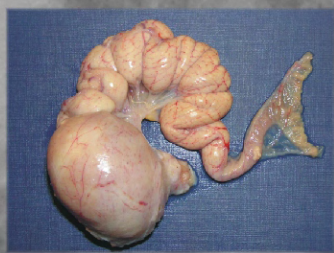
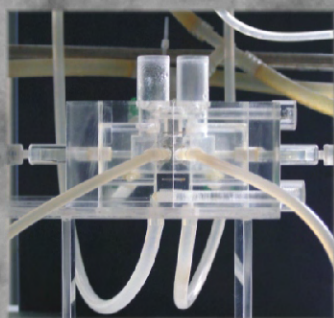


**BASALE CHARAKTERISIERUNG UND  
REGULATION DES ELEKTROLYTTTRANSPORTES  
ÜBER DAS UTERUSEPITHEL DES HAUSHUHNES  
(*Gallus gallus domesticus*)**

**KIRSTEN BROCKMEIER**



**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**édition scientifique  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Betreuer: PD Dr. Gerhard Schultheiss**

**Basale Charakterisierung und Regulation des  
Elektrolyttransportes über das Uterusepithel des  
Haushuhns (*Gallus gallus domesticus*)**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von  
**Kirsten Brockmeier**  
Tierärztin aus Lich

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: PD Dr. G. Schultheiss  
Prof. Dr. W. Clauss

Tag der Disputation: 09.03.2007



# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1. Abkürzungen und Definitionen</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1. Anatomie der weiblichen Geschlechtsorgane.....	3
2.2. Histologischer Aufbau der Uteruswand .....	7
2.3. Ovulation, Eibildung und Passagezeiten .....	10
2.4. Blutversorgung und Innervation.....	13
2.5. Die Eischale.....	15
2.6. Calciumstoffwechsel und -transport über das Uterusepithel.....	18
2.6.1 Die Bedeutung des Calciums für die Schalenbildung.....	18
2.6.2 Einfluss der Gewebeeigenschaften auf den Ca <sup>2+</sup> -Transport.	20
2.6.3 Calciumaufnahme, -speicherung und -bereitstellung .....	21
2.6.4 Schalenqualität.....	22
2.6.5 Die Calciumsekretion am Uterusepithel .....	23
2.6.6 Transportwege für Calcium .....	25
2.6.7 Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Ionen .....	27
2.7. Überblick über die elektrophysiologischen Untersuchungen an der Schalendrüse.....	29
2.8. Eigene Fragestellung.....	31
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
3.1. Material.....	32
3.1.1 Versuchstiere .....	32
3.1.2 Gewebepräparation.....	32
3.1.3 Lösungen.....	34

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.4	Chemikalien und Isotope .....	38
3.2.	Methoden .....	40
3.2.1	Ussingkammer-Versuche .....	40
3.2.2	Radioisotopen-Versuche .....	45
3.2.3	Elektrische Feldstimulation (EFS) .....	48
3.2.4	Bikarbonatspektroskopie .....	50
3.2.5	Histologische Präparate .....	51
3.2.6	Statistik .....	53
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
4.1.	Standardisierung von Kurzschlussstrom und Leitfähigkeit .....	54
4.2.	Kationenbewegungen über das Uterusepithel .....	57
4.2.1	Natriumbewegungen über das Uterusepithel .....	57
4.2.2	Kaliumbewegungen über das Uterusepithel .....	61
4.2.3	Calciumbewegungen über das Uterusepithel .....	63
4.3.	Anionenbewegungen über das Uterusepithel .....	72
4.3.1	Chloridbewegungen über das Uterusepithel .....	73
4.3.2	Bikarbonatbewegungen über das Uterusepithel .....	76
4.4.	Regulation der Ionenbewegungen über das Uterusepithel .....	76
4.4.1	Subepitheliale Regulationsmechanismen .....	77
4.4.2	cAMP-Beteiligung .....	78
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>90</b>
5.1.	Rahmenbedingungen für die Versuchsdurchführung .....	90
5.2.	Regulationsmechanismen am Uterusepithel .....	93

## Inhaltsverzeichnis

---

5.3. Kationenbewegungen über das Uterusepithel.....	94
5.3.1 Natriumbewegungen über das Uterusepithel .....	94
5.3.2 Kaliumbewegungen über das Uterusepithel.....	100
5.3.3 Calciumbewegungen über das Uterusepithel.....	102
5.4. Anionenbewegungen über das Uterusepithel.....	108
5.4.1 Bikarbonatbewegungen über das Uterusepithel .....	108
5.4.2 Chloridbewegungen über das Uterusepithel .....	112
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>115</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>116</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>117</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>125</b>
<b>10. Erklärung .....</b>	<b>127</b>





## 1. Abkürzungen und Definitionen

293B	Trans-6-cyano-4-(N-ethylsulfanyl-N-methylamino)-3-hydroxy-2,2-dimethylchroman
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
B	Bestimmtheitsgrad
Ba <sup>2+</sup>	Barium
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
DCB	Dichlorobenzamil
DIDS	4,4-Diisothiocyanato-stilben-2,2`-disulfonsäure Dinatrium Hydrat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPC	Diphenylaminocarbonsäure
EGTA	Ethylenglycol bis-(beta-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
ENaC	Epithelialer Na <sup>+</sup> -Kanal
G <sub>t</sub>	Gewebeleitfähigkeit. Sie ist der Kehrwert des Gewebewiderstandes und wird in mS·cm <sup>-2</sup> angegeben.
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethanolsulfonsäure)
I <sub>sc</sub>	Kurzschlussstrom. Das ist der transepitheliale Stromfluss unter Bedingungen, bei dem die transepitheliale Potentialdifferenz auf 0 mV geklemmt wurde. Er wird in μEq·h <sup>-1</sup> ·cm <sup>-2</sup> angegeben, also als Ladungsverschiebung pro Zeit und freier Gewebsfläche, wobei 1 μEq·h <sup>-1</sup> ·cm <sup>-2</sup> = 26.9 μA·cm <sup>-2</sup> entspricht.
J <sub>Rb/ Na/ Cl/ Ca</sub>	Ionenfluss von Rb <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Cl <sup>-</sup> , Ca <sup>2+</sup>
J <sub>ms</sub>	Unidirektionaler Ionenfluss von mucosal nach serosal
J <sub>sm</sub>	Unidirektionaler Ionenfluss von serosal nach mucosal
J <sub>net</sub>	Nettoionenbewegung. Sie wird aus der Differenz der gemessenen Fluxrate von mucosal nach serosal (J <sub>ms</sub> ) und serosal nach mucosal (J <sub>sm</sub> ) berechnet. Sie wird in μmol·h <sup>-1</sup> ·cm <sup>-2</sup> angegeben.

## Abkürzungen und Definitionen

---

La <sup>3+</sup>	Lanthan
μEq	Mikro-Equivalent
m	mucosal
min	Minute
NMDG	N-Methyl-D-Glucamin
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoesäure
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PD	Potentialdifferenz
s	serosal
SPF	Spezifisch pathogenfrei
SEM	Standard error of the mean (mittlerer Fehler des Mittelwertes)
TPeA	Tetrapentylamonium
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
v/v	Volumenanteil (Volumen pro Volumen)
w/v	Gewichtsanteil (Gewicht pro Volumen)

## 2. Einleitung

### 2.1. Anatomie der weiblichen Geschlechtsorgane

Die weiblichen Geschlechtsorgane der Vögel bestehen, wie beim Säuger, aus dem *Eierstock* (Ovarium) und dem *Eileiter* (Oviductus). In der Evolution haben sie sich jedoch vom Säuger stark abweichend entwickelt. Wie bei den meisten Vogelarten ist auch beim Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) in der Regel nur das linke Ovar mit dem dazugehörigen Oviductus ausgebildet. Die Entwicklung des rechten Ovars und des rechten Oviductus verläuft ab dem 4. Tag der embryonalen Genese deutlich langsamer als die der linken Seite und bilden sich ab dem 10. Tag sogar zurück [Hutson et al., 1985]. Der Hintergrund dieser Prozesse wird kontrovers diskutiert. Eine Reduktion des Gewichtes für bessere Flugeigenschaften scheint zunächst einleuchtend, jedoch sind gerade bei einigen wahren Flugexperten, wie den Greifvögeln, oftmals beide Uterushörner voll entwickelt (zum Beispiel beim Habicht in 65 % der untersuchten Tiere) [Hummel, 2000].

Das mature Ovar des Haushuhnes wächst bis zur Legeperiode auf einen Umfang von etwa 10 x 7 cm heran; es berührt den caudalen Pol der linken Niere. Seine Form variiert stark je nach Anzahl und Größe der Follikel. Zucht- und Rasse-abhängig sind bis zu 3600 Eianlagen sichtbar [Scholtysseck, 1987]. Sprungreife Eizellen, d.h. die fertigen Dotterkugeln, haben durchschnittlich eine Größe von 30-40 mm und ein Gewicht von 15-18 g. Das Ovar ist über das Mesovarium fixiert, das nur wenige mm lang ist und aus dem Peritoneum hervorgeht.

Der *Oviductus*, der aufgrund seiner Länge und seines dünnarmähnlichen Aussehens auch als Legedarm bezeichnet wird, lässt sich in 5 Abschnitte gliedern (s. Abb. 1). Dem caudalen Pol des Ovars schließt sich direkt das

Infundibulum an; es folgen Magnum, Isthmus, Uterus (Schalendrüse) und Vagina.

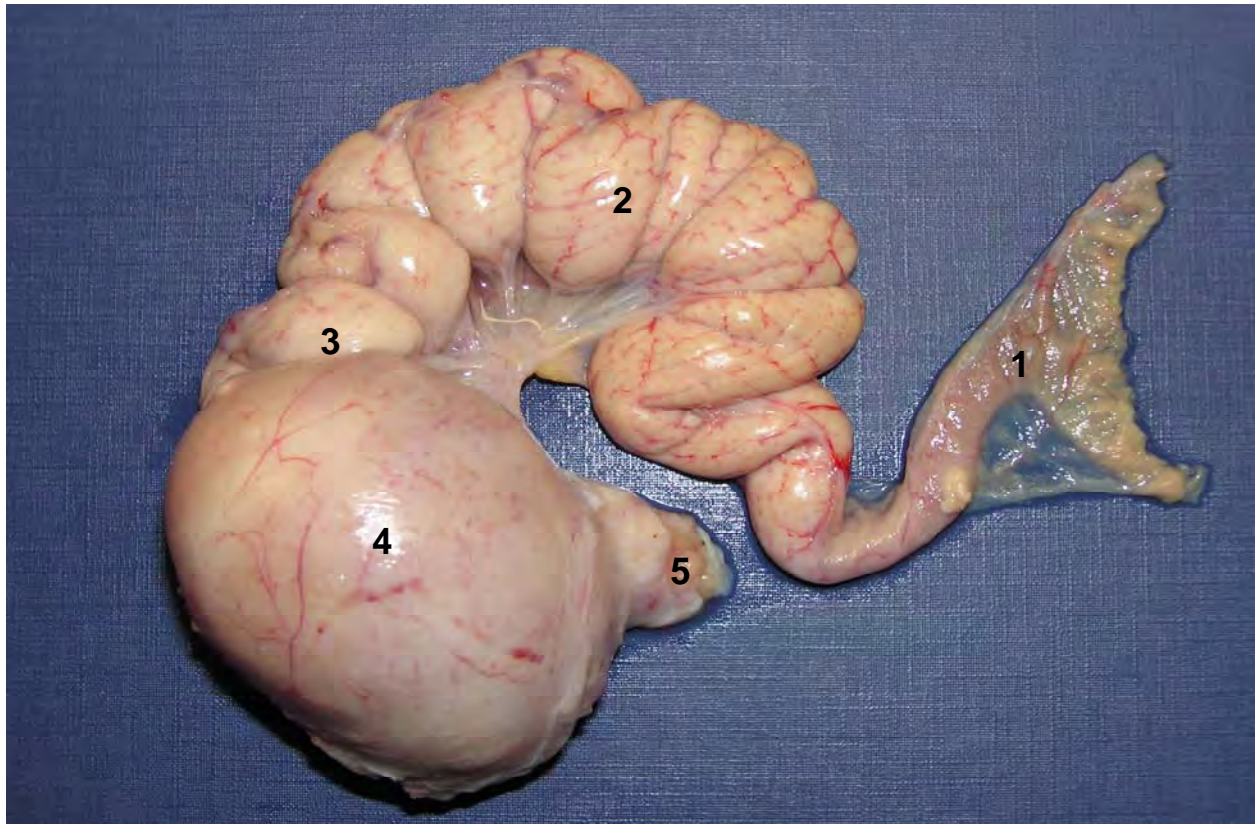


Abb. 1: Legedarm mit Infundibulum (1), Magnum (2), Isthmus (3), Uterus mit Ei (4) und Vagina (5)

Die dorsale Aufhängung des Oviductus geht als Ligamentum dorsale oviductus ebenfalls aus dem Peritoneum hervor, umschließt den Oviductus, vereinigt sich erneut zum Ligamentum ventrale oviductus und endet hier mit einem freien Rand [Nickel et al., 1992]. Das Gekröse dient der Fixierung bei flexibler Lagerung und führt die notwendigen Blut- und Nervenbahnen zum Oviductus (s. Kap. 2.4).

Das Infundibulum liegt dem Ovar eng an, ohne direkten Kontakt aufzunehmen. Wenige Fimbriae infundibularis umrahmen eine ca. 80 mm große Öffnung, das Ostium infundibulare, das die Dotterkugel nach der Ovulation aktiv aufnimmt [Johnson, 1999] und in den ca. 60-80 mm langen



Tubus infundibularis gleiten lässt. Die Schleimhaut liegt hier in hohen Primär- und Sekundärfalten (s. Abb. 2).

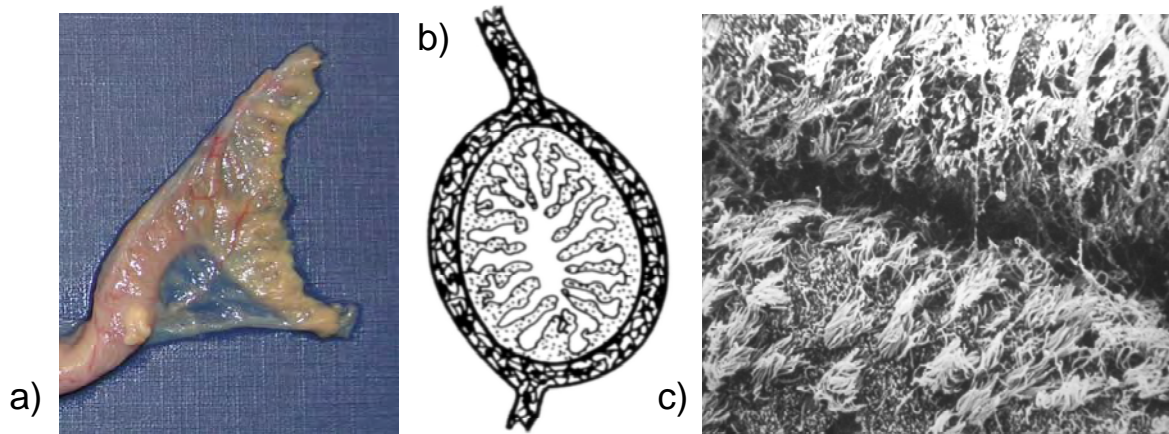


Abb. 2: Darstellung des Infundibulums: a) fotografisch, b) schematisch-histologisch [Hummel, 2000] und c) rasterelektronenmikroskopisch [Malo Vergara, 1987]

Das sich anschließende Magnum ist als der längste Abschnitt des Oviductus 30-40 cm lang. Es bildet engliegende Schlingen und verleiht dem Oviductus sein dünndarmähnliches Aussehen. Spiralige Schleimhautfalten füllen das Lumen nahezu vollständig aus (s. Abb. 3).

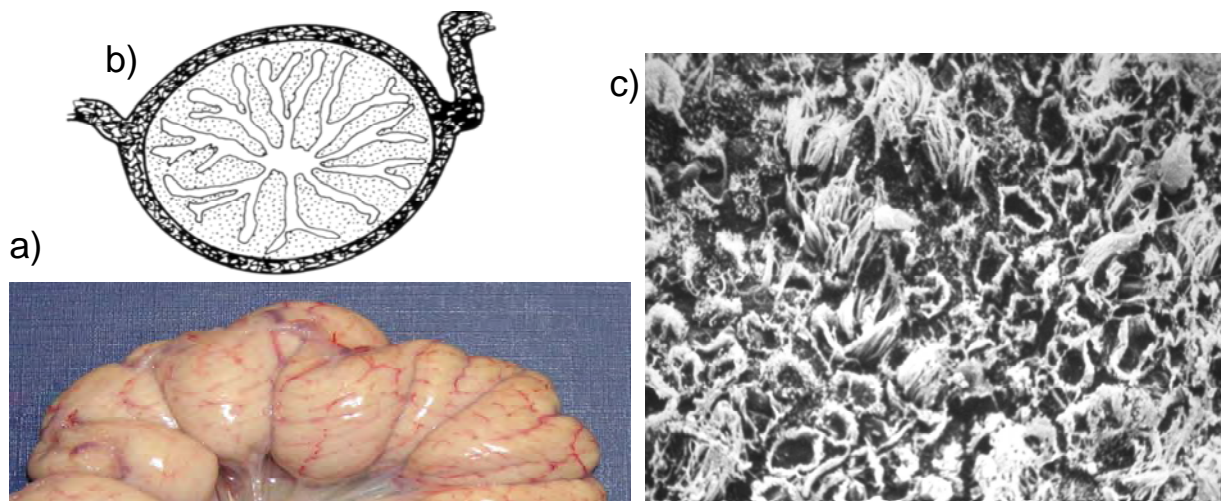


Abb. 3: Darstellung des Magnums: a) fotografisch b) schematisch-histologisch [Hummel, 2000] und c) rasterelektronenmikroskopisch [Malo Vergara, 1987]

Durch einen schmalen, drüsenfreien Streifen ist das Magnum von der Eileiterenge, dem 8-10 cm langen Isthmus, getrennt [Hummel, 2000]. Die Schleimhautfalten werden hier wieder niedriger, tragen aber weiterhin Sekundärfalten (s. Abb. 4).

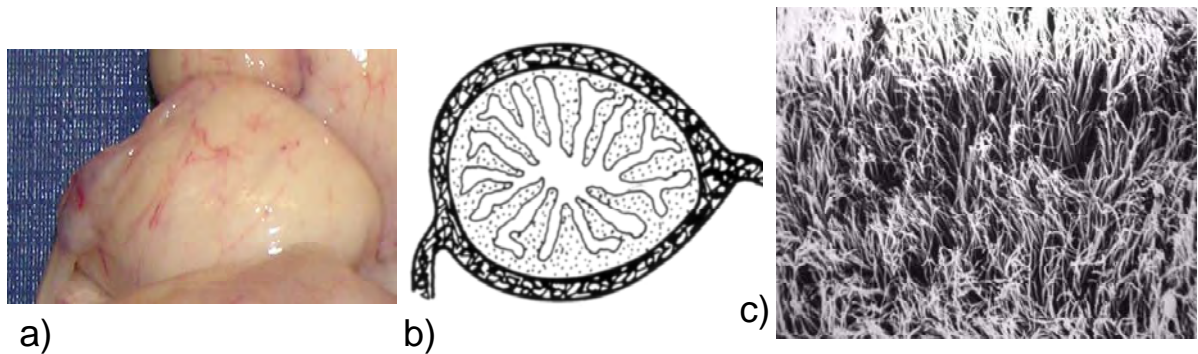


Abb. 4: Darstellung des Isthmus: a) fotografisch, b) schematisch-histologisch [Hummel, 2000] und c) rasterelektronenmikroskopisch [Malo Vergara, 1987]

Den weitulmigsten Abschnitt des Legedarms bildet der Uterus. Er hat einen Durchmesser von etwa 3 cm, die Schleimhautfalten sind hier lang und schmal ausgebildet (s. Abb. 5). Außerdem zeichnet sich die Schalendrüse durch eine besonders kräftige Muskelschicht aus (s. auch Abb. 7). Man unterteilt den Uterus in die schmale Pars cranialis uteri, in die sich sackförmig weitende Pars major uteri und in den sich wieder verjüngenden Recessus uterinus.

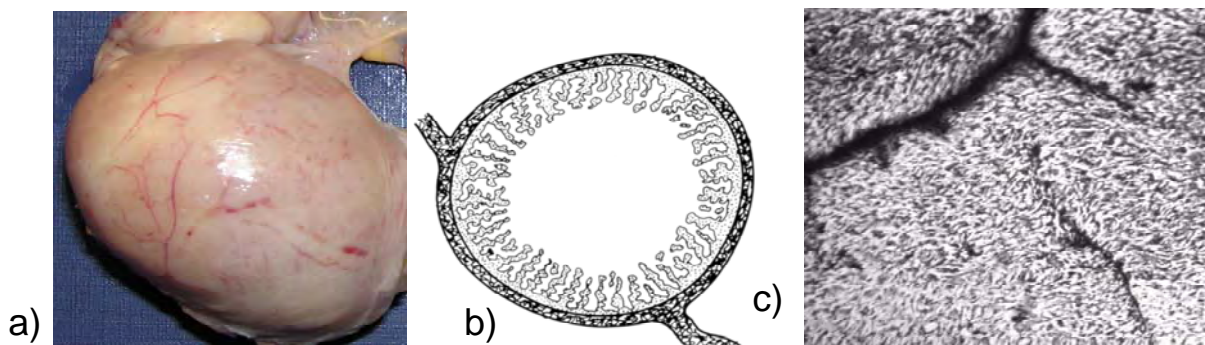


Abb. 5: Darstellung des Uterus mit Ei: a) fotografisch, b) schematisch-histologisch [Hummel, 2000] und c) rasterelektronenmikroskopisch [Malo Vergara, 1987]

Ein starker Muskelring, der *Musculus sphincter vaginae*, bildet den Übergang zur etwa 8 cm langen Vagina. Die Schleimhaut bildet tiefe Taschen, in denen das Sperma nach dem Deckakt über mehrere Wochen vital bleibt (s. Abb. 6). Die Drüsen nehmen von cranial nach caudal deutlich ab und die Vagina mündet schließlich mit dem *Ostium cloacale oviductus sinistri* in das Urodäum [Nickel et al., 1992].

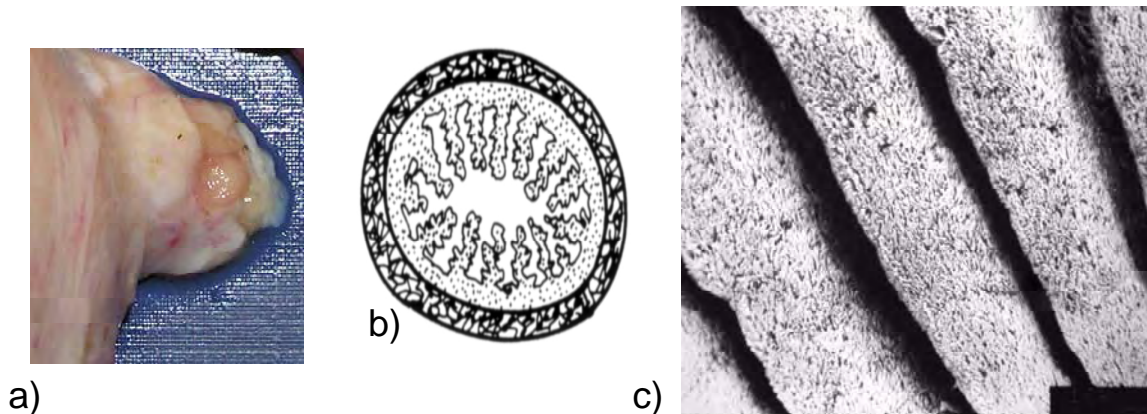


Abb. 6: Darstellung der Vagina: a) photographisch, b) schematisch-histologisch [Hummel, 2000] und c) rasterelektronenmikroskopisch [Malo Vergara, 1987]

## 2.2. Histologischer Aufbau der Uteruswand

Die Wand des Oviductus besteht in allen Abschnitten aus drei Schichten: Der Tunica mucosa, der Tunica muscularis und der Tunica serosa (s. Abb. 7).

