm 0,17	0,81 \pm 0,07 ^a	1,79 \pm 0,14 ^a	1,75 \pm 0,10 ^a	0,83 \pm 0,08	6/11
350	2,32 \pm 0,17	0,96 \pm 0,12 ^a	1,36 \pm 0,09 ^b	1,82 \pm 0,12 ^a	0,66 \pm 0,11	6/11
450	2,18 \pm 0,18	1,26 \pm 0,11 ^b	0,92 \pm 0,12 ^b	2,91 \pm 0,22 ^b	0,62 \pm 0,09	6/12

* [μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹]

Wie in den Versuchen zur Elektrophysiologie (Kapitel Nr. 4.2.1.1) steigt die Leitfähigkeit erst bei einer Erhöhung des osmotischen Druckes auf 450 mosmol/l signifikant an [$p < 0,05$ zur Kontrolle], während bei einem erhöhten osmotischen Druck von 350 mosmol/l statistisch kein Unterschied zur Kontrollgruppe nachgewiesen wurde. Parallel zu dem Anstieg von G_t verhält sich auch der Natriumtransport von der serosalen zur mukosalen Gewebeseite; erst bei einem osmotischen Druck von 450 mosmol/l ist eine signifikante Zunahme von J_{sm}^{Na} festzustellen [$p < 0,05$ zur Kontrolle]. Bei dem ms-Flux von Natrium kann zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Nettonatriumresorption (J_{net}^{Na}) wird durch die Zunahme des osmotischen Druckes signifikant reduziert [$p < 0,05$].

Verglichen mit den Ergebnissen der entsprechenden Versuchsreihe bei den heugefütterten Schafen (Kapitel Nr. 4.1.2.2.1, Tabelle 4.6) tritt bei den „Kraftfutter-Tieren“ erst bei einem

erhöhten osmotischen Druck von 450 mosmol/l ein signifikanter Anstieg der Leitfähigkeit und des sm-Fluxes von Natrium auf. Einem Druck von 350 mosmol/l hält das Epithel aufgrund seiner fütterungsbedingten Anpassungsfähigkeit an veränderte osmotische Druckverhältnisse noch stand.

Tabelle 4.18 enthält die nach der Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen über zwei Fluxperioden gemittelten Werte der Natriumtransportraten und der Gewebeleitfähigkeit.

Tabelle 4.18: Natriumtransport unter Kontrollbedingungen (300 mosmol/l) nach unterschiedlicher osmotischer Vorbehandlung [Mittelwert \pm SEM, es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Behandlungsgruppen mehr festgestellt]

Vorbehandlung (osmotischer Druck in mosmol/l)	J_{ms}^{Na} *	J_{sm}^{Na} *	J_{net}^{Na} *	G_t [mS \cdot cm ⁻²]	I_{sc} *	N/ n
300 (Kontrolle)	2,90 \pm 0,28	0,92 \pm 0,13	1,98 \pm 0,24	1,70 \pm 0,10	0,64 \pm 0,06	6/11
350	2,17 \pm 0,26	0,78 \pm 0,12	1,41 \pm 0,15	1,50 \pm 0,08	0,60 \pm 0,08	6/11
450	2,22 \pm 0,26	0,70 \pm 0,07	1,51 \pm 0,22	1,60 \pm 0,08	0,66 \pm 0,07	6/12

* [μ eq \cdot cm⁻² \cdot h⁻¹]

Wie in Kapitel Nr. 4.1.2.2.1 (Tabelle 4.7) kann auch hier nach der Beseitigung des osmotischen Gradienten statistisch kein Unterschied mehr zwischen der Kontrolle und den beiden Behandlungsgruppen mehr festgemacht werden. Die Auswirkungen des erhöhten osmotischen Druckes auf die Gewebeleitfähigkeit und die Transportraten sind vollständig reversibel, es wird demnach kein bleibender Schaden am Epithel angerichtet.

J_{sm}^{Na} ist in Abhängigkeit von G_t in der Abbildung 4.22 grafisch dargestellt. Der Abbildung ist zu entnehmen, daß die Veränderung der Leitfähigkeit zum großen Teil parazellulär bedingt ist und somit den parazellulären und passiven Transport von Natrium in die mukosale Richtung erhöht.