Die Tunica mucosa gibt jedem Oviductusabschnitt durch die unterschiedliche Ausprägung der Schleimhautfalten ein eigenes Aussehen (s. Abb. 2-6). An ihr lassen sich die Lamina epithelialis mucosae und die Lamina propria mucosae (s. Abb. 7+8) unterscheiden.



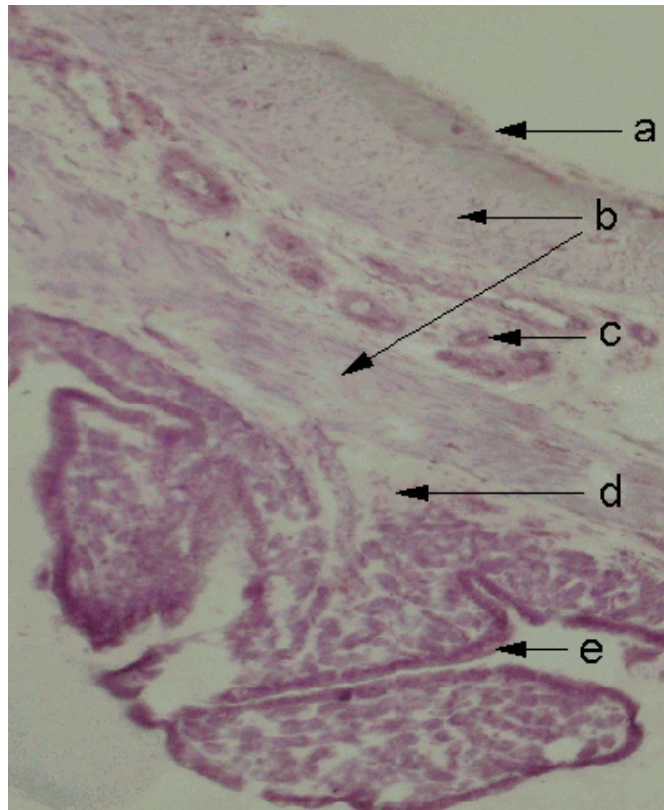


Abb. 7: Querschnitt durch das Uterusgewebe auf Höhe einer Schleimhautzotte mit: Tunica serosa (a), Tunica muscularis (b) mit eingebetteter Gefäßschicht (c), Lamina propria (d) und Lamina epithelialis (e) der Tunica mucosa

In der Schalendrüse, dem Uterus, besteht die Lamina epithelialis aus zwei unterschiedlichen Zelltypen. Sie werden je nach der Lage ihrer Zellkerne als apikale oder basale Zellen bezeichnet.

Die apikalen Zellen enthalten sekretorische Granula und weisen an ihrer Oberfläche Kinozilien und Mikrovilli auf. Hingegen erreichen die Basalzellen nur mit einer dünnen Spitze die Epitheloberfläche, an der sie Mikrovilli tragen.

Die Lamina propria enthält tubulär-verzweigte Drüsen, die Glandulae uterinae. In ihrem Zytoplasma findet man gegenüber anderen Abschnitten des Oviductus nur wenig Sekretionsgranula.



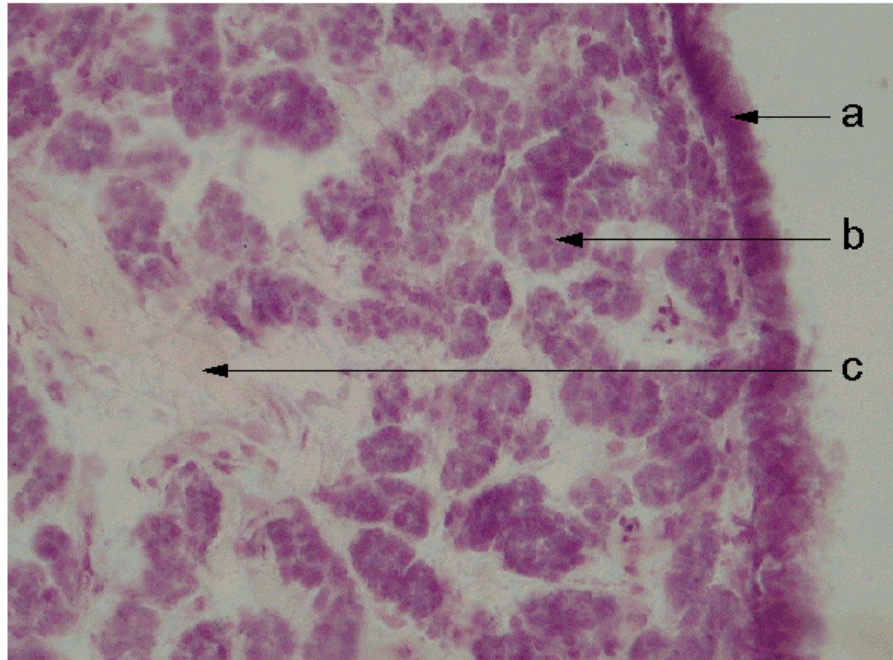


Abb. 8: Tunica mucosa einer Zottenspitze der Uterusschleimhaut mit: Lamina epithelialis (a), Lamina propria: drüsiger Anteil (b) und bindegewebiger Anteil (c)

Eine abschließende Zuordnung der Funktion der einzelnen Zelltypen ist bislang nicht möglich. Breen und Bruyen [1969] zeigten, dass beide Typen der zilientragenden Zellen an der Produktion der organischen Matrix durch Sekretion proteinhaltiger Granula beteiligt sind.

Die Basalzellen enthalten in ihren Sekretionsgranula saure Mucopolysaccharide, die vom Golgiapparat gebildet werden.

Die Zellen des Drüsenepithels sollen an der Sekretion calciumhaltiger Flüssigkeit beteiligt sein, wobei hierüber bislang nur spekuliert werden kann [Breen & Bruyn, 1969].

### 2.3. Ovulation, Eibildung und Passagezeiten

Am linken Eierstock entwickelt sich der sprungreife Follikel über die Zwischenstufe der grau-gelben Oogonie, einer etwa 5 mm großen Zelle, zur Oozyte und dann zur Oozyste. Schließlich, durch Einlagerung von Dotter, entsteht die sprungreife Dotterkugel mit etwa 30-40 mm Durchmesser; diese Entwicklungsstufen werden in etwa 4 Wochen durchlaufen. Damit stellt der sprungreife Follikel der Vögel die größte Einzelzelle im Tierreich dar.

Das Dottermaterial lagert sich unter dem Einfluss gonadotroper Hormone, vorwiegend des follikelstimulierenden Hormons (FSH), das aus der Adenohypophyse stammt, im Zytoplasma der Oozyste ein. Die Bildung des Dottermaterials erfolgt fast ausschließlich unter Östrogenstimulierung in der Leber [Nickel et al., 1992].

Der Hauptbestandteil des Dottermaterials setzt sich aus ca. 33 % Fetten, 16 % Proteinen und 49 % Wasser zusammen und enthält wichtige Aminosäuren, ungesättigte Fettsäuren, Mineralien und Vitamine [Scholtyssek, 1987].

Kurz nach dem Abschluss der ersten Reifeteilung kommt es zur Ovulation, die beim Haushuhn etwa eine halbe Stunde nach Ablage des vorangegangenen Eies erfolgt. Ausgelöst wird dieser Prozess durch das luteinisierende Hormon (LH), das ebenfalls aus der Adenohypophyse freigesetzt wird. Die genauen Mechanismen hierfür sind noch nicht restlos geklärt [Hummel, 2000].

Die Gesamtdauer der Eibildung von der Ovulation bis zur Eiablage beträgt beim Huhn zwischen 24 und 28 Stunden [Johnson, 1999], dabei verweilt das Ei etwa 20 Stunden im Uterus, weshalb dieser Abschnitt des Legedarms auch als Eihalter bezeichnet wird.

Das Infundibulum umhüllt den sprungreifen Follikel aktiv [Johnson, 1999], es ist der Ort der Fertilisation. Ein Teil der Spermien erreicht etwa 25 bis 30 Minuten nach dem Deckakt die zu befruchtende Eizelle, während der Großteil jedoch in Schleimhautfalten der Vagina gespeichert wird. Findet keine Befruchtung statt, so kommt es nichtsdestotrotz zum vollständigen Abschluss der Eibildung.

Im Infundibulum erfolgt bereits die Anlagerung der ersten Albumenlage (s. u.). Nach etwa 18 Minuten tritt das Ovum in das Magnum über. Hier verweilt es zwischen 2 und 3 Stunden und wird mit dem Großteil der endgültigen Albumenmasse umhüllt. Die Albumenmasse besteht aus sich abwechselndem dick- und dünnflüssigem Material, die in 4 Schichten das Eigelb umschließen (s. Abb. 9). Sie unterscheiden sich vor allem in ihrer Zusammensetzung. Zusätzlich entstehen im Magnum aus der innersten, dickflüssigen Eiklarschicht die Chalazaeen (Hagelschnüre). Sie dienen der Fixierung der Dotterkugel im Zentrum des Eies, lassen aber dennoch eine Rotation um die Längsachse zu. Ein weiterer funktioneller Bestandteil dieser Lagefixation ist der Bildungsdotter, der unterhalb der Keimscheibe gelegen, wie ein Pendel wirkt und somit die dorsale Lage der Keimscheibe garantiert.

## Einleitung

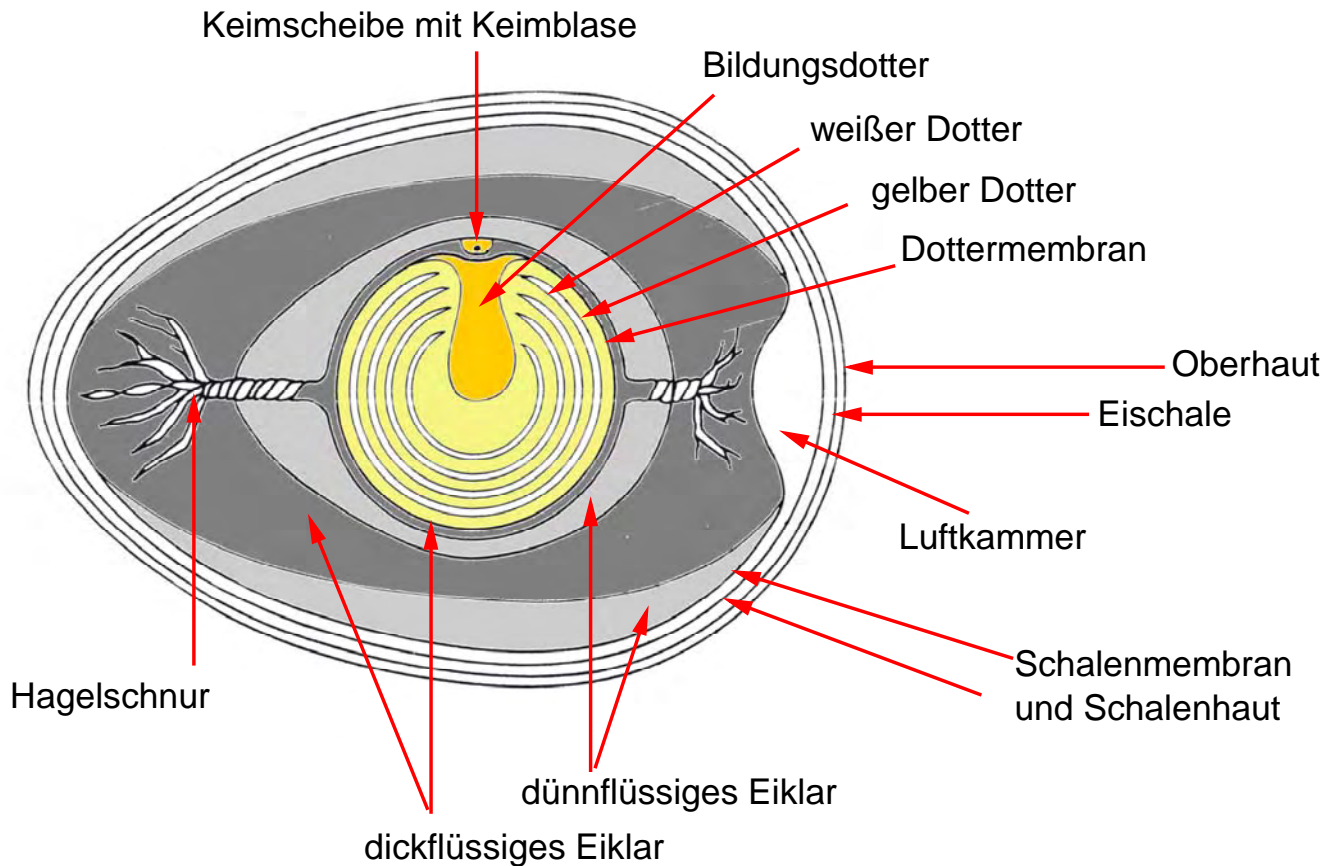


Abb. 9: Schematische Darstellung des Aufbau eines Eies [modifiziert nach Scholtyssek, 1987]

Während weiterer 1 bis 2 Stunden durchläuft das Ovum die „Enge“, den Isthmus, wo vor allem die Bildung der inneren und äußeren Schalenmembran abläuft.

Die nächsten 18 bis 21 Stunden verweilt das Ei in der Schalendrüse, dem Uterus, wo in einer ersten Phase des so genannten „plumpings“ etwa 15 g Flüssigkeit in das Albumen aufgenommen wird, die von tubulären Drüsen sezerniert wird und ein Gemisch aus Carboanhydrasen, sauren Phosphatasen, Esterasen sowie Bikarbonat enthält [Salevsky & Leach, 1980]. Diese Flüssigkeitsaufnahme in das Albumen ist ein sekundärer Effekt auf eine vorangegangene Ionensekretion und führt zu einem Spannen der Schalenmembranen.



In einer zweiten Phase lagern sich nun Proteine an die äußere Schalenmembran an, die zum Aufbau der organischen Matrix der Schale benötigt werden. Sie bilden ein eng verflochtenes Netz aus kreatinhaltigen Fasern, in die sich dann die anorganische Füllsubstanz einlagert. Im Prinzip gleicht die Schale somit in ihrem Aufbau dem Bau des Knochens.

In einer dritten Phase schließt sich die eigentliche Kalzifikation der Schale an. Außerdem erfolgt im Uterus auch die Pigmentation der Eischale.

Der Übertritt des Eies in die Vagina wird durch den uterovaginalen Sphinktermuskel gesteuert. Das Ei passiert diesen Abschnitt in nur 5 bis 10 Minuten, in denen es mit dem Eioberhäutchen, der mucinhaltigen Cuticula, überzogen wird. Diese bildet eine weitere Schutzschicht gegen das Eindringen von Keimen. Die Vagina stülpt sich für die Eiablage nach außen, so dass das Ei nicht mit der Kloake in Berührung kommt und keine Verschmutzung mit Kot oder Urin während des Durchtritts durch das Urodäum entstehen kann.

### **2.4. Blutversorgung und Innervation**

Die arterielle Blutversorgung des Legedarms setzt sich aus der Arteria oviductalis cranialis, der Arteria oviductalis cranialis accessoria, der Arteria oviductalis media und der Arteria oviductalis caudalis zusammen. Die A. oviductalis cranialis entspringt dem gemeinsamen Stamm der A. renalis cranialis und der A. ovarica sinister; die A. oviductalis cranialis accessoria zweigt von der A. iliaca externa ab; die A. oviductalis media ist ein Beckenast der A. ischiadica und die A. oviductalis caudalis geht aus der A. pudenda sinister hervor.

Der Endabschnitt des Oviductus wird von der A. vaginalis versorgt, die ebenfalls aus der A. pudenda sinister hervorgeht [Nickel et al., 1992].

Sie bilden ein weitverzweigtes Anastomosengeflecht, das sich dorsal wie ventral des Legedarmes entlang zieht und in feinsten fenestrierten Kapillaren mündet. Wie auch in Nierenglomeruli sind sie Ausdruck einer ausgeprägten Steigerung der Produktion und Resorption von Gewebsflüssigkeiten.

Dieses dichte und verzweigte arterielle Netz sichert die um ein Vielfaches gesteigerte Blutzufuhr während der Legeperiode, auch zur Gewährleistung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung des Gewebes, da der Calciumtransport zur Schalenbildung bei Sauerstoffmangel stark eingeschränkt ist (s. u.).

Die Innervation erfolgt sympathisch aus Ästen des Plexus aorticus und renalis für Infundibulum und Magnum und durch Äste des Nervus hypogastricus für den Uterus [Johnson, 1999]. Parasympathisch wird der Legedarm durch Äste der 8. und 9. Lumbosakralnerven [Nickel et al., 1992] innerviert. Nervale Stimuli scheinen aber keinen regulatorischen Einfluss auf die Sekretionsvorgänge in der Schalendrüse zu haben [Eastin & Spaziani, 1978a].

Die Kontraktilität des Uterus soll durch ein hypophysäres Hormon gesteuert werden, denn es konnte ein Arginin-Vasotocin-Rezeptor nachgewiesen werden, der zum Zeitpunkt der Eiablage im Gewebe exprimiert wird [Takahashi et al., 1997]. Bisläng ist jedoch unklar, wodurch es zum Einbau der durch Takahashi et al. erforschten Arginin-Vasotocin-Rezeptoren zum Zeitpunkt der Eiablage kommt.

### 2.5. Die Eischale

Die Eischale hat neben ihren natürlichen Funktionen für die Entwicklung des Embryos, dem sie als Calciumspeicher für dessen Knochenbildung dient, auch wirtschaftlich eine große Bedeutung erlangt. Die Eischalenqualität ist von entscheidender Bedeutung für die Optimierung der oftmals technisierten Vorgänge in der kommerziellen Vermarktung des Produktes Ei. Daher ist das Wissen über den genauen Aufbau und die Bildung der Eischale immer stärker in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Denn aus wirtschaftlicher Sicht soll der finanzielle Verlust aufgrund von Bruch- und Knickeiern durch Optimierung der Haltungs- und Fütterungsbedingungen so gering wie möglich gehalten werden.

Zudem dient die Eischale in der Hühnerhaltung diagnostischen Zwecken, da einige virale Erkrankungen, z.B die infektiöse Bronchitis und das egg-drop-Syndrom durch Veränderungen der Schalenqualität erkennbar sind.

Die Schale besteht zu 97 % aus  $\text{CaCO}_3$  und besitzt eine sehr hohe Stabilität. Ein normales Hühnerei hält einer Druckbelastung von 36,3 Newton stand, wenn sie von Pol zu Pol auf die Schale einwirkt. Diese Stabilität ist vor allem dann beeindruckend, wenn man bedenkt, dass die Schale bis zu 17000 Poren, etwa 150 pro  $\text{cm}^2$ , aufweist [Scholtyssek, 1987]. Durch den geringen Durchmesser dieser Poren (10-60  $\mu\text{m}$ ) wird einerseits das Eindringen von Fremdpartikeln wirksam verhindert, andererseits die Gasaustausch während der Brutzeit gewährleistet und der Flüssigkeitshaushalt reguliert.

Die Schale kann von innen nach außen in mehrere Schichten unterteilt werden: man unterscheidet die innere und äußere Schalenmembran, die Mammilarschicht, die Palisadenschicht und die Kutikula (s. Abb. 10).

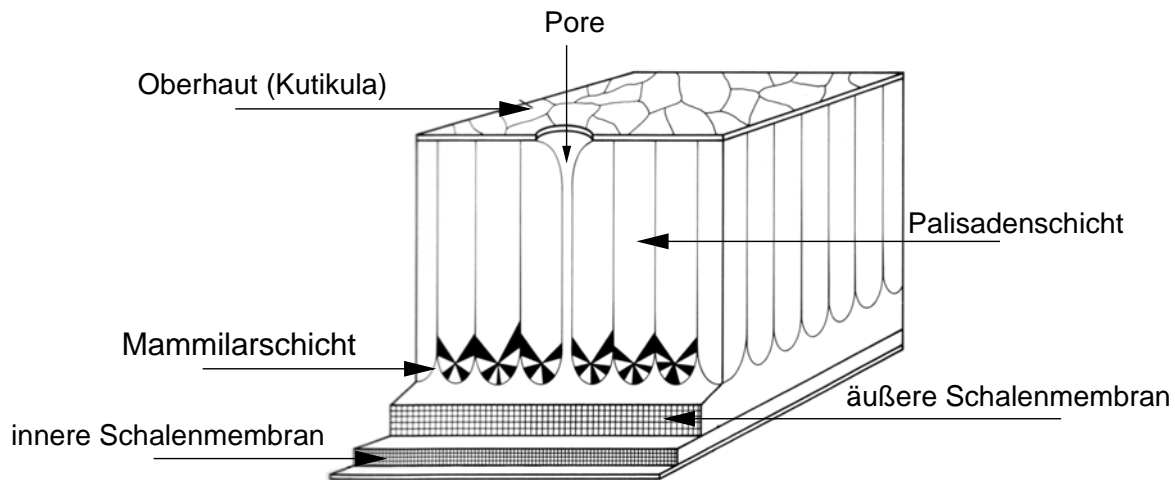


Abb. 10: Schematischer Aufbau der Eischale [nach Hassanien, 1979]

Die Bildung der Schale beginnt im Isthmus durch die Anlagerung von keratinhaltigen Fasern an die äußerste Albumenschicht. Sie bilden die innere und äußere Schalenmembran, die zusammen ca. 20-40  $\mu\text{m}$  dick sind, während die einzelnen Fasern eine Stärke von etwa 1-3  $\mu\text{m}$  besitzen und teilweise bis tief in die Schale hineinreichen. Sie bilden die organische Matrix der Schale, in die sich dann die anorganische Füllsubstanz einlagert (s. Abb. 11).

Die Phase der eigentlichen Kalzifikation der Schale scheint durch den Stimulus der Ovulation oder durch neuroendokrine Faktoren gesteuert zu werden und nicht mechanisch durch den Eintritt des Eies in die Schalendrüse selbst oder autonome Innervation [Eastin & Spaziani, 1978a].

Im unteren Drittel bildet diese kalzifizierte Schale eng aneinanderliegende Kegel bzw. Mammillen aus, die in die Fasern der Schalenmembran eingebettet sind und zwischen denen sich die Poren ausbilden. Sie wird als „cone layer“ beziehungsweise als Mammilarschicht bezeichnet (s. Abb. 11) und ist etwa 68  $\mu\text{m}$  dick.

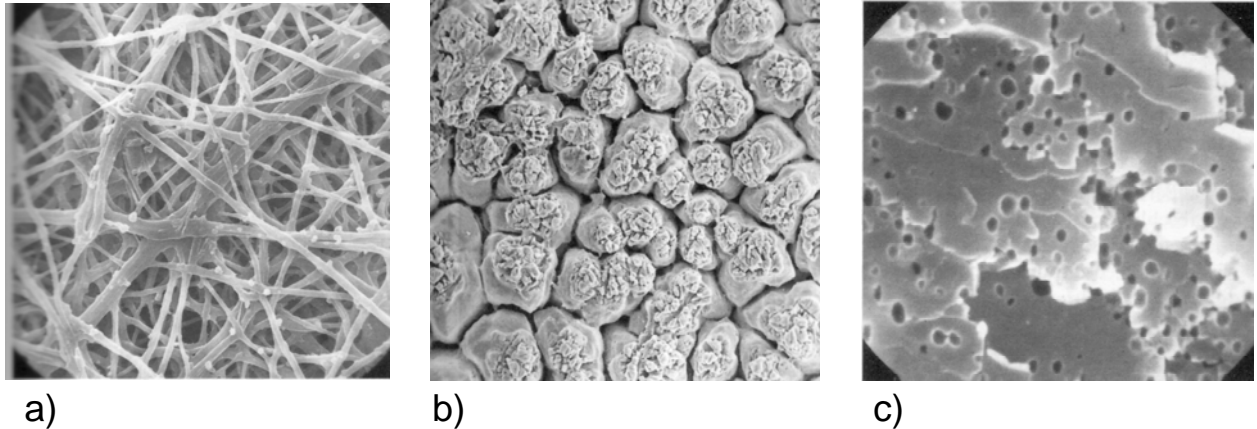


Abb. 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der äußeren Schalenmembran (a), der Mammilarschicht von innen (b) und der Palisadenschicht (c) [Scholtyssek, 1987]

Da, wo die Mammillen eng zusammenlaufen, gehen sie in die so genannte Palisadenschicht über, die mit ihren ca. 150  $\mu\text{m}$  Dicke den größten Anteil der Schale bildet (s. Abb. 11+12).

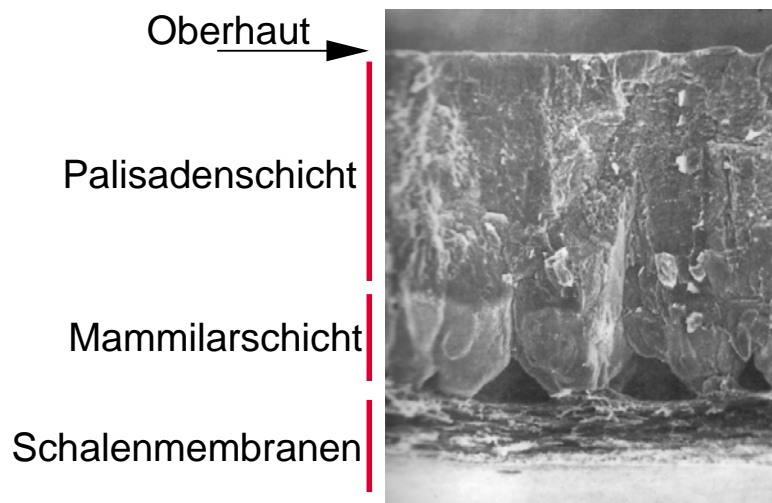


Abb. 12: Elektronenmikroskopischer Querschnitt durch die Eischale [Scholtyssek, 1987]

Den Abschluss bildet die Kutikula oder Oberhaut, welche durch ihren mucinen Charakter der Eierschale ihren typischen Glanz verleiht. Sie ist nur ca. 2  $\mu\text{m}$  dick, schützt aber wirksam gegen das Eindringen von Keimen, wobei sie dennoch einen ausreichenden Gasaustausch zulässt.

## **2.6. Calciumstoffwechsel und -transport über das Uterusepithel**

### **2.6.1 Die Bedeutung des Calciums für die Schalenbildung**

Die Eischale des Haushuhns besteht zum überwiegenden Teil aus Calciumcarbonat, das zudem 97 % des anorganischen Materials der Schale ausmacht. Für dessen Produktion muss das Uterusepithel etwa 2-2.5 g Calcium innerhalb einer Zeit von etwa 20 Stunden transportieren [Warren & Scott, 1935a+b]. Diese Menge entspricht ungefähr 10 % der Gesamtmenge des im Körper gespeicherten Calciums [Lundholm & Bartonek, 1992b]. Unter widrigen Umständen ist das Huhn darüber hinaus in der Lage, 38 % der Knochensubstanz für die Eiproduktion zu mobilisieren [Simkiss, 1960].

In der Hauptphase der Sekretion, zwischen 22.00 Uhr und 6.00 Uhr [Eastin & Spaziani, 1978a], müssen dafür etwa 100 bis 200 mg  $\text{Ca}^{2+}$  pro Stunde transportiert werden [Etches, 1987]. Da die tägliche Calciumaufnahme jedoch maximal nur etwa ein Gramm beträgt [Tyler, 1940], muss das Huhn über einen körpereigenen Calciumspeicher verfügen. Es wurde gezeigt, dass das Uterusepithel selbst nicht in der Lage ist, größere Mengen Calcium zu speichern [Solomon et al., 1975]. Das für die Eischale benötigte Calcium muss folglich über den Blutkreislauf bereitgestellt werden. Das Blut selbst kommt als Calciumspeicher nicht in Betracht, weil die dazu notwendigen Änderungen der Calciumkonzentrationen mit dem Leben des Huhnes nicht vereinbar wären. Der Blutkreislauf kann nur Transportfunktion übernehmen. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass während der Eierschalenbildung die Durchblutungsrate des Organs ansteigt, was sich in einem Anstieg des intravasalen Volumens um 50 % [Eastin & Spaziani, 1978b] äußert. Die Änderung der Perfusion ist auch makroskopisch durch ein vergrößertes Organvolumen und eine deutliche Rotverfärbung erkennbar.

Die Bereitstellung des Calciums und dessen Transport zum Uterus muss zudem einem sehr sensiblen Regelmechanismus unterliegen: Denn trotz der großen Mengen an Calcium, die während des Aufbaus der Eierschale umgesetzt werden muss, schwankt die freie Calciumkonzentration im Blut praktisch nicht - lediglich eine geringfügige Änderung der freien Calciumkonzentration von 1.41 auf 1.23 mmol·l<sup>-1</sup>; wurde während des Zeitraumes beobachtet, indem sich ein Ei in der Schalendrüse befand [Parsons & Combs, 1981]. Ohne die Freisetzung des Calciums aus einem körpereigenen Speicher, die der Calciumkonzentration im Blut sehr präzise nachgeführt wird, müsste die Calciumkonzentration im Blut innerhalb von 15-20 Minuten nach Beginn der Eierschalenbildung auf Null absinken [Lundholm & Bartonek, 1992b].

Die Mehrheit der in der Literatur beschriebenen Untersuchungen richteten sich daher auf diese beiden Aspekte der Calciumverfügbarkeit: die Bereitstellungsmechanismen und ihre Beeinflussung durch endogene und exogene Botenstoffe, wobei man hoffte, durch die Untersuchungen zum Einfluss der Botenstoffe die Bereitstellungsmechanismen aufzuklären.



### 2.6.2 Einfluss der Gewebeeigenschaften auf den $\text{Ca}^{2+}$ -Transport

Der in das Lumen gerichtete Calciumfluss über das Uterusepithel, der zum Aufbau der Eischale notwendig ist, stellt eine bemerkenswerte Leistung dieses Gewebes dar. Die Beschaffenheit des hierfür notwendigen Gewebeverbundes wurde aber bislang nur ansatzweise untersucht.

Eastin und Spaziani analysierten in *in vivo* Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Chrom und Inulin die Verteilungsräume im Uterusgewebe und schlossen aus ihren Ergebnissen - insbesondere mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Inulin - auf ein ausgeprägt durchlässiges Gewebe, dessen parazelluläre Shunts sich während der Produktion der Eischale in ihrer Durchlässigkeit noch steigern [Eastin & Spaziani, 1978b].

Außerdem berechneten sie aufgrund von *in vivo* Messungen eine trans-epitheliale Potentialdifferenz von 10-16 mV über dem Uterusgewebe, wobei die Blutseite positiv geladen ist, so dass zu erwarten wäre, dass durch diese Konstellation der Kationentransport in das Lumen gefördert wird [Eastin & Spaziani, 1978b]. Ihre Ergebnisse werfen aber damit die Frage auf, wie bei der von Eastin und Spaziani postulierten besonderen Durchlässigkeit des Gewebes der enorme Unterschied in der Calciumkonzentration zwischen Lumen und Blut aufrecht erhalten werden kann.

Darüber hinaus stellen zwei weitere Beobachtungen die Schlussfolgerungen von Eastin und Spaziani in Frage: Zum einen ist die Sekretion von radioaktiv markiertem  $\text{Ca}^{2+}$  in Ussingkammerversuchen unter „open-circuit“ Bedingungen nahezu identisch zur Sekretion unter "short-circuit-conditions", bei der das Uterusepithel auf 0 mV geklemmt wird. Zum anderen werden  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auch gegen einen elektrochemischen Gradienten transportiert [Pearson & Goldner, 1973].

### 2.6.3 Calciumaufnahme, -speicherung und -bereitstellung

Landauer und Pfeiffer haben für weibliche Haushühner gezeigt, dass vor Beginn der Legetätigkeit Calcium vorwiegend in den langen Röhrenknochen eingelagert wird [Landauer et al., 1939]. Auch viele andere Vogelspezies wurden im Hinblick auf die notwendige Speicherung des Calciums untersucht; Kyes und Potter zeigten bereits 1934 am Beispiel der Taube, dass diese verstärkte Einlagerung in den langen Röhrenknochen nur bei weiblichen, nicht aber bei männlichen Tiere beobachtet wird. Sie konnten diese Calciumspeicherung aber auch bei männlichen Tauben durch Östrogeninjektionen artifiziell herbeiführen. Zondek führte diesen Versuch wenig später erfolgreich beim Haushahn durch [Zondek, 1936].

Die Freisetzung größerer Mengen Calciums aus dem medullären Knochen der weiblichen Tiere wird durch Hormone hervorgerufen - vor allem durch Östrogene aus dem Ovar [Clavert & Benoit 1942b]. Durch Hormoninjektionen konnte zudem die Resorption des Calciums aus dem Futter gesteigert werden. Die maximale Steigerung wurde durch eine Mischung aus Androgenen und Östrogenen erreicht [Common et al., 1948]. Den Östrogenen ist somit für den Calciumstoffwechsel eine Schlüsselfunktion zuzuschreiben.

Außerdem spielt Vitamin  $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  eine entscheidende Rolle in zwei begleitenden Prozessen des Calciumstoffwechsels. Zum einen optimiert Vitamin  $\text{D}_3$  die durch Sexualhormone gesteigerte Aufnahme von Calcium aus dem Darm, und zum anderen bewirkt es eine gesteigerte Freisetzung des Calciums aus den medullären Knochen [Navickis et al., 1979].

Vitamin  $\text{D}_3$  wird beim Vogel vor allem in der Leber und der Niere aus Cholecalciferol gebildet. Seine Einflussnahme auf die oben genannten

Prozesse ist vor allem indirekt darüber gegeben, dass Vitamin D<sub>3</sub> maßgeblich an der intestinalen Bildung des Calbindins, d.h. eines Calcium-bindenden Proteins, beteiligt ist [Navickis et al., 1979 Wassermann et al., 1991]. Calbindin ist in Darm, Knochen und Uterus an der Aufnahme und Freisetzung des Calciums in und aus den Zellen beteiligt [Rabon & Roland, 1991].

Weitere Calcium-bindende Proteine, vor allem Vitellin, sind für den Transport des Calciums vom Darm, dem Ort der Resorption, zum Ort der Speicherung im Knochen, aber auch nach der Freisetzung des Calciums aus den Knochen hin zum Uterus notwendig [Simkiss, 1960].

Nur über die Bindung des Calciums an diese Proteine wird gewährleistet, dass eine Hypercalcämie zum Zeitpunkt der Schalenbildung, die lebensbedrohliche Zustände hervorrufen würde, umgangen wird.

### **2.6.4 Schalenqualität**

Viele Beobachtungen über den Calciumtransport stammen aus *in vivo* Versuchen. So wirken sich zum Beispiel einige Schwermetalle, Umweltgifte wie das Insektizid DDT oder virale Infektionen massiv auf die Eierschalendicke und damit die Schalenqualität aus oder führen sogar zu ihrem völligen Fehlen [Lundholm & Bartonek, 1992b].

Auch führten *in vivo* Applikationen mancher Arzneimittel zu einer Reduktion der Schalendicke. Als Beispiele seien das nicht steroidale Antiphlogistikum Indomethazin [Lundholm, 1985c], das Saluretikum Furosemid aber auch Amilorid [Lundholm, 1991], sowie Spironolacton [Müller et al., 1969] genannt. *In vitro* Versuche mit Indomethazin haben zu keiner Klärung geführt, wie diese Substanz die Schalendicke beeinflusst; es war erwartet

worden, dass unter Gabe von Indomethazin die Aktivität der Cyclooxygenase im Uterusgewebe reduziert wäre, was aber nicht beobachtet werden konnte [Gilben et al., 1982; Lundholm & Bartonek, 1992a].

Auch die Wirkungsmechanismen des Furosemid sind nicht restlos geklärt. Anscheinend wirkt Furosemid über eine reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme an der basolateralen Membran des Schalendrüseneithels; man schließt dies aus der Kumulation des Calciums in der Mucosa der Schalendrüse unter Behandlung mit Furosemid. Andererseits wird aber die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Blut und in der uterinen Flüssigkeit durch Furosemid so gut wie nicht beeinflusst [Lundholm & Bartonek, 1992b].

Für Amilorid werden zwei mögliche Wege der Einflussnahme postuliert: zum einen über die Blockade eines epithelialen Natriumkanals, der wiederum sekundär Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sekretion haben könnte, und zum anderen über die Blockade eines  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers. In beiden Fällen sollte sich das Fehlen von Natrium in der uterinen Flüssigkeit negativ auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux auswirken, was aber in den *in vitro* Versuchen von Pearson und Goldner gerade nicht beobachtet wurde [Pearson & Goldner, 1973].

### **2.6.5 Die Calciumsekretion am Uterusepithel**

Die Sauerstoffversorgung hat einen entscheidenden Einfluss auf den Calciumtransport. Bei vorübergehendem vollständigem Entzug des Sauerstoffs durch Stickstoffbegasung wurde eine reversible Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxes auf 5 % des Ausgangswertes herbeigeführt [Pearson & Goldner, 1974]. Die bereits beschriebene extreme Steigerung der Durch-

blutungsrate während der Eibildung (50 %) dient daher der Optimierung der Calciumsekretion.

Aus dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedarf für eine etwa 2 g schwere Eierschale errechnet sich bei einer Schalendrüseneroberfläche von  $68 \text{ cm}^2$  und einer Sekretionsdauer von etwa 20 Stunden ein notwendiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport von etwa  $35 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $70 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Die tatsächlich *in vitro* gemessenen Calciumfluxe von  $0.050 \pm 0.006 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$  [Ehrespeck et al., 1971] stellen einen eklatanten Widerspruch zu dieser Abschätzung dar. Durch Steigerung der serosalen  $\text{CO}_2$ -Konzentration kann zwar der  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux um etwa 80 % gesteigert werden (von  $0.050 \pm 0.006$  auf dann  $0.090 \pm 0.0086 \mu\text{Eq}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ) [Odom & Harrison, 1985], aber diese Transportrate stellt dennoch nur einen Bruchteil der Menge dar, die *in vivo* für den Aufbau der Eischale notwendig ist. Diese Diskrepanz könnte daher rühren, dass das transportierte Calcium unter *in vitro* Bedingungen dem System nicht entzogen wird, während unter *in vivo* Bedingung eine stete Entfernung freier Calciumionen durch Bindung in Form von  $\text{CaCO}_3$  auftritt.

Durch *in vivo* Versuche wurden neben Vitamin  $\text{D}_3$  noch weitere Substanzen gefunden, die nach Applikation die Eischalendicke positiv beeinflussen, wie etwa Testosteron, Progesteron [Nys, 1987] und einige Glucocorticoid-Antagonisten [Lundholm, 1991].

### 2.6.6 Transportwege für Calcium

Man geht davon aus, dass Calcium zwar auch durch passive Diffusion, aber zum weitaus größeren Anteil durch aktive Transportmechanismen in das Uteruslumen gelangt. Zur Klärung dieser Mechanismen trugen die Forschungsergebnisse von Wassermann et al. (1991) bei. Ihnen gelang es, die Colokalisation einer Calcium-ATPase und eines calciumbindenden Proteins (CalbindinD28k) immunhistochemisch im Isthmus und in der Schalendrüse nachzuweisen, wobei Calbindin im proximalen Teil des Isthmus fehlte [Wassermann et al., 1991].

Außerdem zeigte der Einsatz von Calcium-ATPase-Blockern wie Chlorpromazin, Trifluorpromazin und Querzetin einen Rückgang der ATPase Aktivität in Zellhomogenaten [Coty & Mc Conkey, 1982].

Balnave et al. zeigten, dass sich die Aktivität dieser ATPase und die Konzentration von Calbindin mit der Eiproduktion verändert [Balnave et al., 1992]. Bei Mangelernährung durch Ganzkornfütterung stellten die Tiere nach 11 Tagen ihre Legetätigkeit ein, die Calbindinkonzentration sank um 50 % und die Calcium-ATPase-Aktivität sank auf 25 %.

Über die Wege zur Aufnahme von Calcium in das Schalendrüsene epithel ist nichts bekannt. Nys et al. postulieren zwar sowohl basolateral wie apikal einen  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, der aber durch keinerlei Daten aus der Literatur belegt ist [Nys et al., 1999]. Auch ist es sehr schwer nachzuziehen, wie ein durch die Natrium-Kalium-Pumpe in der basolateralen Membran energetisierter, sekundär aktiver Transporter in der apikalen Membran im „forward-Modus“ arbeitend  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus der Zelle schleusen soll, während der gleiche sekundär aktive Transporter auf der basolateralen Seite im „backward-Modus“  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle transportiert, denn diesem  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher würde die treibende Kraft fehlen.

Die apikale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung scheint verständlicher, da in den erwähnten Studien von Pearson und Goldner bereits 1973 gezeigt wurde, dass radioaktive  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auch entgegen eines elektrochemischen Gradienten transportiert werden und dass die  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Sekretion in Ussingkammerversuchen unter „open-circuit“ und bei einem auf 0 mV geklemmten Uterusepithel (short-circuit-conditions) nahezu identisch ist. Dies zeigt, dass zumindest ein großer Teil des Calciums aktiv transportiert werden muss. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Befunden aus einer Studie von Pearson und Goldner aus dem Jahr 1974. Durch 2,4-Dinitrophenol, das über die Inhibition der oxidativen Phosphorylierung zu einer Energie-Verarmung in der Zelle führt und somit aktive Transportprozesse hemmt, reduzierten sie den  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux um 50 %.

Mögliche aktive Calciumtransportmechanismen sind die primär aktive  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und auch der sekundär aktive  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Von denen, wie bereits erwähnt, die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase als nachgewiesen gilt [Wassermann et al., 1991], während die Existenz des  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers keinesfalls geklärt ist.

Als eine dritte Möglichkeit der Calciumsekretion bleibt noch zu erwähnen, dass seit langem über die Calciumsekretion in Form von  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Granula diskutiert wird [Lundholm, 1985a]. Deren Freisetzung über die luminale Membran wurde aber nie bewiesen.



### 2.6.7 Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Ionen

Bei *in vivo* Untersuchungen von Eastin und Spaziani zeigte sich, dass Calcium, Bikarbonat und Kalium während der Schalenproduktion in den Uterus sezerniert werden, wohingegen Natrium und Chlorid resorbiert werden [Eastin & Spaziani, 1978b].

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die Calciumsekretion und die Bikarbonatsekretion teilweise funktional verbunden sind [Pearson & Goldner, 1973+1974; Eastin & Spaziani, 1978b], und dass eine erhöhte Natrium- und Chloridkonzentrationen im Lumen der Schalendrüse eine Steigerung der Calciumtransportrate bewirkt [Eastin & Spaziani, 1978b]. Dem widersprechen Ergebnisse von Pearson und Goldner, die keinen Einfluss von luminalem Natrium auf die Calciumsekretion gefunden haben [Pearson & Goldner, 1973].

Es wurde vermutet, dass der bikarbonatabhängige Calciumtransport an die Aktivität der Carboanhydrase gekoppelt ist, denn bei *in vivo* Experimenten führte Acetazolamid, ein Blocker der Carboanhydrase, zum vollständigen Erliegen sowohl der Bikarbonat- als auch der Calciumsekretion [Eastin & Spaziani, 1978a+b]. Zusätzlich führte Acetazolamid zu einer reduzierten Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Resorption, wobei sowohl der Cl<sup>-</sup>-abhängige als auch der Cl<sup>-</sup>-unabhängige Na<sup>+</sup>-Transport reduziert war [Mongin, 1978]. Diese Ergebnisse werden auch durch *in vitro* Untersuchungen von Pearson und Goldner bestätigt, die bei Acetazolamidbehandlung ebenso wie unter bikarbonatfreien Bedingungen eine signifikante Hemmung der Ca<sup>2+</sup>-Sekretion beobachtet haben [Pearson & Goldner, 1973; Pearson & Goldner, 1974].

Im Gegensatz zu der von Mongin und anderen Arbeitsgruppen beobachteten Resorption des Chlorids [Mongin, 1978; Eastin & Spaziani 1978a,b], gehen Vetter und O`Grady aufgrund ihrer Forschungsergebnisse davon aus, dass Bikarbonat durch einen Chloridaustauscher in das Lumen der Schalendrüse gelangt. Chlorid soll aber, nicht wie bislang behauptet, resorbiert, sondern durch einen apikalen Chloridkanal rezirkulieren, und somit schlussendlich sezerniert werden [Vetter & O`Grady, 2005]. Die Regulation dieser Vorgänge scheint über die Adenylatzyklase vermittelt zu werden, da 8-cpt-cAMP, ein membrangängiges cAMP-Derivat, unter voltage-clamp Bedingungen in Ussingkammer-Experimenten mit gestripptem Hühneruterus einen Anstieg des Kurzschlussstroms bewirkt. Den anionengetragenen Anteil des  $I_{sc}$  führten Vetter und O`Grady zum einen auf die Bikarbonatsekretion, zum anderen aber auf die Chloridsekretion zurück [Vetter & O`Grady, 2005].

## 2.7. Überblick über die elektrophysiologischen Untersuchungen an der Schalendrüse

Es gibt nur wenige elektrophysiologische Daten über das Schalendrüsenepithel in der Literatur und diese beschränken sich auf die Ussing-kammertechnik. Unter nicht stimulierten Bedingungen kann ein Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) mittels der Ussingkammertechnik gemessen werden, der zu etwa 60 % auf eine elektrogene  $Na^+$ -Resorption zurückgeführt werden kann [Vetter & O'Grady, 2005]. Die hemmende Wirkung von Amilorid auf den  $I_{sc}$  und den auf die Blutseite gerichteten  $Na^+$  Flux zeigen die Existenz eines epithelialen  $Na^+$ -Kanals.

Einen hemmenden Einfluss auf den  $I_{sc}$  haben sowohl basolaterale Applikationen von Ouabain und 2,4-Dinitrophenol aber auch die Energieverarmung durch glucose- und sauerstofffreie Bedingungen [Pearson & Goldner, 1973+1974]. Diese Ergebnisse deuten auf die Existenz einer  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase hin, deren  $\alpha_1$ -Untereinheit auch im Schalendrüsenepithel nachgewiesen wurde [Lavelin et al., 2001].

Der Einfluss der Legetätigkeit auf elektrophysiologische Parameter des Schalendrüsenepithels wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Ehrenspeck et al. maßen keine signifikante Veränderung der Potentialdifferenz (PD) und des  $I_{sc}$  am Uterusepithel während der Legetätigkeit [Ehrenspeck et al., 1971], wohingegen andere Autoren signifikant höhere Werte während der Schalenbildung bei ihren Untersuchungen fanden [Cohen & Hurwitz, 1973; Pearson et al., 1977; Vetter & O'Grady, 2005].

Über die Kaliumbewegungen ist aus elektrophysiologischen Forschungen bislang nichts bekannt. Alle Erkenntnisse hierzu stammen ausschließlich aus *in vivo* Versuchen.

Der nach der Blockade durch Amilorid verbleibende Anteil des  $I_{sc}$  soll von einer Anionensekretion getragen werden [Vetter & O'Grady, 2005]. Durch Versuche mit dem Chloridkanalblocker DPC und Ionensubstitution konnten Vetter und O'Grady diesen Anteil sowohl einer Chlorid- als auch Bikarbonatsekretion zuordnen; sie stellten fest, dass dieser Stromanteil durch ein membrangängiges cAMP-Analog stimuliert werden kann.

Die meisten elektrophysiologischen Untersuchungen existieren zweifelsfrei zu den Calciumbewegungen über das Uterusepithel. Ehrenspeck und Schraer stellten aufgrund ihrer Untersuchungen die These auf, dass ein Teil der Calciumsekretion auf aktivem Transport beruhen muss. Sie zeigten, dass die Sekretion auch ohne einen chemischen Gradienten erfolgt [Ehrenspeck et al., 1971]. Durch Zugabe eines Inhibitors der oxidativen Phosphorylierung konnte der Calciumtransport um mehr als 50 % reduziert werden, was erneut ein Indiz für den aktiven Transport von Calcium war [Pearson & Goldner, 1973].

Es konnte gezeigt werden, dass die Calciumsekretion bei zyklusaktiven Hühnern etwa 5 mal höher ist als bei unreifen oder sich in der Mauser befindenden Tieren [Pearson et al., 1977].