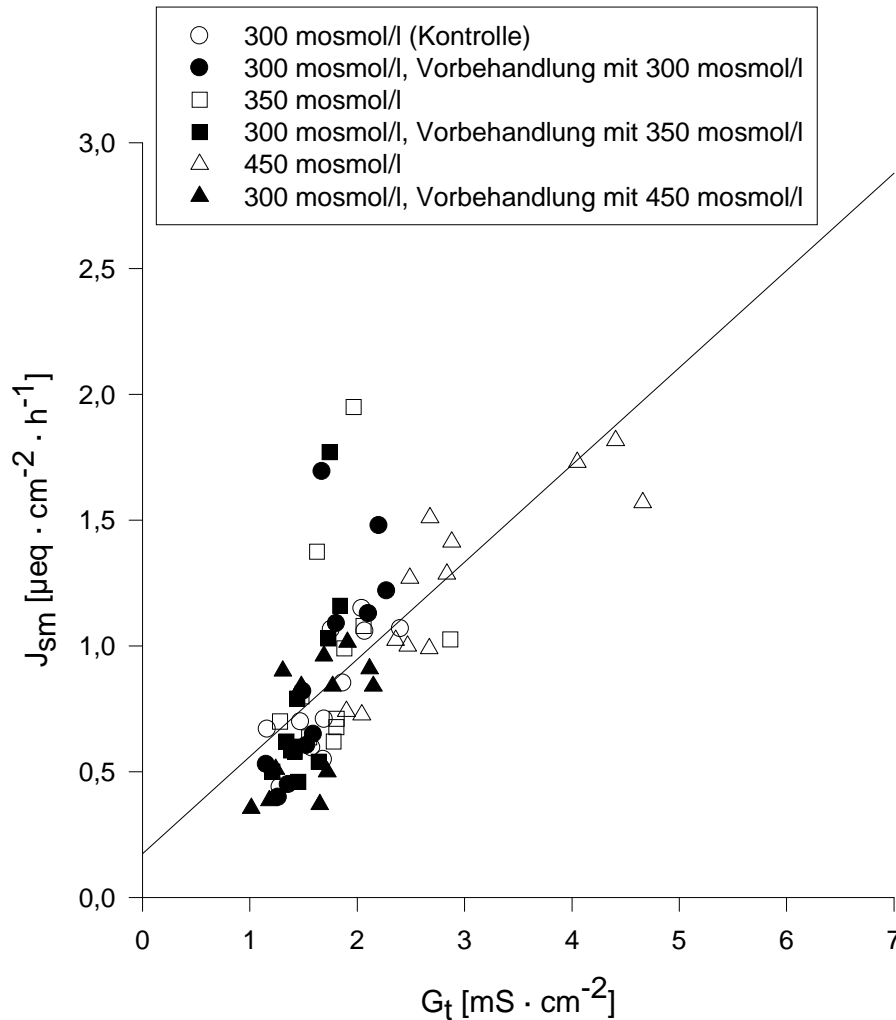


Abbildung 4.22: J_{sm}^{Na} in Abhängigkeit von der Gewebeleitfähigkeit (G_t); Darstellung der über die drei Fluxperioden gemittelten Werte für die einzelnen Epithelien [$N = 6$, n bei 300 und 350 mosmol/l = 11, n bei 450 mosmol/l = 12]. Die verschiedenen unausgefüllten Symbole kennzeichnen die drei Versuchsgruppen (300 = Kontrolle, 350 und 450 mosmol/l). Die entsprechenden schwarzen Symbole stellen diese drei Gruppen nach der Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen bei 300 mosmol/l dar. Es wurde allen Werten eine Regressionsgerade angepaßt: $y = 0,18 + (0,39 \cdot x)$, $r^2 = 0,48$, $SEE = 0,28$, $p < 0,0001$

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die mukosale Erhöhung des osmotischen Druckes verursacht einen signifikanten Anstieg der Gewebeleitfähigkeit (G_t), wobei zwischen der Leitfähigkeitsveränderung (ΔG_t) und der Osmolarität der mukosalen Pufferlösung ein linearer Zusammenhang besteht. Die Veränderungen der Gewebeleitfähigkeit sind überwiegend *parazellulär* bedingt, was durch die enge lineare Beziehung zwischen G_t und den unidirektionalen Chromtransportraten (J_{sm}^{Cr} und J_{ms}^{Cr}) bzw. zwischen G_t und J_{sm}^{Na} sowie durch die Ermittlung der PD_t -abhängigen und -unabhängigen Anteile der unidirektionalen Natriumfluxe zum Ausdruck kommt.

Die durch den erhöhten osmotischen Druck verursachte Reduzierung der Nettoresorption von Natrium (J_{net}^{Na}) ist eine Folge des Anstiegs von J_{sm}^{Na} bei einer gleichzeitigen Abnahme von J_{ms}^{Na} . Die Abnahme von J_{ms}^{Na} weist auf eine osmotisch bedingte Störung des aktiven transzellulären Natriumtransportes hin, was durch die Bestimmung des PD_t -abhängigen und -unabhängigen Anteils des ms-Fluxes von Natrium bestätigt wird.

Die Effekte eines erhöhten osmotischen Druckes auf die Gewebeleitfähigkeit sind nach der Wiederherstellung isoosmotischer Bedingungen vollständig reversibel; eine bleibende Beschädigung des Pansenepithels ist daher auszuschließen.

Die durch den osmotischen Druck verursachten Veränderungen der elektrophysiologischen Parameter fallen bei den Pansenepithelien der mit Kraftfutter gefütterten Schafe deutlich geringer aus als bei den Epithelien der heugefütterten Schafe. Eine durch die Fütterung von Kraftfutter induzierte Adaptationsfähigkeit des Pansenepithels an erhöhte mukosale osmotische Druckverhältnisse wird somit nachgewiesen.