Der von serosal nach mucosal gerichtete Calciumflux lässt sich durch Steigerung der serosalen  $CO_2$ -Konzentration um 80 % steigern [Odom & Harrison, 1985] und durch das Entfernen des Bikarbonates aus der Pufferlösung um über 50 % hemmen [Pearson & Goldner, 1973].

Genauere Untersuchungen über die Regulation des  $Ca^{2+}$ -Transportes sind nur möglich, wenn die basalen Ionentransporteigenschaften des Uterusepithels bekannt sind. Meine Untersuchungen richteten sich deshalb auf die basale Charakterisierung der grundlegenden Ionentransportwege über das Schalendrüsenepithel des Haushuhnes mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden.

### 2.8. Eigene Fragestellung

Dass der Transport von Calcium über das Uterusepithel eng an die Transportmechanismen von Bikarbonat und Chlorid gekoppelt ist, ist unumstritten. Widersprüche bestehen jedoch über die Art und die Richtung der Ionenbewegungen. Eastin und Spaziani fanden eine Chloridresorption [Eastin & Spaziani, 1978b], während Vetter und O`Grady von einer Sekretion ausgehen [Vetter & O`Grady, 2005]. Zudem ist über den Einfluss der Kationen auf den Calciumtransport ebenso wenig bekannt wie über die Regulation der Sekretionsprozesse am Uterus des Haushuhns.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es deshalb:

- ▶ durch systematischen Einsatz von Radioisotopen, Ionensubstitution und Transportblockern die Transportrichtung von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$  zu bestimmen,
- ▶ die Rolle von Neurotransmittern und parakrinen Substanzen bei der Regulation des Ionentransportes zu ermitteln
- ▶ und den Einfluss des second Messengers cAMP zu untersuchen.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1 Versuchstiere**

Für alle durchgeführten Versuche wurde der Uterus von weißen Haushühnern (*Gallus gallus domesticus*) verwendet, welche mir großzügigerweise von der Firma Lohmann Tierzucht GmbH zur Verfügung gestellt wurden. Die Tiere stammten aus dem SPF-Zuchtbereich des Betriebes und wurden nach dem all-in/ all-out Verfahren im institutseigenen Stall der Veterinär-Physiologie untergebracht. Die Legehybriden hatten zum Zeitpunkt der Aufstallung bei uns eine durchschnittliche Legeleistung von ~300 Eiern im ersten Legejahr und ein Durchschnittsalter von 1.5 Jahren. Futter und Wasser stand den Tieren bis zum Versuchstag ad libitum zur Verfügung (Standard- und Ergänzungsfuttermittel, EIBA-Kraftfutterwerk KG, Babenhausen, bzw. RWZ-Vital Gold-Mehl, Wiesbaden, Deutschland). Auf ein Lichtregime wurde bewusst verzichtet. Natürliches Tageslicht über Fenster erhellte in Abhängigkeit von jahreszeitlichen Schwankungen den Stall. Nach einer Adaptationsphase von ca. 14 Tagen begannen die Versuche.

##### **3.1.2 Gewebepräparation**

Die Tötung der Tiere erfolgte nach Betäubung durch Dekapitation und Ausbluten (Genehmigung der Tötung der Tiere zur Organentnahme durch das Regierungspräsidium Gießen). Im Anschluss wurde das Gefieder der Hühner an der Unterbauchseite bis auf die Haut mit Wasser benetzt. Mit einer chirurgischen Schere wurde die Bauchdecke von der Kloake mit zwei Schnitten bis vor zu den Rippenbögen eröffnet und nach

cranial geklappt. Die Entnahme des Uterus erfolgte nach Trennung von der Gekrösewurzel durch Absetzen im Isthmus und der Vagina. Der entnommene Uterus wurde nun entlang der Gekröseaufhängung eröffnet und in Standard-Tyrode oder Standard-Parsons aufbewahrt (Pufferlösungen s. Kap. 3.1.3). Nach der Reinigung des Gewebes von groben Calciumkonglomeraten sowie Fett und Gekröseresten wurde ein Querstreifen aus der Mitte der Schalendrüse herausgeschnitten, wobei auf einen deutlichen Abstand zum Übergang auf Isthmus- bzw. Vaginalgewebe geachtet wurde. Nach Zerteilung des Gewebes in der Medianen verblieb ein Teil in eisgekühlter Tyrode bzw. Parsons, wobei nur im Falle des Parsons-Puffer eine Begasung mit 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> (v/v) zur Stabilisierung des pH-Wertes notwendig war. Der zweite Teil des Gewebes wurde in vier Quadrate (1.0 x 2.0 cm) geschnitten und in Ussingkammern eingespannt.

Für einige Versuche wurde ein Strippen des Gewebes vorgenommen, was in einer groben Trennung der Serosa sowie Teilen der Muskularis von der Mucosa bestand, so dass ein Mukosa-Submucosapräparat eingespannt werden konnte. Für den überwiegenden Anteil der Versuche wurde das Gewebe nicht weiter präpariert und umfasste folglich Serosa, Muskularis und Mucosa.

Nach Beendigung des ersten Versuchs wurde das in Pufferlösung aufbewahrte Gewebe in die Ussingkammern eingespannt und der gleiche Versuch um 2-3 Stunden versetzt durchgeführt. So entstanden in Abhängigkeit von der Uterusgröße je Tier bis zu 8 Einzelgewebe, welche zur Versuchsdurchführung eingesetzt werden konnten.



### 3.1.3 Lösungen

#### 3.1.3.1 *Ussingkammer-Versuchslösungen*

Für die Aufbewahrung der Gewebe vor dem Einspannen in die Ussingkammer wurde entweder 107 NaCl 4.5 KCl Parsons-Pufferlösung oder 140 NaCl 1.0 CaCl<sub>2</sub> Tyrode-Pufferlösung verwendet, in Abhängigkeit davon, ob der geplante Versuch unter bikarbonatfreien oder -haltigen Bedingungen durchgeführt werden sollte. Zur Differenzierung, wurden alle bikarbonathaltigen Pufferlösungen als „Parsons-Lösungen“ bezeichnet, wohingegen „Tyrode“ für bikarbonatfreie Pufferlösungen steht. Zudem wurden die Ussingkammerversuche zur Äquilibrierung jeweils in einer dieser beiden Pufferlösungen gestartet. Nach Stabilisierung der  $I_{sc}$  und  $G_t$  konnten dann entsprechend der Versuchsanforderungen diverse Pufferlösungen eingewaschen werden. Diese setzten sich wie folgt zusammen:

##### 3.1.3.1.1 107 NaCl 4.5 KCl Parsons

Versuche unter bikarbonathaltigen Bedingungen wurden mit der Standard-Parsons-Lösung durchgeführt. Sie enthält (in mmol·l<sup>-1</sup>): 107 NaCl, 4.5 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.25 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgSO<sub>4</sub>, 12.2 Glucose. Der pH-Wert wurde unter Carbogenbegasung mit NaHCO<sub>3</sub> und HCl auf 7.4 eingestellt. CaCl<sub>2</sub> wurde erst zugesetzt, wenn der pH-Wert unter 7.8 gesunken war, um ein Ausfällen von CaCO<sub>3</sub> zu verhindern.

3.1.3.1.2 107 NaGluc 4.5 KCl- Parsons

Für Untersuchungen zum Bikarbonattransport wurde dem System Chlorid entzogen, indem dies durch das impermeable Anion Gluconat ersetzt wurde. Der Puffer bestand demnach aus (in mmol·l<sup>-1</sup>): 107 Natrium-Gluconat, 4.5 Kalium-Gluconat, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.75 Calcium-Gluconat, 1 MgSO<sub>4</sub>, und 12.2 Glucose. Da Gluconat als Chelatbildner für Calciumionen fungiert [Kenyon & Gibbons, 1977], musste die Calciumkonzentration gegenüber anderen Badlösungen deutlich erhöht werden. Der pH-Wert wurde unter Carbogenbegasung mit NaOH und Gluconsäure auf 7.4 eingestellt.

3.1.3.1.3 140 NaCl 1.0 CaCl<sub>2</sub>- Tyrode

Die Standard-Tyrode wurde bei der überwiegenden Mehrheit der Versuche eingesetzt, um bikarbonatfreie Bedingungen zu schaffen. Sie enthielt (in mmol·l<sup>-1</sup>): 140 NaCl, 5.4 KCl, 10 N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N´-(2-ethanolsulfonsäure)(HEPES), 12.2 Glucose, 1.25 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>. Mit NaOH und HCl wurde der pH-Wert auf 7.4 eingestellt.

3.1.3.1.4 140 NaGluc 5.4 KCl- Tyrode (Cl<sup>-</sup>-arm)

Zum Aufbau eines Chloridgradienten wurde die Standard-Tyrode auf der mucosalen bzw. serosalen Seite wie folgt modifiziert (in mmol·l<sup>-1</sup>): 140 NaGluc, 5.4 KCl, 10 HEPES, 12.2 Glucose, 10 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>. Mit NaOH und Gluconsäure wurde der pH-Wert auf 7.4 eingestellt.

**3.1.3.1.5 140 NMDGCl 5.4 KCl- Tyrode (Na<sup>+</sup>-frei)**

Für einen Natriumgradienten Natrium isomolar durch N-Methyl-D-Glucamin (NMDG<sup>+</sup>) ersetzt (in mmol·l<sup>-1</sup>): 140 NMDGGluconat, 5.4 KCl, 10 HEPES, 12.2 Glucose, 140 HCl, 1.25 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>. Der pH-Wert wurde mit HCl und Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) auf 7.4 eingestellt.

**3.1.3.1.6 140 NaCl- Tyrode (Ca<sup>+</sup>-frei) + EGTA**

Zur Steigerung der Calciumsekretion wurde auf der mucosalen Seite ein Puffer eingesetzt, der zum einen frei von Calcium war und zum anderen durch den Zusatz von Ethylenglycol bis-(beta-aminoethylether) N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), einem Chelatbildner des Calciums, einen kontinuierlichen Entzug des sezernierten Calciums von der mucosalen Seite garantierte. Er enthielt (in mmol·l<sup>-1</sup>): 140 NaCl, 5.4 KCl, 10 HEPES, 12.2 Glucose, 0.1 EGTA, 1 MgCl<sub>2</sub>. Mit NaOH und HCl wurde der pH-Wert auf 7.4 eingestellt.

**3.1.3.2 *Radioisotopen-Versuchslösungen***

Für die Messungen von radioaktiven Ionen wurden sowohl die Standard-Tyrode, als auch die calciumfreie, EGTA-Tyrode und die NMDGCl-Tyrode verwendet. Für die Messungen von Kaliumbewegungen wurden radioaktive Rubidiumionen anstelle des Kaliums eingesetzt. In dem zugehörigen Puffer wurde entsprechend Kalium durch Rubidium ersetzt:

**3.1.3.2.1 140 NaCl 5.4 RbCl Tyrode (in mmol·l<sup>-1</sup>):**

140 NaCl, 5.4 RbCl, 10 HEPES, 12.2 Glucose, 1.25 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>. Der pH-Wert wurde mit NaOH und HCl auf 7.4 eingestellt

### **3.1.3.3 Gelatinelösung zur Objektträgerbeschichtung**

Es wurden  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Gelatine (300Bloom; die Einheit bloom ist ein Indikator für die Festigkeit der erkalteten Form der Gelatine) in Aqua dest. gelöst und erhitzt. Bei  $54^\circ\text{C}$  wurden  $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Chromsulfat hinzugegeben. Die Lösung wurde dann weiter auf  $60^\circ\text{C}$  erhitzt.

### **3.1.3.4 Gelatinelösung zur Gewebeeinbettung**

$100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  Haushaltsgelatine wurden in Aqua dest. gelöst und auf  $37^\circ\text{C}$  erhitzt. Die Lösung wurde dann durch Papierfilter filtriert.

### **3.1.3.5 Färbelösungen für Gewebeschnitte**

Zur Herstellung der Kresylviolett-Färbelösung wurde  $0.1 \text{ g}$  Kresylviolettacetat in  $100 \text{ ml}$  Aqua dest. unter leichtem Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurden  $0.25 \text{ ml}$  konzentrierter Eisessig hinzugegeben.

### 3.1.4 Chemikalien und Isotope

Die Reinsubstanzen zum Ansetzen der diversen Pufferlösungen stammten ausnahmslos von SIGMA, Deisenhofen, Deutschland und wurden in Aqua destillatum gelöst. Bei Substanzen, die in Dimethylsulphoxid (DMSO) oder Ethanol gelöst wurden, hatte das Lösungsmittel eine maximale Endkonzentration von 0.2 % (v/v).

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Solvent</b>	<b>Stamm (mg·ml<sup>-1</sup>)</b>
293 B	SIGMA	DMSO	1.3
Adrenalin	Calbiochem	Aqua dest.	1.4
Amilorid	SIGMA	DMSO	1
Barium	SIGMA	Aqua dest.	244.3
Carbachol	SIGMA	Aqua dest.	7.3
DCB	BIOMOL	DMSO	21.2
DIDS	SIGMA	DMSO	200
DPC	SIGMA	DMSO	7.5
EGTA	Roth	Aqua dest.	0.04
Forskolin	Tocris	Ethanol	13
Glibenclamid	ICN	DMSO	100
Indomethazin	SIGMA	Ethanol	2.9
Lanthanchlorid	SIGMA	Aqua dest.	37
Methazolamid	SIGMA	DMSO	47.2
NPPB	Tocris	Aqua dest.	12
Quinin	SIGMA	Ethanol	252.6

## Material und Methoden

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Solvent</b>	<b>Stamm (mg·ml<sup>-1</sup>)</b>
TPeA	SIGMA	Aqua dest.	33.4
TTX	Calbiochem	Zitratpuffer (20 mmol·l <sup>-1</sup> )	0.3
Veratridin	SIGMA	DMSO	13.4

Tab. 1a: Eingesetzte Chemikalien unter Angabe der Hersteller, Lösungsform und Stammkonzentration. Abkürzungen siehe Kap.1. BIOMOL, Ilvesheim, Deutschland; Calbiochem, Bad Soden, Germany; ICN, Eschwege, Deutschland; Roth, Karlsruhe, Deutschland; SIGMA, Deisenhofen, Deutschland; Todcris, Bristol, Großbritannien.

<b>Isotop</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Solvent</b>	<b>Stamm (<math>\mu</math>Ci·ml<sup>-1</sup>)</b>
<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup>	PELS	Aqua dest.	45.45
<sup>36</sup> Cl <sup>-</sup>	PELS	Aqua dest.	22.72
<sup>22</sup> Na <sup>+</sup>	PELS	Aqua dest.	200
<sup>86</sup> Rb <sup>+</sup>	PELS	Aqua dest.	1000

Tab. 1b: Eingesetzte Isotope unter Angabe der Hersteller, Lösungsform und Stammkonzentration. PELS = Perkin Elmer Life Sciences, Köln, Deutschland.

Die Haushaltsgelatine stammt von RUF, Quakenbrück, Deutschland.

Tissue Tec O.C.T. Compound von Miles, Elkhart, USA



## 3.2. Methoden

### 3.2.1 Ussingkammer-Versuche

#### 3.2.1.1 *Ussingkammer*

Die eingesetzten Ussingkammern bestehen aus zwei doppelwandigen Plexiglashälften, die durch Schrauben verbunden werden können. Eine Hälfte trägt auf der der anderen Kammerhälfte zugewandten Seite sieben Nadeln, welche es ermöglichen, ein Gewebe zwischen den Kammerteilen zu fixieren (s. Abb. 13). Dadurch entstehen zwei durch das Gewebe getrennte Kompartimente, die auf einer Fläche von 1 cm<sup>2</sup> über das Gewebe kommunizieren und mit Pufferlösungen befüllt werden können. Durch einen temperierten, zirkulierenden Wasserkreislauf wird das Gewebe und die Pufferlösungen auf einer konstanten Temperatur, in unserem Falle auf 40°C, gehalten.

Durch Zugänge an beiden Kammerhälften auf der Oberseite können während des Versuches Puffer getauscht oder Chemikalien zugesetzt werden. Am Boden der Kammern befindet sich jeweils eine Gasfritte für die kontinuierliche Begasung des Gewebes. Hierdurch wird das Gewebe einerseits mit ausreichend Sauerstoff versorgt, außerdem findet im Falle der bikarbonathaltigen Badlösungen eine Pufferung durch CO<sub>2</sub>-Zufuhr statt und andererseits wird eine stete Umwälzung des Puffers und somit Verteilung etwaiger Zusätze erreicht. Durch diese Kombination konnten die epithelialen Funktionen des Gewebes über viele Stunden nach Organentnahme aufrechterhalten werden.

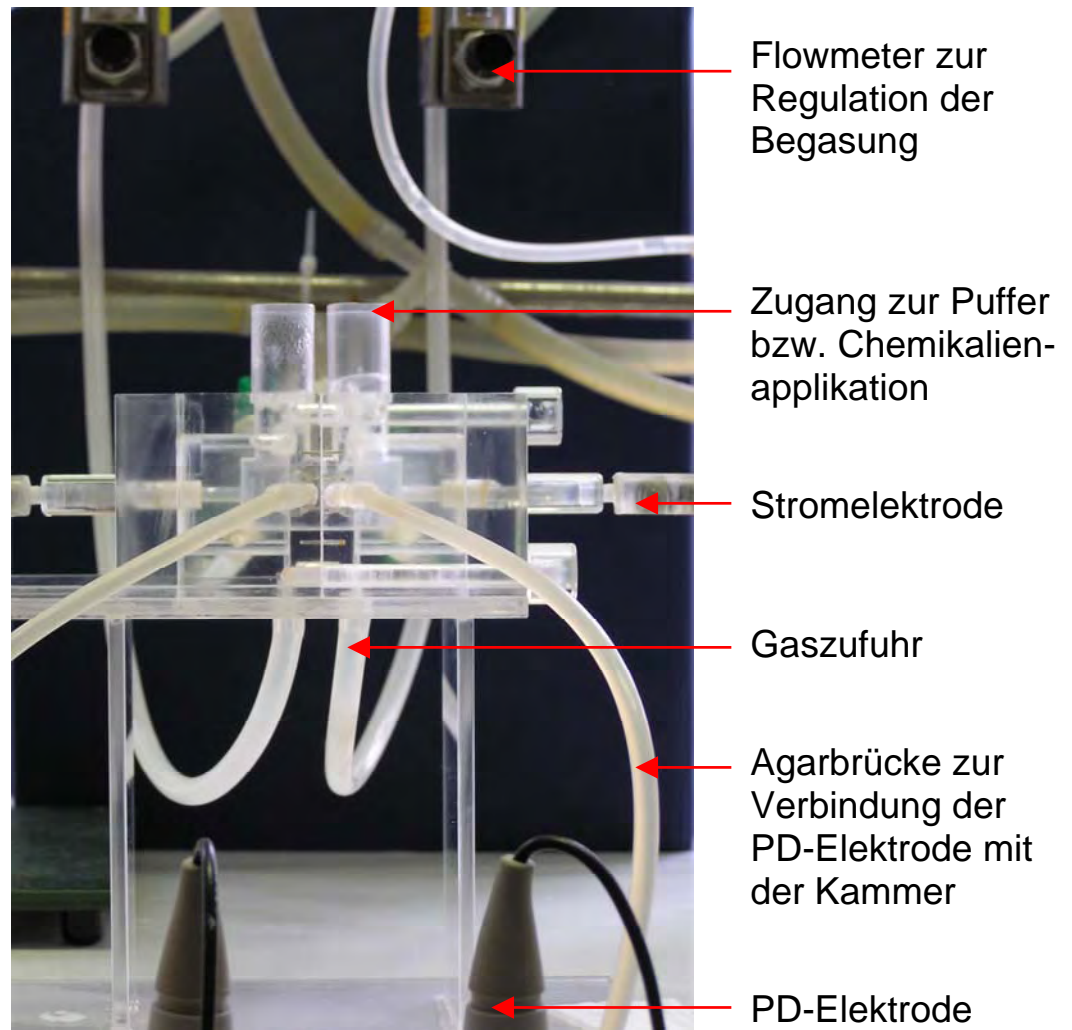


Abb. 13: Fotografie der modifizierten Ussingkammer während eines Versuches

### 3.2.1.2 Elektrische Messungen

Die Ussingkammertechnik wurde Anfang der fünfziger Jahre von dem dänischen Physiologen Hans H. Ussing entwickelt und im Laufe der Jahre modifiziert [Ussing & Zerahn, 1951]. Sie stellt eine Möglichkeit dar, elektrogene Ionentransportvorgänge an Epithelien zu quantifizieren, da alle passiven Antriebskräfte, welche einen Ladungstransport beeinflussen könnten, durch die Messanordnung ausgeschaltet werden.

Ussing und Zerahn entwickelten ein elektrisches Ersatzschaltkreismodell, um den Fluss bestimmter Ladungsträger über Epithelien beschreiben zu können [Ussing & Zerahn, 1951]. Dadurch, dass auf beide Seiten des Epithels gleiche Volumina (hier: 3.5 ml) mit gleicher Füllhöhe gegeben werden, wird die Triebkraft des hydrostatischen Druckes ausgeschaltet. Die Aufhebung eines chemischen Gradienten wird in der Regel durch Befüllung der beiden Hälften mit identischen Badlösungen erreicht. Übrig bleibt bei gleichen Badlösungen somit ein elektrischer Gradient, der durch spontane Ionenbewegungen über das Gewebe, zum Beispiel Anionensekretion über das Colonepithel der Ratte [Strabel & Diener, 1995], verursacht wird. Die dadurch entstehende transepitheliale Potentialdifferenz (PD) wird im „open-circuit-modus“ durch zwei Silber-Silberchlorid-Elektroden, die gewebstnah (hier: 1 mm Abstand) platziert sind, gemessen (s. Abb. 13). Über ein zweites Ag/AgCl-Elektrodenpaar, welches gewebstfern platziert ist, wird nun im „short-circuit-modus“ ein Strom appliziert, der dem gemessenen „Gewebe-Strom“ in seiner Größe entspricht, jedoch in entgegengesetzter Richtung über das Gewebe geschickt wird. Die gemessene Potentialdifferenz wird hierdurch ausgeglichen bis durch den Kurzschlussstrom diese auf Null gesetzt ist. Durch diese Technik wird die elektrische Triebkraft für passive Ionenbewegungen ausgeschaltet.

Die Messung und Steuerung der einzelnen Parameter findet heute über eine computergesteuerte Messanlage statt (Scientific instruments, Dipl. Ing. K. Mussler, Aachen, Deutschland). Der von dieser Messeinheit angelegte, gegengerichtete, kompensatorische Strom wird als Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) bezeichnet und bewirkt, dass das Gewebe während des Versuches transepithelial auf 0 mV geklemmt wird. Werden im Verlauf des Versuches nun Ströme gemessen, können diese folglich

nur auf aktiven Ionenbewegungen beruhen. Hierbei sind positiv gemessene Ströme entweder Folge von Kationenresorption oder Anionensekretion, während ein negativer Strom Ausdruck einer Anionenresorption bzw. einer Kationensekretion ist.

Die Elektroden sind jeweils über Agarbrücken (5 % Agar in Parsons-Lösung (w/v)) mit dem Kammerlumen verbunden. Die Agarbrücken, welche die Elektrolytlösungen auf beiden Gewebeseiten mit den Messelektroden verbinden, dienen dem Schutz des Gewebes vor Kontakt mit der hochkonzentrierten KCl-Lösung, in die die Elektroden eintauchen und die Einfluss auf Ionenkanäle nehmen würde.

Neben dem Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) ist die Ussingkammer-Anlage in der Lage den Gewebewiderstand ( $R_t$ ) bzw. dessen Kehrwert, die Leitfähigkeit ( $G_t$ ), zu messen.

$$G_t = 1/ R_t$$

Hierfür wird jede Minute ein bipolarer Strompuls ( $\Delta I$ ) von +/- 50 $\mu$ A für eine Dauer von 200 ms appliziert. Die daraus entstehende Änderung der Potentialdifferenz ermöglicht nun die Berechnung des Gewebewiderstandes ( $R_t$ ) mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes.

$$R_t = \Delta PD_t / \Delta I$$

Die Potentialdifferenz wiederum kann nach dem Ohmschen Gesetz aus dem Produkt des gemessenen Stromes und des Gewebewiderstandes berechnet werden:

$$PD = I_{sc} \cdot R_t$$

$I_{sc}$ , PD und  $G_t$  wurden kontinuierlich aufgezeichnet und der  $I_{sc}$  wurde, um einen direkten Vergleich mit den Ionenflüssen zu ermöglichen, als

Ladungstransfer, d.h. Fluss eines einwertigen Ions pro Zeiteinheit und Fläche, angegeben ( $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ).

$$1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\text{cm}^{-2} = 26,9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$$

### **3.2.1.3 Versuchsaufbau**

Alle Ussingkammerversuche wurden nach folgendem Grundaufbau durchgeführt: Nach Einspannen der Gewebe und der Überprüfung der Unversehrtheit anhand der Leitfähigkeit im „open-circuit-modus“, wurden den vier Kammern zufällig die Protokolle des Versuchs bzw. der Kontrolle zugeteilt. Als tauglich wurden Gewebe angesehen, deren Leitfähigkeit zu Beginn des Versuches nicht über  $25 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-2}$  lagen, da höhere Leitfähigkeiten ein Anzeichen für das Leckwerden eines Gewebes sein können und somit der parazelluläre Weg einen zu großen Einfluss auf die Messungen hätte. Nach einer mindestens 30 minütigen Aequilibrierungsphase, nach der mindestens 3 min lang stabile Werte der  $G_t$ , und des  $I_{sc}$  gemessen werden mussten, begann die Durchführung der Versuche.

Hierbei wurde in der Regel der Strom in einem Zeitraum von 15 min nach jeder Bedingungsänderung aufgezeichnet, bevor der nächste Schritt erfolgte. War ein Effekt in diesem Zeitraum nicht stabil, wurde länger gewartet, bis eine entsprechende Stabilität gegeben war.

### 3.2.1.4 Berechnungen

Zur Bestimmung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Amilorid wurde die Michaelis-Menten-Kinetik angewandt.

$$\Delta I_{\text{Amilorid}} = \frac{\Delta I_{\text{max}} \cdot [\text{Amilorid}]}{K_M + [\text{Amilorid}]}$$

$\Delta I_{\text{Amilorid}}$  =  $I_{\text{SC}}$ -Änderung durch Amilorid

$\Delta I_{\text{max}}$  = Maximale  $I_{\text{SC}}$ -Änderung

$K_M$  = Michaeliskonstante (halb maximale Hemmkonzentration)

$[\text{Amilorid}]$  = Amiloridkonzentration

## 3.2.2 Radioisotopen-Versuche

### 3.2.2.1 Messtechnik

Die Probengefäße (Zinsser Analytics, Frankfurt, Deutschland) wurden vor und nach der Probennahme gewogen, um so die tatsächlich abpipettierten Volumina in die Berechnungen aufzunehmen.

Zum Nachweis der eingesetzten  $\beta$ -ionisierenden Strahlung wurden die Proben mit Flüssigszintillator (rodizint® eco plus, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aufgefüllt und in einem  $\beta$ -counter (TRIS-CARB®2700TR Liquid scintillation analyzer, Packard, Frankfurt, Deutschland) respektive  $\gamma$ -counter (Wallac-Wizard-3, Wallac Oy, Turku, Finnland) gemessen.



### **3.2.2.2 Versuchsaufbau**

Der Aufbau zu dieser Versuchsserie entsprach derjenigen der einfachen Ussingkammerversuche, mit dem Unterschied, dass nach einer 30 minütigen Adaptationsphase und einer Paarung der Gewebe anhand ihrer Leitfähigkeiten, basolateral (= serosal = **s**) oder apikal (= mucosal = **m**) radioaktive Isotope ( $^{86}\text{Rb}^+$  bzw.  $^{22}\text{Na}^+$ ,  $^{36}\text{Cl}^-$  oder  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ) zugesetzt wurden. Diese Seite wurde als „heiße Seite“ bezeichnet. Zur Messung der Ionenbewegungen über das Epithel wurden zu Beginn der Messungen zwei Proben im Umfang von je 100  $\mu\text{l}$  von der heißen Seite entnommen, welche zuvor zusätzlich zu den 3,5 ml Pufferlösung auf diese Kammerseite gegeben worden waren. Bei den Versuchen zur Ermittlung des steady-states der Fluxe wurden von der „kalten Seite“ nun alle 20 min Proben im Umfang von 2 x 250  $\mu\text{l}$  genommen, welche durch isotopfreie Pufferlösungen ersetzt wurden. Eine Korrektur dieser Volumina wurde bei der Berechnung berücksichtigt (s. u.). Am Ende des Versuches wurden noch einmal zwei 100  $\mu\text{l}$  Proben von der heißen Seite entnommen, um eine Standardisierung der Fluxrate vornehmen zu können und um sicherzustellen, dass sich die Höhe des Standards während des Versuches nicht geändert hat, also kein Gewebeleck im Laufe des Versuches entstanden war.

Bei den Versuchen zur Untersuchung spezifischer Substanzeffekte wurden nach der im Vorversuch ermittelten Anpassungsphase (in der Regel 60 min) zwei Proben im Abstand von 20 min genommen, um die basale Fluxrate zu ermitteln. Danach wurde die zu untersuchende Substanz eingesetzt und nach weiteren 60 min der Effekt gemessen, indem erneut Proben im 20 minütigen Abstand gezogen wurden.

Nach gleichem Muster wurde verfahren, wenn statt der Zugabe von

Substanzen das Gewebe auf eine von Null abweichende Potentialdifferenz geklemmt wurde. Im Falle dieser Clamp-Protokolle, wie ich sie bei den  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Flux-Versuchen eingesetzt habe, wird das Gewebe nicht wie im normalen voltage-clamp-modus auf eine Potentialdifferenz von 0 mV geklemmt, sondern der Strom wird so modifiziert, dass das Gewebe auf einer gewissen Potentialdifferenz, zum Beispiel + oder – 25 mV mit Bezug auf die serosale Seite, gehalten wird. Hierdurch können die Anteile der gemessenen Fluxe unterschieden werden, die auf diffusiblen, potentialabhängigen Ionenbewegungen (= para- und transzellulär) bzw. nicht diffusiblen, potentialunabhängigen Transport (= transzellulär) zurückzuführen sind.

### **3.2.2.3 Berechnungen**

#### **3.2.2.3.1 Unidirektionale Ionenbewegungen**

Die Nettobewegungen ( $J_{\text{net}}$ ) wurden aus der Differenz der gemessenen Fluxrate von mucosal nach serosal ( $J_{\text{ms}}$ ) und serosal nach mucosal ( $J_{\text{sm}}$ ) berechnet.

$$J_{\text{net}} = J_{\text{ms}} - J_{\text{sm}}$$

### 3.2.2.3.2 Potentialabhängige und -unabhängige Fluxkomponenten

Zur Berechnung der Fluxanteile, die auf aktiven bzw. passiven Triebkräften beruhen, modifizierten Jackson und Norris (1985) ein Modell von Frizzell und Schultz (1972). Hiernach wurde folgende Formel zur Berechnung angewandt:

$$J = J_d \cdot \xi + J_m$$

dabei ist:

$$\xi = \frac{z \cdot F \cdot PD_T / R \cdot T}{e^{(z \cdot F \cdot PD_T / R \cdot T)} - 1}$$

- J = Gesamtflux eines Ions in die untersuchte Richtung
- $J_d \cdot \xi$  = diffusibler Fluxanteil, der potentialabhängig ist
- $J_m$  = Nicht diffusibler, potentialunabhängiger Anteil
- z = Wertigkeit des betreffenden Ions
- $PD_T$  = Potentialdifferenz über dem Epithel [V]
- T = Versuchstemperatur [K]
- F = FARADAY- Konstante (96478 C · mol<sup>-1</sup>)
- R = Gaskonstante (8.3143 J · K<sup>-1</sup> · mol<sup>-1</sup>)

## 3.2.3 Elektrische Feldstimulation (EFS)

### 3.2.3.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau entspricht dem der normalen Ussingkammerversuche. Als Pufferlösung wurde Standard-Tyrode verwendet. Zusätzlich wird jedoch vor dem Einspannen des Gewebes ein

Aluminiumstreifen von ca. 2 cm Breite und 5 cm Länge auf der Innenseite einer Ussingkammerhälfte fixiert, so dass er mit einem Rand des eingespannten Gewebes auf der serosalen Seite in Kontakt steht. Zwischen Gewebe und Aluminiumstreifen wird im rechten Winkel zu der Aluminiumbrücke ein Filterpapierstreifen gleicher Größe positioniert, der es durch regelmäßige Befeuchtung ermöglicht, einen leitenden Kontakt zwischen dem Metall und dem Gewebe herzustellen. Die andere Kammerhälfte wird in gleicher Weise präpariert, nur dass die Aluminiumbrücke mit dem gegenüberliegenden Rand des Gewebes verbunden ist und mit der mucosalen Seite in Kontakt steht. An den Metallbrücken können nun Stromklemmen befestigt werden, die über eine Isolationseinheit [Eigenbau, Werkstatt des Inst. Vet.-Physiol, Gießen, Deutschland] zur Messung des  $I_{sc}$  und mit einem Pulsgeber [Physlab, Gießen, Deutschland] verbunden sind, so dass ein Reizstrom auf das Gewebe gegeben werden kann. Der Strom fließt hierbei parallel zur Schleimhaut über das Gewebe. Zweck dieser Apparatur war das elektrische Isolieren von Reizstrom und appliziertem  $I_{sc}$  der Ussingkammern.

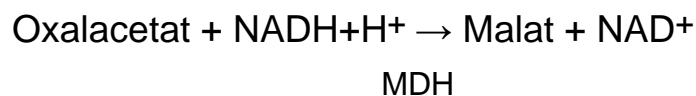
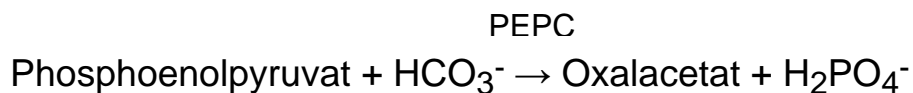
### **3.2.3.2 Elektrische Messung und Versuchsdurchführung**

Für die elektrische Feldstimulation wurde ein bipolarer Rechteck-Puls von 10 V mit einer Reizdauer von 1 ms je Pulsrichtung, die durch eine Zwischenpulszeit von 10 ms voneinander getrennt waren, mit einer Frequenz von 10 Hz für 5 min über das Gewebe in der Ussingkammer geschickt.

### 3.2.4 Bikarbonatspektroskopie

#### 3.2.4.1 Messtechnik

Die Bikarbonatbestimmung wurde mit Hilfe des Test-Kits CD127 (Randox Laboratories, Crumlin, England) durchgeführt. Durch die Abnahme der Extinktion bei 340 nm durch den NADH+H<sup>+</sup>-Verbrauch kann hierbei die Menge des in der Probe enthaltenen Bikarbonats indirekt bestimmt werden. Das Messprinzip besteht in einer Enzymreaktion, wobei das im Puffer enthaltene NADH zu NAD<sup>+</sup> oxidiert. Das Reaktionsprinzip basiert auf folgendem Zusammenhang:



PEPC = Phosphoenolpyruvatcarboxylase

MDH = Malatdehydrogenase

Wie aus der Gleichung zu entnehmen ist, besteht ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 zwischen der NADH-Abnahme und dem HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Verbrauch.

#### 3.2.4.2 Versuchsaufbau und -durchführung

Die Extinktionsmessung wurde bei 340 nm und 37°C mit dem Spectrophotometer UV-DU 640 (Beckmann, Fullerton, USA) durchgeführt. Die Dauer der Messung betrug 5 min, das Ablaufschema entsprach hierbei dem Produktzettel von Randox für das CD127 Test-Kit.

Der Hersteller garantiert eine lineare Messung im Bereich von  $4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  bis  $5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Bikarbonat.

Nach Einspannen des Gewebes wurde eine Äquilibrierungsphase von etwa 40 Minuten abgewartet bis ein stabiler  $I_{\text{sc}}$  und  $G_{\text{t}}$  erreicht war. Die Bikarbonatsekretion wurde gemessen, indem aus der Badlösung mucosal sodann eine  $200 \mu\text{l}$  Probe entnommen wurde, was den Nullpunkt des Versuches markierte. Auf der serosalen Seite wurden ebenfalls  $200 \mu\text{l}$  entnommen und verworfen um die Volumina auf beiden Seiten des Gewebes gleich zu halten. Nach 30 min wurde der Vorgang wiederholt und im Anschluss beidseits des Gewebes Forskolin zugesetzt, um den regulatorischen Einfluss dieser Substanz auf die Bikarbonatsekretion zu untersuchen. Nach weiteren 30 min wurde die letzte Probe entnommen.

Die Proben wurden in  $200 \mu\text{l}$  fassenden Eppendorfgefäße gefüllt und so verschlossen, dass sich keine Luft mehr über der Flüssigkeit befand, um einen  $\text{CO}_2$ -Austausch und somit eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern.

### **3.2.5 Histologische Präparate**

#### ***3.2.5.1 Kryofixation des Uterus***

Um das Gewebe für die Gewebeschnitte einzufrieren, wurde das Uterusgewebe wie unter Pkt. 3.1.2 beschrieben zerteilt und mit Cyanacrylklebstoff auf Plexiglashalter aufgeklebt [Schultheiss et al., 2002]. Diese Präparate wurden dann in einer Glasschale in Gelatinelösung eingebettet, so dass sich ober- und unterhalb des Gewebes eine etwa 1 cm dicke Gelatineschicht befand. Durch

Perforationen am Rand des Gewebes mit einer Kanüle in einem Abstand von 5 mm wurde eine Verbindung der beiden Gelatineschichten gewährleistet. Nach Erstarren der Gelatine wurden Gelatine-Uterus-Blöcke (1 x 1 x 0,5 cm) mit Hilfe eines spitzen Skalpells aus der eisgekühlten Schale herauspräpariert und sagittal zweigeteilt.

Jede Hälfte wurde einzeln mit Tissue Tec<sup>®</sup> auf einen Korken aufgeblockt und für 2 min in stickstoffgekühltem Isopentan eingetaucht bis der Gewebeblock vollständig gefroren war. Bis zur Weiterverarbeitung wurde das Präparat vom Korken abgetrennt bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.2.5.2 Herstellung der Gewebeschnitte**

Mit einem Kryostaten wurden bei einer Betriebstemperatur von  $-24^{\circ}\text{C}$  in der Kühlkammer und  $-20^{\circ}\text{C}$  für den Objekthalter, die Gewebeböcke in 16  $\mu\text{m}$  dicke Scheiben geschnitten. Hierfür wurden die gefrorenen Präparate mit Tissue Tec<sup>®</sup> auf einen beweglichen Objekthalter aufgeblockt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und auf Eis stehend innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur bis zur Färbung getrocknet.

### **3.2.5.3 Färbung der Gewebeschnitte**

Um ein morphologisches Bild des Uterusgewebes zu erhalten (s. Abb. 7+8), wurden die Schnitte nach der Trocknung mit Kresylviolett gefärbt. Hierfür wurden die Objektträger 1-2 Minuten in 0.1 %iger Kresylviolett-acetatlösung (w/v) geschwenkt und im Anschluss an der Luft getrocknet.



### 3.2.6 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistischen Vergleiche wurden im Falle einer Normalverteilung mit einem gepaarten oder ungepaarten Student t-Test durchgeführt. War die Normalverteilung nicht gegeben, so wurde einer der folgend beschriebenen Tests angewendet.

Zeigte ein zuvor durchgeführter F-Test eine signifikante Abweichung zwischen den Varianzen der zu vergleichenden Mittelwerte, so wurde der Mann-Whitney-U-Test als nicht parametrische Methode angewandt. Im Falle nicht-normal-verteilter Werte erfolgte eine paarige Signifikanzprüfung mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon matched pairs Test. Im Falle mehrerer zu vergleichender Gruppenmittelwerte wurde eine Varianzanalyse durchgeführt und die Signifikanzen sodann mit einer linearen Kontrastanalyse durch den Tukey-Test ermittelt.

Die Anzahl der Gewebepräparationen ist mit „n“ angegeben. In den Balkendiagrammen sind die SEM-Werte aus Gründen der Übersichtlichkeit nur in eine Richtung eingezeichnet. Die Höhe der Messbalken stellt den Mittelwert dar.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Berechnungen wurden mit Hilfe der PC-Programme Statmost™ 3.5 (Dataxiom Software Inc., Los Angeles, USA) und Lotus™ 1-2-3 (Lotus Software/IBM Software Group, Cambridge, USA) durchgeführt. Für Graphiken und Bilder kamen die Programme Lotus Freelance Graphics (Lotus Software/IBM Software Group, Cambridge USA) und Origin™ 5.0 (Microcal, Northampton, USA) zum Einsatz.

### 4. Ergebnisse

#### 4.1. Standardisierung von Kurzschlussstrom und Leitfähigkeit

Für die Durchführung der Ussingkammerversuche kam ausschließlich ungestripptes Epithel zum Einsatz. Das in anderen Arbeiten beschriebene Strippen [Vetter und O'Grady, 2005], das Entfernen von Serosa und großen Teilen der Muskularis, führte in Vorversuchen zu einem etwa 50 %igen Anstieg der Leitfähigkeit und erhöhte den gemessenen Kurzschlussstrom um mehr als das Doppelte, so dass nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die mechanische Dehnung einen verfälschenden Einfluss auf die elektrischen Parameter des Gewebes hat. Zusätzlich war kein statistischer Unterschied im  $\Delta I_{SC}$  zwischen eingesetzten Substanzen bei gestripptem und ungestripptem Gewebe festzustellen (s. Tab. 2). Ein mögliches Diffusionsproblem der serosal applizierten Substanzen bei ungestripptem Gewebe scheint somit nicht zu bestehen.

## Ergebnisse

		<b>Gestripptes Gewebe</b> (n = 7)	<b>Ungestripptes Gewebe</b> (n = 6)
Baseline $I_{sc}$	$\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	$1.87 \pm 0.26^\#$	$0.84 \pm 0.29$
Forskolin $\Delta I_{sc}$		$-0.72 \pm 0.19^*$	$-1.00 \pm 0.35^*$
Baseline $G_t$	$\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$	$34.9 \pm 3.0^\#$	$16.2 \pm 2.9$
Forskolin $\Delta G_t$		$19.1 \pm 6.0^{*\#}$	$2.9 \pm 1.1^*$

Tab. 2: Einfluss der Gewebepräparation auf den Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) und die Leitfähigkeit ( $G_t$ ) in Tyrode-Lösung: Die Herstellung eines Mucosa-Submucosa-Präparates führt zu signifikanten Veränderungen der basalen Werte, während der Einsatz von Forskolin ( $5 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , mucosal (m) + serosal (s)) nur in der  $G_t$  signifikante Abweichungen vom ungestripptem Gewebe ergab. # kennzeichnen signifikante Unterschiede zu ungestripptem Epithel,  $p < 0.05$ . \* kennzeichnen signifikante Unterschiede zur Baseline vor Zugabe der Substanz,  $p < 0.05$ .

Weitere Vorversuche befassten sich mit der Frage, ob sich auch bei den von uns verwendeten Hühnern die Transporteigenschaften der Gewebe von zyklusaktiven und -inaktiven Tieren deutlich unterscheiden, wie in der Literatur beschrieben [Cohen & Hurwitz, 1973]: Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der  $G_t$  und des  $I_{sc}$  bei zyklusinaktiven Tieren, die sich in einem Bereich außerhalb der doppelten Standardabweichung von zyklusaktiven Tieren befand (s. Tab. 3), so dass bei weiteren Versuchen zyklusinaktive Tiere ausgeschlossen wurden. Die Unterscheidung, ob sich ein Tier im Legezyklus befindet oder nicht, wird vor allem anhand der Kammgröße und Färbung vor der Schlachtung und mit der entscheidenden Kontrolle nach der Schlachtung durch Betrachtung der Funktionsgebilde am Ovar (bei inaktiven Tieren fehlen die

## Ergebnisse

Dottereinlagerungen an den Follikeln) und der Uterusgröße (ist bei inaktiven Tieren um etwa 2/3 kleiner) vorgenommen.

Dadurch, dass in Abhängigkeit von der Eibildung bzw. der Schalenbildung *in vivo* unterschiedliche Ionentransportvorgänge erfolgen [Nys, 1987], wurde der basale  $I_{sc}$  und die basale  $G_t$  von Tieren mit bzw. ohne Ei im Uterus verglichen (s. Tab. 3). Es konnten keine Unterschiede des basalen  $I_{sc}$  und der basalen  $G_t$  festgestellt werden, so dass diesbezüglich keine Selektion der Tiere notwendig war. Da dies Unterschiede in der Reaktion auf chemische Substanzen nicht ausschließt, wurde zu jedem Versuch notiert, ob sich zum Zeitpunkt der Schlachtung ein Ei in der Schalendrüse befand, um mögliche Variationen auf bestimmte Substanzen diesem Umstand zuordnen zu können (siehe hierzu auch Pkt. 4.2.1).

	<b>Baseline <math>I_{sc}</math></b> ( $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	<b>Baseline <math>G_t</math></b> ( $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	<b>n</b>
Ovar inaktiv	$0.94 \pm 0.13\#$	$27.78 \pm 2.91\#$	30
Ovar aktiv mit Ei	$0.53 \pm 0.09$	$9.85 \pm 0.55$	72
Ovar aktiv ohne Ei	$0.56 \pm 0.10$	$10.40 \pm 0.65$	64

Tab. 3: Gewebe von zyklusinaktiven Tieren zeigten einen signifikant höheren Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) und eine höhere Leitfähigkeit ( $G_t$ ), während sich keine Unterschiede zwischen zyklusaktiven Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Eibildung ergaben. Mit/ ohne Ei = Ei im Uterus vorhanden ja/ nein. # kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen,  $p < 0.05$ .

Als letzter Ansatz wurde getestet, wie lange ein Gewebe nach Schlachtung des Tieres noch funktionsfähig bleibt. Als Parameter dienten erneut der basale  $I_{sc}$  und die basale  $G_t$ . Da sich

erstaunlicherweise auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen frisch präpariert eingespanntem Gewebe und Gewebe, das 2 Stunden - und länger - in Pufferlösung gelagert wurde, ergab, konnten wir zur Senkung des Versuchstierverbrauches die Uteri in 8 gleichgroße Teile zerlegen und somit zwei Versuche aus ein und dem selben Tier hintereinander durchführen (s. Tab. 4).

	<b>Direkt verwendetes Gewebe</b> (n = 12)	<b>Später verwendetes Gewebe</b> (n = 23)
$I_{sc}$ ( $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	$1.12 \pm 0.34$	$1.03 \pm 0.15$
$G_t$ ( $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	$14.5 \pm 0.92$	$17.63 \pm 1.93$

Tab. 4: Direkt verwendetes Gewebe zeigt keine signifikanten Unterschiede des basalen  $I_{sc}$  und der basalen  $G_t$  gegenüber Geweben, die über zwei Stunden nach Organentnahme in den Versuch genommen wurden.

## 4.2. Kationenbewegungen über das Uterusepithel

### 4.2.1 Natriumbewegungen über das Uterusepithel

Um den unter voltage-clamp-Bedingungen gemessenen  $I_{sc}$  den jeweiligen Ionenbewegungen zuordnen zu können, wurden zunächst diverse Blockerversuche in Standard-Tyrode (alle Pufferzusammensetzungen sind unter Pkt. 3.1.3. aufgeführt) durchgeführt. Der Einsatz von Amilorid, einem epithelialen Natriumkanalblocker, ergab eine halbmaximale Hemmung des basalen  $I_{sc}$  bei einer Konzentration von  $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (n=15), wenn der Inhibitor auf der mucosalen Seite

appliziert wurde. Der maximal hemmbare  $I_{SC}$  ( $\Delta I_{max}$  der Michaelis-Menten-Gleichung; s. Pkt. 3.2.1.4) lag bei  $-0.68 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ , was bereits mit einer Konzentration von  $10^{-4} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  erreicht wurde. Da es nach einer Studie von Garty & Benos in diesem Bereich jedoch zusätzlich zu einem Block von Natrium-Protonen-Austauschern kommen kann [Garty & Benos 1988], wurde Amilorid nur in einer Konzentration von  $10^{-6} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  zur Vorbehandlung eingesetzt.

Es zeigte sich, dass der gemessene Amilorideffekt (=  $I_{SC}$ -Hemmung) unabhängig von der Eibildung war. In der Phase der Calciumsekretion (= mit Ei im Uterus) induzierte Amilorid ( $10^{-6} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) einen  $I_{SC}$ -Abfall um  $-0.33 \pm 0.06 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n=27$ ,  $p<0.05$  gegenüber Baseline). Für Gewebe ohne Ei im Uterus ergab sich ein  $I_{SC}$ -Abfall um  $-0.40 \pm 0.07 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n=38$ ;  $p<0.05$  gegenüber Baseline; Unterschied zu Uterus in Schalenbildung nicht signifikant).

Im Laufe der Versuche fiel auf, dass der basale  $I_{SC}$  eine große Streuung zeigt. Auch die Höhe der Amiloridwirkung variierte stark. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Schwankungen auf Unterschieden in der Natriumresorption in Abhängigkeit vom Stadium der Eibildung beruhen. Abb. 14 zeigt, dass eine positive Korrelation zwischen dem basalen  $I_{SC}$  und der Hemmwirkung von Amilorid besteht. Einige Gewebe zeigten sogar negative Ausgangsströme, wobei Amilorid hierbei praktisch keine hemmende Wirkung mehr hatte.

## Ergebnisse

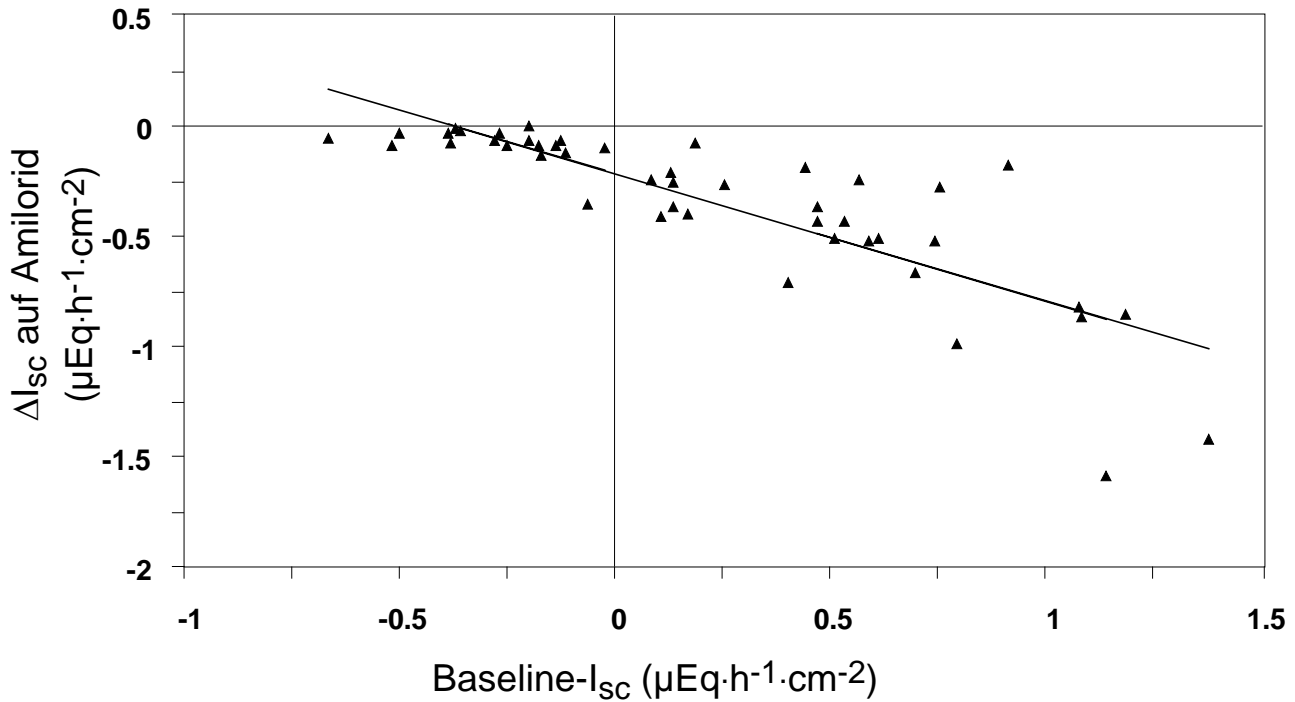


Abb. 14: Die Wirkung von Amilorid ( $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup>; m) auf den basalen  $I_{SC}$ : Das Ausmaß der amilorid-induzierten Hemmung des Kurzschlussstroms hängt von der Höhe des Ausgangs- $I_{SC}$  ab.  $\Delta I_{SC} = -0.21 + (-0.58) \times \text{Baseline-}I_{SC}$ ; Bestimmtheitsgrad  $B=0,69$ ;  $n=46$

Zur Bestätigung einer basalen Natriumresorption wurden Versuche mit einem radioaktiven Natriumisotop ( $^{22}\text{Na}^+$ ) in Tyrode-Pufferlösung durchgeführt. Hierzu wurden zur Ermittlung des Zeitpunktes, zu dem eine stabile Transportrate erreicht ist, bei unidirektionalen Fluxmessungen von mucosal nach serosal ( $J_{ms}$ ) in 20minütigen Abständen Proben entnommen. Es ergab sich daraus, dass erst nach ca. 60 min solch ein stabiler Zustand erreicht wurde (s. Abb. 15).

## Ergebnisse

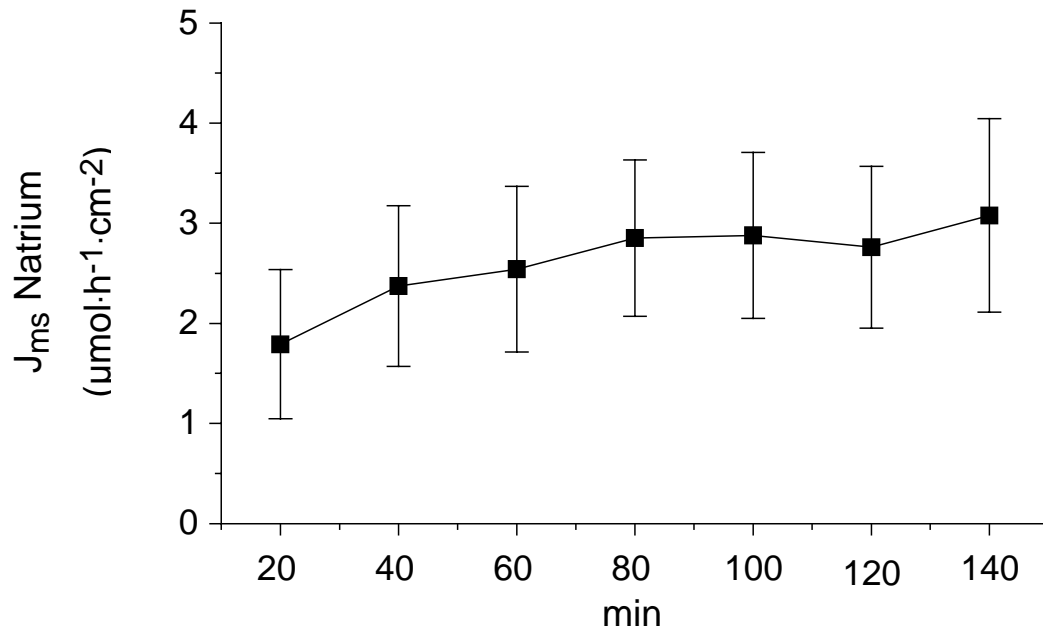


Abb. 15: <sup>22</sup>Na<sup>+</sup>-Fluxmessungen unter basalen Bedingungen von mucosal nach serosal: Das steady-state ist erst nach 60 min erreicht (n=8).

In Folgeversuchen konnte zu diesem Zeitpunkt ein  $J_{\text{net}}$  von  $3.74 \pm 1.18$   $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  gemessen werden. Der  $J_{\text{ms}}$  lag bei  $7.73 \pm 1.40$   $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  (n=8), der  $J_{\text{sm}}$  bei  $3.99 \pm 0.42$   $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  (n=8). Die  $I_{\text{sc}}$ -Daten ergaben einen basalen Strom von  $0.84 \pm 0.14$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  (n=16). Im Gegensatz zu der auch hier auftretenden signifikanten Hemmung des  $I_{\text{sc}}$  durch Amilorid ( $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal) ( $\Delta I_{\text{sc}} = -0.61 \pm 0.11$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; n=16, p<0.05), konnte eine Hemmung des Natrium-Fluxes, möglicherweise aufgrund der starken Streuung, nicht nachgewiesen werden.

Da die Nettoresorption 4-5 mal höher ist als der amiloridinduzierte Stromabfall, muss ein nicht unbedeutender Teil des Natriumtransportes auf elektroneutralem Weg bzw. amiloridinsensitivem Wege erfolgen.



Dennoch wurden Versuche zu anderen Ionentransportvorgängen immer in Anwesenheit von Amilorid ( $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal) durchgeführt, um die Beteiligung von Natriumströmen zu minimieren.

In diesem Zusammenhang wurde auch La<sup>3+</sup> ( $10^{-3}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal), ein Blocker nicht-selektiver Kationenkanäle [Lagnado et al., 1990] unter Amiloridvorbehandlung getestet, der ebenfalls eine leichte Hemmung des Kurzschlussstromes ( $-0.16 \pm 0.06$   $\mu$ Eq·h<sup>-1</sup>·cm<sup>-2</sup>; n=8, p<0.05) bewirkte.

### 4.2.2 Kaliumbewegungen über das Uterusepithel

*In vivo* Ergebnisse zeigen, dass eine Kaliumsekretion während der Schalenbildung stattfindet [Eastin & Spaziani, 1978b]. Aus *in vitro* Versuchen gibt es hierzu bislang keine Angaben. Die Versuche wurden in Tyrodelösung nach Vorbehandlung mit Amilorid ( $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal) durchgeführt.

Keiner der getesteten Kaliumkanalblocker war in der Lage einen I<sub>SC</sub>-Anstieg auszulösen, so wie man es erwarten könnte, wenn eine spontane Kaliumsekretion durch den Blocker gehemmt würde (Literaturübersicht zur Wirkweise der eingesetzten Blocker s. Cook, 1990).

293B ( $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal), ein Blocker cAMP-abhängiger Kaliumkanäle [Greger et al., 1997], und der unspezifische Blocker Ba<sup>2+</sup> ( $10^{-2}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal) zeigten hierbei keinen signifikanten Einfluss auf den basalen I<sub>SC</sub>, während der unspezifische Blocker Quinin ( $10^{-3}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal) und Tetrapentylamonium ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal), ein Blocker Calcium-abhängiger Kaliumkanäle, sogar eine signifikante Absenkung des I<sub>SC</sub>

## Ergebnisse

auslösten. Die Einzelergebnisse der eingesetzten Blocker sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Kaliumkanalblocker	$\Delta I_{sc}$ ( $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	n
293B	$-0.05 \pm 0.02$	6
Ba <sup>2+</sup>	$-0.10 \pm 0.05$	7
Quinin	$-0.58 \pm 0.07$ #	6
TPeA	$-0.42 \pm 0.20$ #	6

Tab. 5: Wirkung von 293B ( $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup>), Ba<sup>2+</sup> ( $10^{-2}$  mol·l<sup>-1</sup>), Quinin ( $10^{-3}$  mol·l<sup>-1</sup>) und Tetrapentylamonium ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup>) auf den basalen  $I_{sc}$  bei mucosaler Gabe. # kennzeichnen signifikante Unterschiede ( $p < 0.05$ ) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle.

Um über die tatsächliche Kaliumtransportrichtung Aufschluss zu erhalten, setzten wir Rubidiumfluxe ein. <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>, das wie K<sup>+</sup> über das Epithel transportiert wird [Perrone & Mc Bride, 1988] ist gegenüber <sup>42</sup>K<sup>+</sup> deutlich besser geeignet, da es mit einer Halbwertszeit von 18.7 Tagen ermöglicht, Versuche über einige Wochen unter gleichen Bedingungen durchzuführen, während dies bei einer Halbwertszeit von 12.4 Stunden, wie sie bei <sup>42</sup>K<sup>+</sup> vorliegt, nicht möglich ist.

Nach entsprechend langer Inkubationszeit, um einen Gleichgewichtszustand zu erreichen, lagen die basal gemessenen Rubidiumbewegungen nur im nmol-Bereich ( $J_{net} = 0.120 \pm 0.099$   $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; n=4) und waren aufgrund der starken Streuung nicht signifikant von Null verschieden. Sie setzten sich aus einem  $J_{ms}$  von  $0.147 \pm 0.098$   $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  und einem  $J_{sm}$  von  $0.028 \pm 0.006$   $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  zusammen, was die Aussage zulässt, dass der  $J_{ms}$  höher liegt als der  $J_{sm}$ .

Dies bestätigt somit die Aussage der Kaliumkanalblockerversuche, nämlich dass am isolierten Hühneruterus keine Kaliumsekretion gemessen werden kann.

### **4.2.3 Calciumbewegungen über das Uterusepithel**

Da es sich bei dem Uterusgewebe um ein Calcium sezernierendes Gewebe handelt, liegt die Frage nahe, wie groß der Anteil des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromes an dem basal gemessenen Kurzschlussstrom ist. Hierbei ergibt sich in Ussingkammerversuchen das Problem, dass Calciumionen, die über eine Calcium-ATPase auf die mucosale Seite transportiert werden, einen Abfall des  $I_{sc}$  bewirken. Hingegen löst der Transport über einen  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, der in der Regel drei Natriumionen in die Zelle aufnimmt und dafür ein Calciumion nach mucosal abgibt, letztlich also zu einer positiven Ladungsverschiebung von mucosal nach serosal führt einen  $I_{sc}$ -Anstieg aus.

Daher kam zur genaueren Differenzierung Dichlorobenzamil (DCB) zum Einsatz. Es handelt sich um ein Amiloridderivat, welches in der eingesetzten Konzentration ( $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  mucosal) zur Blockade eines Natrium-Calcium-Austauschers führen müsste [Kleyman & Cragoe, 1988]. Marshall et al. zeigten durch genetischen Vergleich mit bekannten Gen-Sequenzen klassischer Natrium-Calcium-Austauscher von Säugern, dass dieser Transporter auch im Huhn zu existieren scheint [Marshall et al., 2005]. Daher kann man davon ausgehen, dass DCB an diesen Transportern wirken sollte.

Als Amilorid-Derivat ist DCB auch in der Lage, den ENaC zu hemmen, daher fanden die Untersuchungen hierzu immer unter Amilorid-

Vorbehandlung statt. In Anwesenheit von Amilorid ( $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal) konnte in Standard-Tyrode eine Kurzschlussstromhemmung auf DCB ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal) um  $-0.31 \pm 0.14$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  (n=6) verzeichnet werden, was einen Hinweis auf eine mögliche Blockade eines Natrium-Calcium-Austauschers ergab (siehe aber Diskussion).

Durch das Anlegen eines von mucosal nach serosal gerichteten Calciumgradienten (EGTA-Tyrode serosal/ Standard-Tyrode mucosal) kann versucht werden, diesen möglicherweise vorhandenen Natrium-Calcium-Austauscher in seiner Transportrichtung umzudrehen. DCB müsste unter diesen Bedingungen theoretisch einen Stromanstieg hervorrufen. Die Administration von DCB führte jedoch wie unter Standard-Tyrode-Bedingungen zu einem Stromabfall ( $-0.17 \pm 0.06$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; n=7, p<0.05).

Des Weiteren wurde versucht mit Hilfe von EGTA-Zusatz in mucosaler calciumfreier Badlösung den physiologischerweise vorkommenden Entzug des transportierten Calciums aus dem System, welcher durch gleichzeitigen Transport von Bikarbonat durch das Ausfällen in Form von  $\text{CaCO}_3$  entsteht, zu imitieren, und so eine Steigerung der Natrium-Calcium-Austauscher-Aktivität zu bewirken. Somit hätte der Einsatz von DCB eine stärkere Hemmung des  $I_{\text{sc}}$  hervorrufen müssen. Aber auch dieser Ansatz führte in Ussingkammerversuchen zu paradoxen Ergebnissen. Es konnte lediglich eine um mehr als die Hälfte reduzierte Hemmung des  $I_{\text{sc}}$  auf DCB bei mucosalem Einsatz von EGTA-Tyrode verzeichnet werden ( $-0.07 \pm 0.03$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; n=6). Daher sollten Fluxmessungen mit  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Aufschluss über das Zustandekommen dieser Ergebnisse geben. In Standard-Tyrode wurde eine statistisch signifikante Nettosekretion nach einer 60minütigen Stabili

## Ergebnisse

---

sierungsphase von  $J_{\text{net}} = -7.16 \pm 3.30 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n=10$ ) ermittelt. Diese errechnete sich aus einem  $J_{\text{ms}}$  von  $9.32 \pm 2.83 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  und einem  $J_{\text{sm}}$  von  $16.49 \pm 4.57 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Die basale Calciumsekretion konnte somit auch am isolierten Hühneruterus wie unter *in vivo* Bedingungen gezeigt werden, wobei die Transportrate sehr gering war. Andererseits kann eine nennenswerte Beteiligung von Calciumionen unter diesen Bedingungen am basalen  $I_{\text{sc}}$  ( $1.02 \pm 0.82 \text{ }\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=20$ ) ausgeschlossen werden, denn eine Transportrate des zweiwertigen Kations Calcium von  $7.2 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  wäre mit nur  $0.014 \text{ }\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  an diesem basalen Strom beteiligt, entsprechend also nur ca. 1.5 % des gemessenen  $I_{\text{sc}}$ .

Es wurde versucht den basalen  $J_{\text{sm}}$  durch Einwaschen einer calciumfreien Tyrodelösung mit EGTA-Zusatz zu steigern. Es ergab sich ein signifikanter Anstieg der Calciumsekretion von  $J_{\text{sm}} = 20.27 \pm 6.5 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  auf  $J_{\text{sm}} = 43.88 \pm 10.09 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n=8$ ). Diese faktische Verdoppelung des transportierten Calciums zeigt den entscheidenden Einfluss, den das Aufrechterhalten eines Calciumgradienten, wie er *in vivo* der Fall ist, auf die Transportleistung des Gewebes hat. Allerdings lag auch bei diesen Bedingungen die Calciumtransportrate noch weit unter den Erwartungen.

Neben diesem chemischen Gradienten als Triebkraft für die Calciumbewegung liegt physiologischerweise auch eine Potentialdifferenz über dem Gewebe, die bei positiver Blutseite etwa 16 mV ausmacht und eine zusätzliche elektromotorische Triebkraft erzeugt [Eastin & Spaziani, 1978b]. Das Anlegen einer transepithelialen PD imitiert diese Bedingungen und ermöglicht darüber hinaus eine Differenzierung von PD-abhängigem und -unabhängigem Calcium-

## Ergebnisse

transport. Dazu wurden Clamp-Protokolle entworfen, bei denen die natürlicherweise vorkommende PD zwischen Uteruslumen und Blutseite berücksichtigt wurde und zusätzlich eine, der natürlichen Potentialdifferenz entgegengesetzte PD zeitlich versetzt an das Gewebe angelegt wurde. So konnten die unterschiedlichen Calciumtransportraten bei + 25 mV, 0 mV und – 25 mV (Ladungsangaben in Bezug auf die Blutseite) untersucht werden (s. Abb. 16, Tab. 6).

Es zeigte sich, dass ohne transepitheliale Potentialdifferenz (PD= 0 mV) eine Sekretion ( $J_{\text{net}} = -3.67 \pm 4.25 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; n=8) bestand, die sich deutlich steigern ließ, wenn die Blutseite auf ein positives Potential (PD = +25 mV) geklemmt war ( $J_{\text{net}} = -22.85 \pm 8.96 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; n=8) und sich sogar in eine Resorption umwandelte, wenn die Blutseite negativ (PD = -25 mV) geladen wurde ( $J_{\text{net}} = 12.60 \pm 4.89 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; n=8).

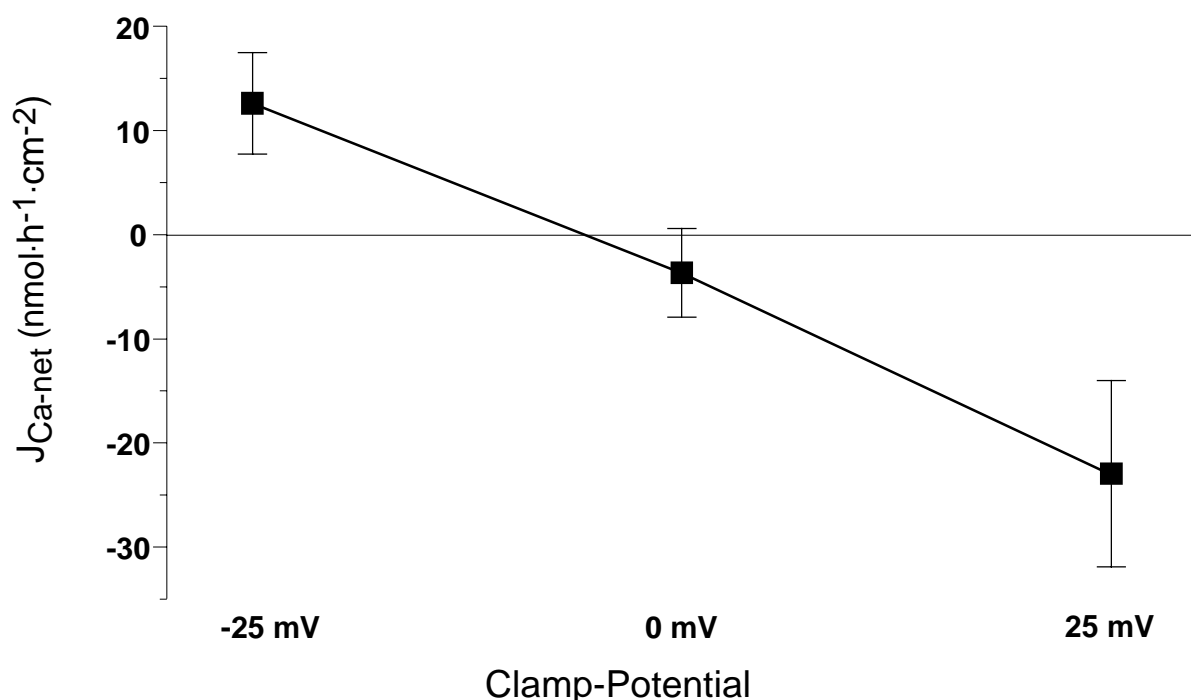


Abb. 16: Die Nettofluxe von  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  zeigen, dass die Potentialdifferenz (Bezug auf Blutseite=serosal) einen entscheidenden Einfluss auf die Transportrichtung und -menge hat (> 0 = Resorption, < 0 = Sekretion; n=8,  $p < 0.05$ ).

## Ergebnisse

Um den oben beschriebenen (siehe S. 64) paradoxen DCB-induzierten  $I_{SC}$ -Abfall näher zu charakterisieren, wurde DCB in Verbindung mit diesen Clamp-Protokollen eingesetzt. Aber auch bei diesem Protokoll ergaben sich keine hemmenden Effekte auf die Calciumsekretion nach Zusatz von DCB (s. Tab. 5), womit es als unwahrscheinlich anzusehen ist, dass der DCB induzierte  $I_{SC}$ -Abfall auf der Blockade eines  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauschers beruht.

Ein weiterer Versuch sollte Aufschluss über die Existenz eines evtl. vorhandenen aber DCB-insensitiven  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauschers geben. Durch mucosales Einwaschen einer natriumfreien Tyrode wird hierbei versucht diesen fraglichen Transporter umzudrehen und dies anhand einer Reduktion der Calciumsekretion sichtbar zu machen.

Aber auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu den beiden vorangegangenen Clamp-Protokollen (s. Tab. 6).

	<b>-25 mV</b> (nmol·h <sup>-1</sup> ·cm <sup>-2</sup> )	<b>0 mV</b> (nmol·h <sup>-1</sup> ·cm <sup>-2</sup> )	<b>25 mV</b> (nmol·h <sup>-1</sup> ·cm <sup>-2</sup> )	<b>n</b>
$J_{net}$ basal	12.60 ± 4.89	-3.67 ± 4.25	-22.85 ± 8.96	7
$J_{net}$ + DCB	14.48 ± 5.40	-8.03 ± 2.35	-21.55 ± 4.24	8
$J_{net}$ + NMDG	22.47 ± 6.94	-5.47 ± 6.01	-25.97 ± 11.74	8

Tab. 6: Die basale Nettotransportrate des  $^{45}Ca^{2+}$  unterscheidet sich bei keiner der angelegten Potentialdifferenzen signifikant von dem Protokoll unter *Dichlorobenzamil*-Zusatz ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal) oder dem Protokoll bei dem ein von serosal nach mucosal gerichteter  $Na^+$ -Gradient angelegt wurde.  $Na^+$  wurde zu diesem Zweck mucosal durch das impermeable Kation NMDG<sup>+</sup> ersetzt.

Die Differenzierung der potentialabhängigen und -unabhängigen Flux-Komponenten gelingt über die von Frizzel und Schultz (1972) erarbeitete Formel (s. Kap. 3.2.2.3.2). Trägt man die so ermittelten Daten in einem Diagramm auf, so ergibt der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse den potentialunabhängigen, transzellulären Anteil, während die Steigung der Geraden die potentialabhängige bzw. diffusible Komponente widerspiegelt (s. Abb. 17). Es wird deutlich, dass der  $J_{sm}$  und der  $J_{ms}$  nahezu an der gleichen Stelle, bei etwa  $5 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  die Y-Achse schneiden, was bedeutet, dass der potentialunabhängige Anteil des Calciumtransportes in beide Richtungen etwa gleich groß ist. Dies stellt insofern eine Überraschung dar, als es bedeutet, dass es auch für die physiologischerweise unbedeutende ms-Richtung einen elektro-neutralen beziehungsweise energieverbrauchenden Transporter geben muss. Die größere Steigung des  $J_{sm}$  gegenüber des  $J_{ms}$  deutet daraufhin, dass die natürlicherweise vorhandene Potentialdifferenz zwischen Blut und Lumen für einen effektiven Transport des Calciums in das Lumen der Schalendrüse ausgenutzt wird.

Die graphische Darstellung der drei durchgeführten Clamp-Protokolle macht deutlich, dass schon aufgrund der starken Streuung keine signifikanten Unterschiede zu erwarten waren (s. Abb. 17-19). Außerdem bedeutet der sehr geringe Calciumtransport im nmol-Bereich auch, dass kein nennenswerter parazellulärer Transport stattfindet.



## Ergebnisse

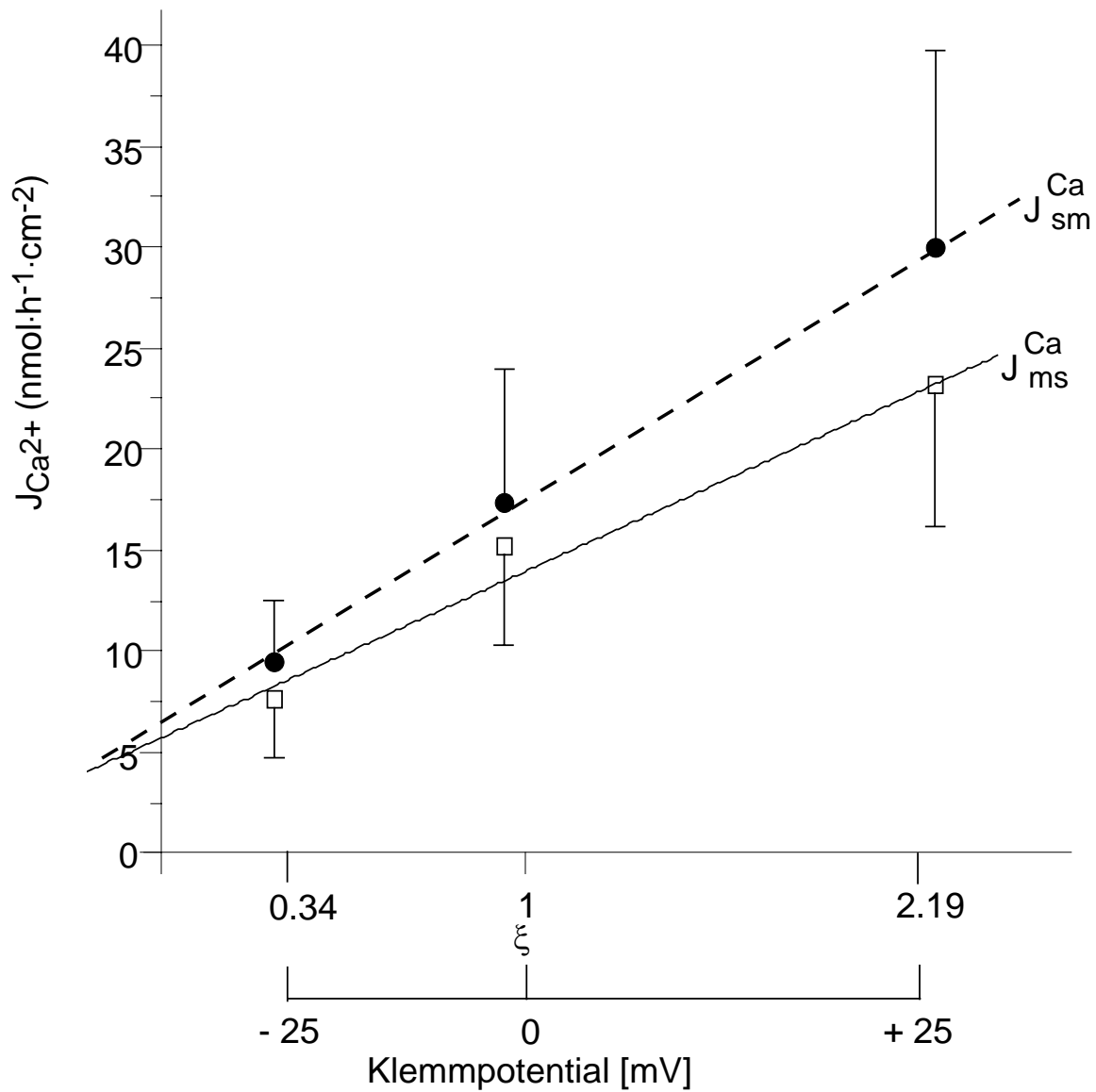


Abb. 17: Calciumtransport in Abhängigkeit der transepithelialen Potentialdifferenz (-25 ,0 ,+25 mV). Referenzseite für die Angabe des Klemmpotentials ist die Gewebeseite, von der aus der Flux gemessen wurde. Werte sind Mittelwerte (●=sm, □=ms) von n=8; Streubalken = SEM

Regressionen: -- = sm =  $5.94 + \xi \cdot 11.07$  ; B=0.18

— = ms =  $5.60 + \xi \cdot 8.24$  ; B=0.18

## Ergebnisse

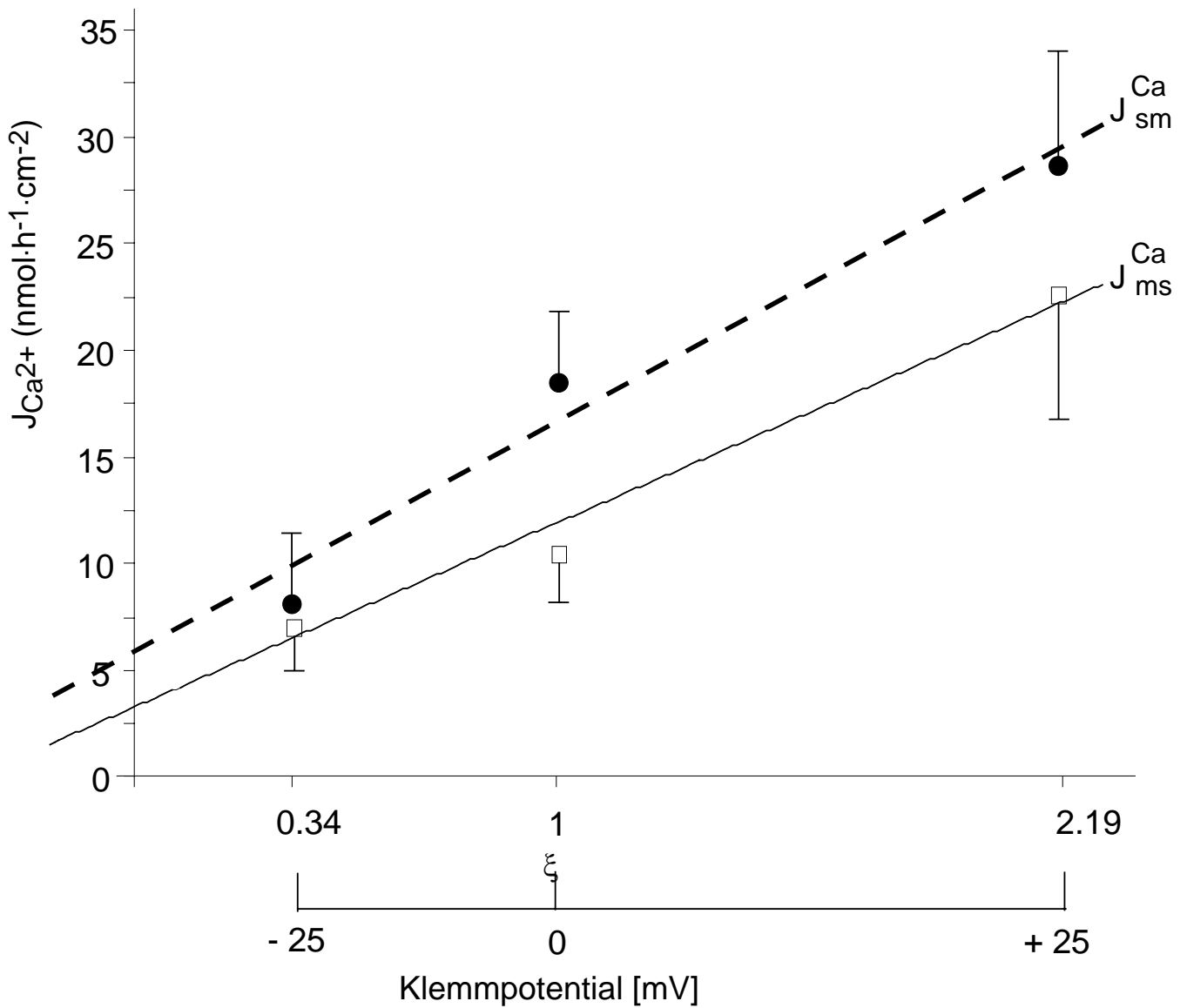


Abb. 18: Calciumtransport in Abhängigkeit der transepithelialen Potentialdifferenz (-25 ,0 ,+25 mV) unter Dichlorobenzamil-Einsatz ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal). Referenzseite für die Angabe des Klemmpotentials ist die Gewebeseite, von der aus der Flux gemessen wurde. Werte sind Mittelwerte (●=sm, □=ms) von n=8; Streubalken = SEM

Regressionen: - - = sm =  $5.66 + \xi \cdot 10.86$ ; B=0.36

— = ms =  $3.29 + \xi \cdot 8.61$ ; B=0.32

## Ergebnisse

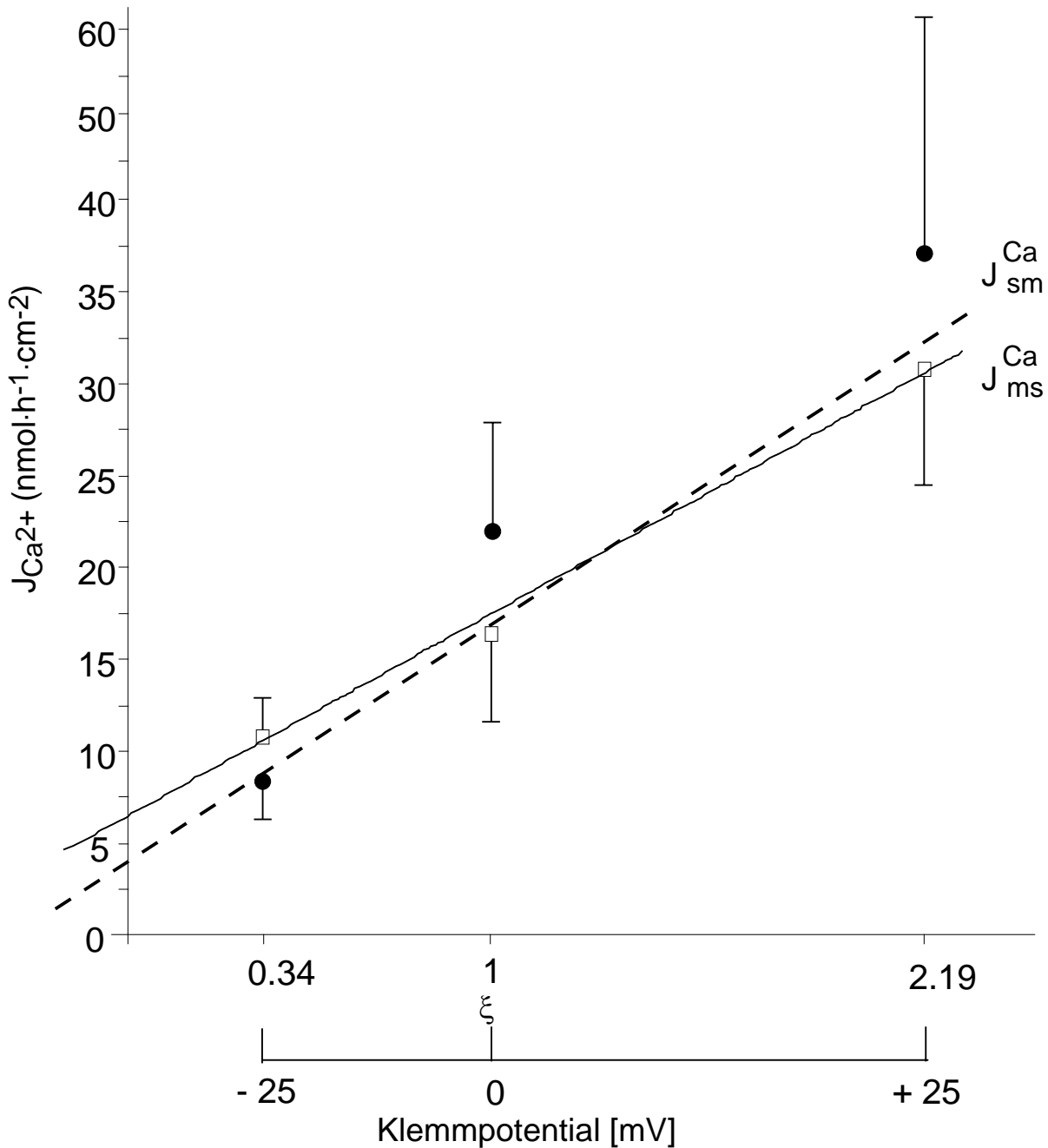


Abb. 19: Calciumtransport in Abhängigkeit der transepithelialen Potentialdifferenz (-25 ,0 ,+25 mV) mit von serosal nach mucosal gerichtetem  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsgradienten. Referenzseite für die Angabe des Klemmpotentials ist die Gewebeseite, von der aus der Flux gemessen wurde. Werte sind Mittelwerte ( $\bullet$ =sm,  $\square$ =ms) von  $n=8$ ; Streubalken = SEM

Regressionen: - - = sm =  $4.59 + \xi \cdot 15.13$ ;  $B=0.22$

— = ms =  $6.50 + \xi \cdot 10.97$ ;  $B=0.31$

### 4.3. Anionenbewegungen über das Uterusepithel

Die dominierenden transportierten Anionen an diesem Gewebe sind zum einen  $\text{Cl}^-$  und zum anderen  $\text{HCO}_3^-$ . Im Wesentlichen wurden die Untersuchungen zu beiden Anionen durch den Einsatz verschiedener Pufferlösungen vorgenommen. Vergleicht man die basalen Kurzschlussströme bei unterschiedlichen Pufferlösungen, ergeben sich signifikante Unterschiede. Die Standard-Parsonslösung enthält sowohl Bikarbonat als auch Chlorid und ergab einen basalen  $I_{\text{SC}}$  von  $1.35 \pm 0.16 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n=41$ ). In der Standard-Tyrode wurde das Bikarbonat entfernt und HEPES zur Pufferung zugesetzt. Der basale Ausgangs- $I_{\text{SC}}$  war hierbei um mehr als die Hälfte reduziert ( $0.54 \pm 0.10 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=55$ ,  $p<0.05$ ).

In einem zweiten Schritt wurde in diesen beiden Standardlösungen zusätzlich Chlorid durch das impermeable Anion Gluconat ausgetauscht. In dieser Natrium-Gluconat-Parsons-Lösung wurde ein basaler  $I_{\text{SC}}$  von  $1.40 \pm 0.32 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n=13$ ) gemessen. Die Natrium-Gluconat-Tyrode, bei der sowohl  $\text{Cl}^-$  als auch  $\text{HCO}_3^-$  Ionen fehlen, zeigte erneut einen um die Hälfte reduzierten Ausgangs- $I_{\text{SC}}$  ( $0.70 \pm 0.12 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=36$ ). In Abbildung 20 sind die Auswirkungen dieser vier Varianten der Ionensubstitutionsversuche auf den basalen Kurzschlussstrom gegenübergestellt. Es wird deutlich, dass der basale Strom signifikant höher ist, wenn Bikarbonat in der Pufferlösung enthalten ist. Entfernt man hingegen Chlorid aus dem System so hebt dies den Kurzschlussstrom zwar an, jedoch fehlt die statistische Signifikanz.

## Ergebnisse

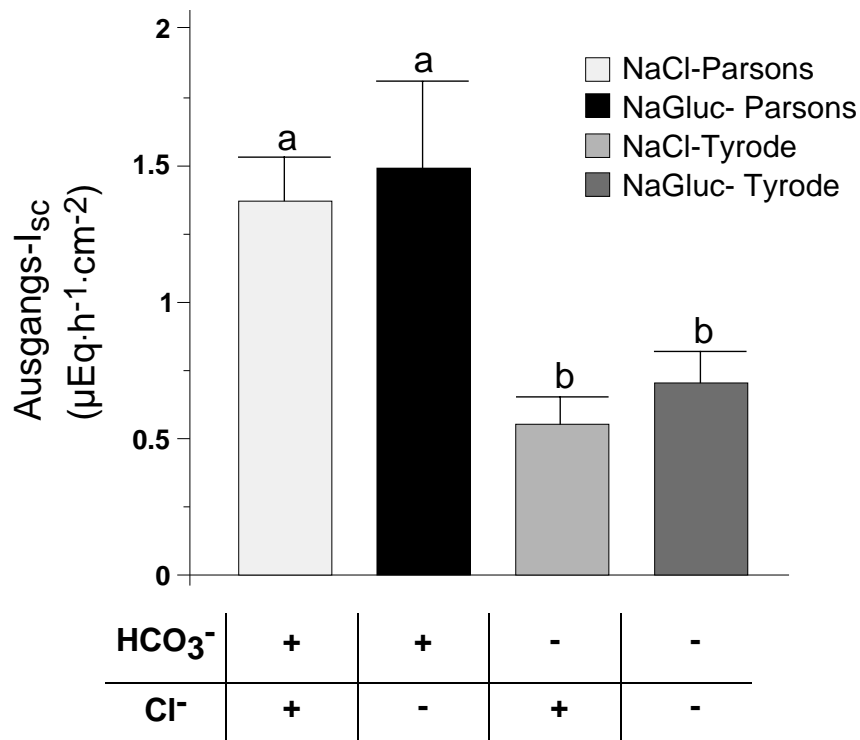


Abb. 20: Der basale  $I_{sc}$  war signifikant höher wenn Bikarbonat in der Badlösung enthalten ist. Entzieht man dem System Chlorid ändert sich der  $I_{sc}$  nicht signifikant. Gleiche Buchstaben kennzeichnen hierbei statistisch homogene Gruppen (n=13-55).

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass unter basalen Bedingungen eine Chloridresorption (führt zum Senken des basalen  $I_{sc}$ ) und eine Bikarbonatsekretion (führt zum Anheben des basalen  $I_{sc}$ ) besteht.

### 4.3.1 Chloridbewegungen über das Uterusepithel

Um den Beitrag von Chlorid zum Kurzschlussstrom von  $\text{HCO}_3^-$ -Effekten abgrenzen zu können, wurden die folgenden Versuche zur Evaluierung der Chloridbewegungen unter bikarbonatfreien Bedingungen durchgeführt.

In Standard-Tyrode-Pufferlösung wurden zunächst diverse Chloridkanalblocker so wie ein Blocker des Chlorid-Bikarbonat-Austauschers getestet

(s. Tab. 7). Auch hier wurde stets mit Amilorid vorbehandelt, um den Einfluss des elektrogenen Natriumtransportes zu vermeiden.

Es zeigte sich, dass von den getesteten Chloridkanalblockern nur DIDS ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal) in der Lage war, den  $I_{sc}$ -Anstieg, der theoretisch bei der Hemmung einer spontanen Chloridresorption zu erwarten wäre, zu induzieren (Literaturübersicht zur Wirkweise der eingesetzten Blocker, siehe zum Beispiel Greger, 1990).

Glibenclamid ( $5 \times 10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup>) ein klassischer Blocker des „Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR-Kanalblocker), führte bei mucosaler Administration zu einem signifikanten Abfall des basalen  $I_{sc}$  ( $-0.26 \pm 0.06$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=8$ ,  $p<0.05$ ).

Diphenylaminocarbonsäure (DPC) ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup>), ein nicht-selektiver Chloridkanalblocker, bewirkte bei mucosaler Gabe ebenfalls eine Absenkung des basalen  $I_{sc}$  um  $-0.18 \pm 0.07$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n=9$ ,  $p<0.05$ ).

4,4-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonsäure (DIDS) ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal), welches sowohl als Blocker von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Chloridkanälen als auch zur Hemmung von Chlorid-Bikarbonat-Austauschern eingesetzt wird, führte unter bikarbonatfreien Bedingungen zu einem Anstieg des  $I_{sc}$  ( $0.17 \pm 0.05$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=10$ ,  $p<0.05$ ).

Als weiterer Chloridkanalblocker kam NPPB ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal) zum Einsatz, was zu einer Reduktion des basale  $I_{sc}$  um  $-0.68 \pm 0.06$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n=8$ ,  $p<0.05$ ) führte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

## Ergebnisse

Blocker	$\Delta I_{SC}$ ( $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	n
Glibenclamid	$-0.26 \pm 0.06^{*\#}$	8
DPC	$-0.18 \pm 0.07^{*\#}$	9
DIDS	$0.17 \pm 0.05^{*\#}$	10
NPPB	$-0.68 \pm 0.06^{*\#}$	8

Tab 7: Glibenclamid ( $5 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), DPC, DIDS und NPPB (je  $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) zeigten bei mucosalem Einsatz in Standard-Tyrode deutliche Effekte auf den basalen  $I_{SC}$ . Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben, \* =  $p < 0.05$  zur Baseline. # =  $p < 0.05$  zur Lösungsmittelkontrolle

Da sich meine Ergebnisse teilweise im Sinne einer Chloridsekretion (basale Wirkung von NPPB, DPC, Glibenclamid), teilweise aber auch im Sinne einer Chloridresorption (DIDS, bei chloridfreier Tyrode und Parsons tendenziell höherer Ausgangs- $I_{SC}$  als bei chloridhaltigen Puffern, s. Abb. 20) interpretieren ließen, griff ich auch in diesem Fall zur Methode der Fluxmessungen um Aufschluss über die tatsächliche Netto-Transportrichtung zu erhalten.

Durch basale Flux-Messungen mit dem radioaktiven Isotop  $^{36}\text{Cl}^-$  bestätigte sich die Vorstellung einer basalen Resorption von Chlorid. Der Nettoflux lag bei  $J_{\text{net}} = 0.78 \pm 0.67 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n = 8$ ) und setzte sich aus  $J_{\text{ms}} = 7.18 \pm 0.80 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  und  $J_{\text{sm}} = 6.40 \pm 1.12 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  zusammen, erreichte aber keine statistische Signifikanz gegenüber Null.

### 4.3.2 Bikarbonatbewegungen über das Uterusepithel

Aufgrund der Zusammenfassung der basalen Ionensubstitutions- und den Chloridkanalblocker-Versuchen ließe sich ein Modell erstellen, nach dem am Uterusgewebe unter basalen Bedingungen eine Netto-Chloridresorption bei gleichzeitiger Bikarbonatsekretion stattfindet. Diese Vermutung erhärtet sich noch, nimmt man die Versuchsergebnisse nach Methazolamid-Administration ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal + serosal), einem Blocker der Carboanhydrase hinzu. Unter bikarbonat- und chloridhaltigen Bedingungen führte diese Substanz zu einem, wenn auch geringen aber dennoch signifikanten  $I_{SC}$ -Abfall ( $-0.11 \pm 0.01$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; n=6, p<0.05).

Die Bikarbonatfluxmessungen mit Hilfe der Photometrie ergaben unter chloridfreien Bedingungen nach Anlegen eines Bikarbonatgradienten (Parsons-Lösung serosal / Tyrode-Lösung mucosal) nach 30 min einen mucosale Bikarbonatkonzentration von  $4.49 \pm 1.62$  mmol·l<sup>-1</sup>(n=12). Sie ergab sich aus der Umrechnung der Extinktionsabnahme von  $0.18 \pm 0.07$  in Relation zu der Standardkontrolle von 25 mmol·l<sup>-1</sup> (Extinktionsabnahme: 1.01)

### 4.4. Regulation der Ionenbewegungen über das Uterusepithel

Als weiterer wichtiger Punkt stellt sich die Frage nach der Regulation dieser komplexen Ionenbewegungen. Wie und wann werden die verschiedenen Sekretions- und Resorptionszyklen an- und abgeschaltet? Was sind die auslösenden Reize? Hierbei muss man zwischen der Regulation auf subepithelialer und epithelialer Ebene unterscheiden.



### 4.4.1 Subepitheliale Regulationsmechanismen

Ich untersuchte unter den subepithelialen Regelmechanismen vor allem zwei Gruppen, zum einen neural regulierte Prozesse und zum anderen parakrin durch Prostaglandine gesteuerte Vorgänge.

Zur Bewertung inwieweit der basale Strom von neuronalen Stimuli abhängt, wurden sowohl die Neurotoxine Tetrodotoxin (TTX,  $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup> serosal; n=6), das durch Blockade von spannungsabhängigen Natriumkanälen eine Erregung an Nervenzellen und damit eine nervale Stimulation des Epithels verhindert, und Veratridin ( $5 \times 10^{-5}$  mol·l<sup>-1</sup> serosal; n=8), das als neuraler Stimulator wirkt, in Ussingkammern auf das Gewebe gegeben. Beide Substanzen zeigten keine Wirkung auf den basalen  $I_{SC}$  (Daten nicht aufgeführt).

Zusätzlich wurde versucht durch „Elektrische Feldstimulation“ eine neuronale Beteiligung nachzuweisen. Aber auch hier zeigte der Kurzschlussstrom keinerlei Alteration nach Applikation eines Rechteckpulses (Daten nicht gezeigt; n=4).

Zur Untersuchung zellulärer Regulationsmechanismen setzten wir zunächst als direktes Parasympathomimetikum Carbachol ( $5 \times 10^{-5}$  mol·l<sup>-1</sup> serosal) ein, um über eventuell vorhandene cholinerge Rezeptoren eine Stimulation des Epithels zu erzielen. Es ergaben sich jedoch keine Veränderungen des basalen  $I_{SC}$  (Daten nicht aufgeführt; n=7), was auch für das Sympathomimetikum Adrenalin galt (Daten nicht aufgeführt; n=6). Prostaglandine, produziert von subepithelialen Zellen oder dem Epithel selbst, scheinen ebenso wenig Einfluss auf das Gewebe zu haben, denn auch der Cyclooxygenaseblocker Indomethazin ( $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup> serosal; n=6), der in *in vivo* Studien zu einer Eierschalendickenabnahme führt [Lundholm, 1985], bewirkte keine  $I_{SC}$ -Änderungen.

#### 4.4.2 cAMP-Beteiligung

Das zyklische Adenosin-Mono-Phosphat (cAMP) ist ein wichtiger zellulärer second Messenger, der durch ein Enzym, die Adenylatcyclase gebildet wird. Der Einsatz von Forskolin ( $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  mucosal und serosal; Konzentrationsangabe gilt für alle Zugaben), das über die Aktivierung der Adenylatcyclase zu einer intrazellulären Steigerung der cAMP-Konzentration führt, bewirkte in bikarbonathaltiger Parsons-Lösung eine bivalente Stromantwort. In 3 von 8 Geweben stimulierte der Agonist den  $I_{sc}$  um  $1.79 \pm 0.74 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  ( $p < 0.05$ ), während die übrigen 5 Gewebe mit einem Stromabfall um  $-0.73 \pm 0.20 \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$  ( $p < 0.05$ ) reagierten (s. Abb. 21).

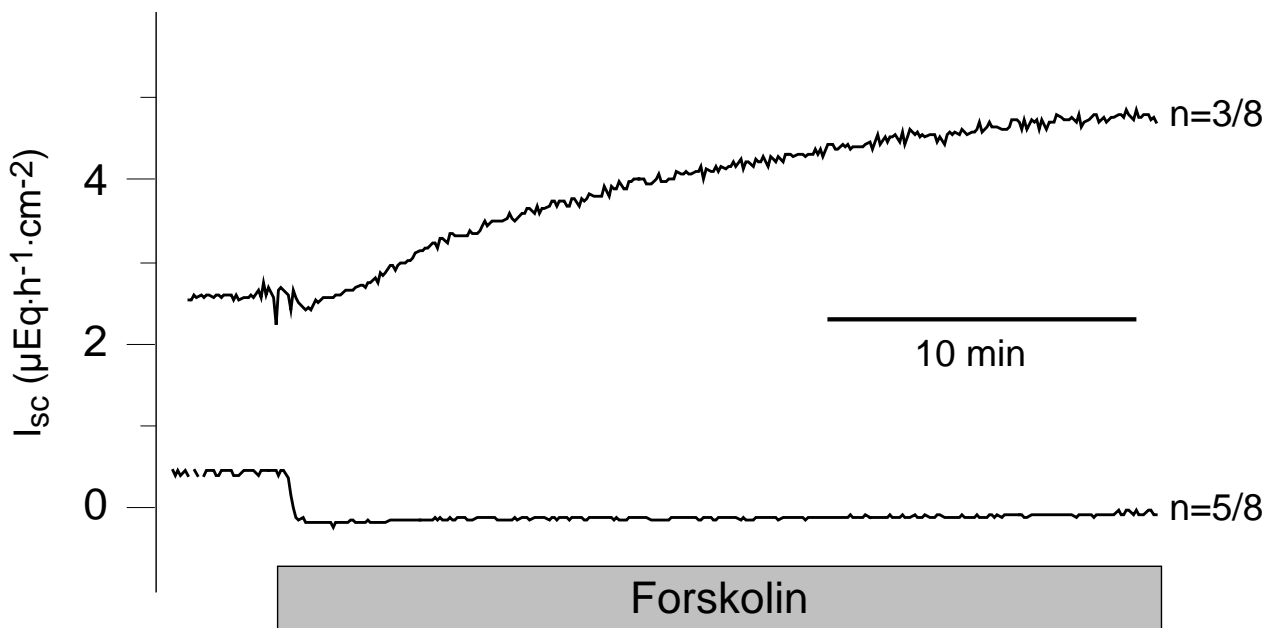


Abb. 21: Bivalente Forskolinantwort ( $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  m+s;  $n=8$ ) in bikarbonathaltiger Standard-Parsons Pufferlösung. Kurve ist Beispiel für  $n=3$  bzw. 5. Statistik siehe Text.

Da diese bivalente Forskolinantwort durch unterschiedliche Sekretions- bzw. Resorptionsvorgänge zustande kommen kann, wurde in den weiteren Versuchen die Beteiligung einzelner Ionen zum einen durch

Blockerversuch, zum anderen durch Ionensubstitutionsversuche auf diesen Forskolineffekt untersucht.

#### 4.4.2.1 cAMP-Einfluss auf den Kationentransport

Zur Untersuchung inwieweit bei der beobachteten Forskolinantwort auch Kationen eine Rolle spielen, wurde Forskolin im Zusammenhang mit verschiedenen Kationenkanalblockern untersucht. Die beobachteten  $I_{SC}$ -Änderungen scheinen nicht natriumgetragen zu sein, da Amilorid ( $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal) den basalen Strom zwar reduzierte (s. Pkt. 4.2.1), aber keinen Einfluss auf die Forskolinantwort hatte (s. Tab. 8). Gleiches gilt für die getesteten Kaliumkanalblocker, so dass auch ein möglicher Kaliumtransport nicht zur forskolininduzierten  $I_{SC}$ -Änderung beigetragen hat. Lediglich der unspezifische Kationenkanalblocker La<sup>3+</sup> ( $10^{-3}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal) hatte einen hemmenden Einfluss auf die forskolininduzierte  $I_{SC}$ -Antwort (s. Tab. 8).

Blocker	$\Delta I_{SC}$ Forskolin + Blocker		$\Delta I_{SC}$ Forskolin - Blocker	
	n	( $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ )		n
Amilorid	6	$-0.94 \pm 0.24^*$	$-1.05 \pm 0.22^*$	7
293B	6	$-0.42 \pm 0.13^*$	$-0.24 \pm 0.10^*$	6
Barium	7	$-0.20 \pm 0.07^*$	$-0.25 \pm 0.06^*$	6
TPeA	6	$-0.48 \pm 0.14^*$	$-0.44 \pm 0.14^*$	5
Quinin	6	$-0.27 \pm 0.10^*$	$-0.20 \pm 0.07^*$	10
La <sup>3+</sup>	8	$-0.20 \pm 0.06\#^*$	$-0.49 \pm 0.11^*$	8

Tab.8: Einfluss von Kationenkanalblockern auf die Forskolinantwort bei mucosaler Administration.\* = p < 0.05 zur Baseline. # = p < 0.05 zur Kontrolle. Amilorid, 293B (je  $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup>), Ba<sup>2+</sup> ( $10^{-2}$  mol·l<sup>-1</sup>), Tetrapentylamonium ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup>), Quinin und La<sup>3+</sup> (je  $10^{-3}$  mol·l<sup>-1</sup>)

#### 4.4.2.2 cAMP-Einfluss auf den Anionentransport

##### 4.4.2.2.1 Bikarbonat

Der erste Versuch wurde unter bikarbonat- und chloridhaltigen Bedingungen durchgeführt. Forskolin bewirkte in Anwesenheit von Methazolamid ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup>, mucosal und serosal) einen um die Hälfte reduzierten  $I_{sc}$ -Abfall ( $-0.35 \pm 0.05$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=6$ ,  $p<0.05$ ) gegenüber einer zeitgleichen Kontrolle ohne Carboanhydrasehemmung ( $-0.74 \pm 0.13$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=6$ ,  $p<0.05$ ). Dies zeigt, dass der Forskolin induzierte  $I_{sc}$  eng an den Bikarbonattransport gekoppelt ist. (s. Abb. 22a+b).

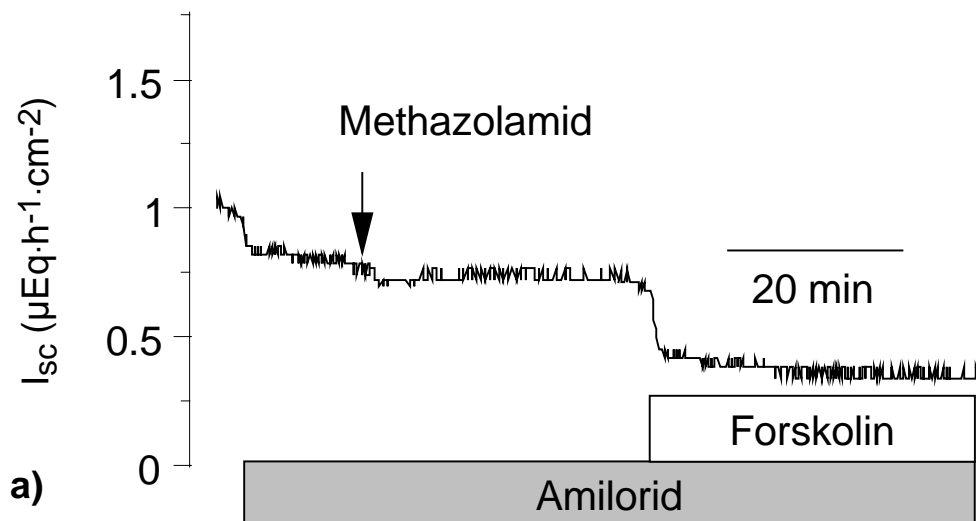


Abb. 22a: Die Forskolinantwort ( $5 \times 10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup>; m+s) ist in Gegenwart von Methazolamid ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> m+s;  $n=6$ ) signifikant kleiner gegenüber der zeitgleichen Kontrolle (s. Abb. 22b) ohne Methazolamid-Vorbehandlung. Der Versuch fand in Anwesenheit von Amilorid ( $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup>; m) statt (Beispielkurven für  $n=6$ ). Statistik siehe Text.

## Ergebnisse

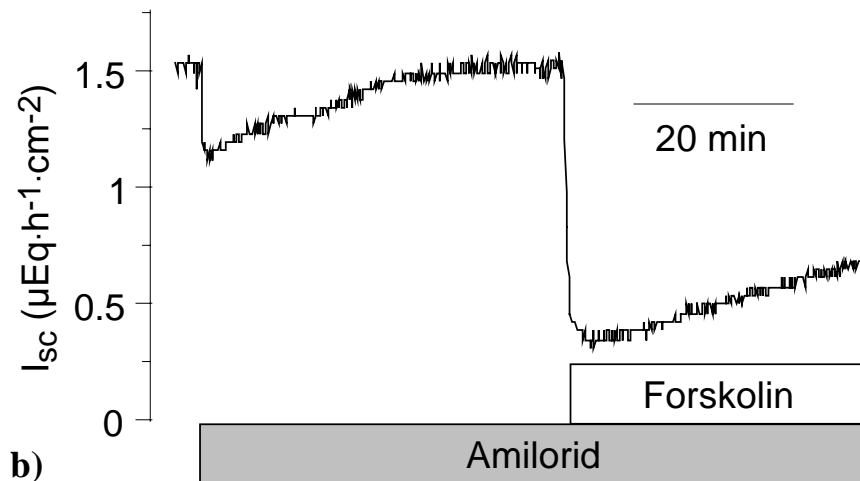


Abb. 22b: Forskolinantwort ( $5 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; m+s) ohne Methazolamid-Vorbehandlung. Der Versuch fand unter Amiloridvorbehandlung ( $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; m) statt (Beispielkurven für  $n=6$ ). Statistik siehe Text.

Zur Messung des Bikarbonattransportes vor und nach Forskolinzugabe mittels der Photometrie wurde dieser Versuch so modifiziert, dass die mucosale Seite des Gewebes von einer bikarbonat- und chloridfreien Tyrodelösung umgeben war und mit Sauerstoff begast wurde, während serosal chloridfreie Parsons eingesetzt wurde. Wie bereits erwähnt, konnte bei diesem Protokoll nach 30 min eine Bikarbonatkonzentration von  $4.49 \pm 1.62 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  gemessen werden.

Auf Forskolin-Gabe kam es unter diesen Bedingungen zwar zu einem  $I_{sc}$ -Anstieg um  $0.32 \pm 0.22 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $p < 0.05$  gegenüber Baseline,  $n=8$ ), die Fluxe ergaben jedoch nach 30minütiger Inkubation eine zur ersten Probe fast identische Extinktionsabnahme um  $0.18 \pm 0.06$ , was einer Bikarbonatkonzentration von  $4.48 \pm 1.59 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  entspricht. Dieses Ergebnis war nicht verschieden zu den zeitgleich genommenen Kontrollproben in Abwesenheit von Forskolin. Geht man davon aus, dass die im Strom verzeichneten Änderungen ( $0.32 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) vollständig durch eine gesteigerte Bikarbonatsekretion hervorgerufen werden, würde

man eine Änderung der Bikarbonat-Konzentration in der Kammer (3.5ml) um  $91 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  erwarten. Dies wiederum ergäbe mit der von mir angewandten Methode eine zu erwartende Extinktionsabnahme von etwa 0.0036. Da sich die Genauigkeit des Photometers jedoch auf die zweite Stelle hinter dem Komma beschränkt, geht die möglicherweise durch Forskolin hervorgerufene Bikarbonatsekretionssteigerung in der Schwankung der Messgenauigkeit unter. Dies bedeutet, dass sich die von mir verwendete Methode bei den zu erwartenden geringen Mengen als ungeeignet herausstellte.

#### 4.4.2.2.2 Chlorid

Zur Untersuchung der Chloridbeteiligung an der forskolininduzierten  $I_{\text{SC}}$ -Antwort wurde von Parsonslösung auf bikarbonatfreie Tyrode gewechselt, was zu einem signifikanten Stromabfall um  $-0.2 \pm 0.0 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n=8$ ,  $p<0.05$ ) führte. Die Zugabe von Forskolin induzierte unter diesen  $\text{HCO}_3^-$  freien Bedingungen stets einen Abfall des  $I_{\text{SC}}$  ( $-0.94 \pm 0.24 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=6$ ,  $p<0.05$  gegen Baseline und Kontrolle).

Mit diversen Chloridkanalblockern wurde nun versucht den unter bikarbonatfreien Bedingungen gemessenen forskolininduzierten  $I_{\text{SC}}$ -Abfall zu hemmen. Auch in diesen Versuchen fand stets eine Vorbehandlung mit Amilorid ( $10^{-6} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  mucosal) statt.

Überraschenderweise kam es zu keinem Unterschied des forskolininduzierten  $I_{\text{SC}}$ -Abfalls nach Glibenclamid-Vorbehandlung. Glibenclamid gilt als typischer Blocker für CFTR-Kanäle, die wiederum typischerweise durch cAMP reguliert werden.

## Ergebnisse

---

Die Zugabe von Diphenylaminocarbonsäure (DPC) ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal), einem unspezifischen Chloridkanalblocker, führte basal zu einer Senkung des  $I_{SC}$  um  $-0.18 \pm 0.07$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n=9$ ,  $p<0.05$  gegenüber Baseline und Kontrolle), beeinflusste den forskolininduzierten  $I_{SC}$ -Abfall aber nicht (s. Abb. 23a). Bei Zugabe in umgekehrter Reihenfolge, also bei DPC-Zugabe nach Forskolin, führte DPC jedoch zu einem signifikanten Anstieg des  $I_{SC}$  ( $0.74 \pm 0.33$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=11$ ;  $p<0.05$  gegenüber Baseline und Kontrolle), der ohne Forskolin nicht zu beobachten war (s. Abb. 23b).

Ein ähnliches Verhalten war bei einem weiteren getesteten Chloridkanalblocker, NPPB ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal), zu beobachten. Nachdem NPPB den basalen  $I_{SC}$  um  $-0.18 \pm 0.04$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n=10$ ) reduzierte, war der forskolininduzierte  $I_{SC}$ -Abfall ( $-0.23 \pm 0.05$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=10$ ) gegenüber der Kontrolle ohne NPPB-Administration ( $-0.89 \pm 0.16$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=8$ ) signifikant kleiner. Wurde NPPB nach Forskolin auf das Gewebe gegeben, stieg der  $I_{SC}$  abermals bei allen Geweben um  $0.20 \pm 0.04$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $p<0.05$ ,  $n=8$ ) an (s. Abb. 24a+b).

4,4-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure (DIDS) ( $10^{-4}$  mol·l<sup>-1</sup> mucosal), ein Blocker für calciumabhängige Chloridkanäle bzw. elektroneutrale Chlorid-Bikarbonat-Austauscher, führte unter bikarbonatfreien Bedingungen, wie bereits erwähnt, zu einem signifikanten Anstieg des  $I_{SC}$  ( $0.17 \pm 0.05$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=10$ ). In Anwesenheit von DIDS induzierte Forskolin einen  $I_{SC}$ -Abfall um  $-0.98 \pm 0.16$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n=10$ ), der gegenüber der Kontrolle ohne DIDS ( $-0.49 \pm 0.08$   $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=10$ ) signifikant höher war (s. Abb. 25).

## Ergebnisse

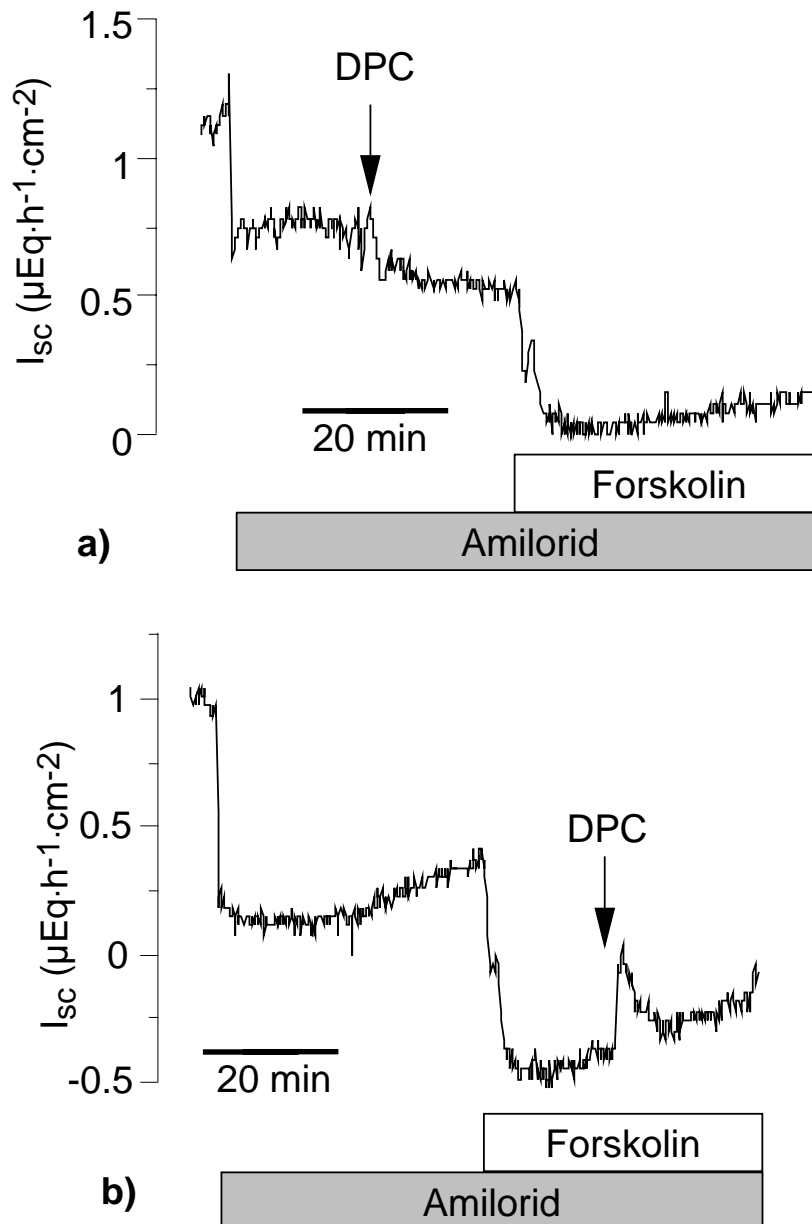


Abb. 23 a+b: DPC ( $10^{-4}$  mol·l $^{-1}$ ; m) induziert basal eine  $I_{sc}$ -Absenkung (Beispielkurve für n=9), nach Forskolin ( $5 \times 10^{-6}$  mol·l $^{-1}$ ; m+s) einen  $I_{sc}$ -Anstieg (Beispielkurve für n=11), DPC hat keinen Einfluss auf den forskolininduzierten  $I_{sc}$ -Abfall. Es fand eine Amilorid-Vorbehandlung ( $10^{-6}$  mol·l $^{-1}$ ; m) statt. Statistik siehe Text.



## Ergebnisse

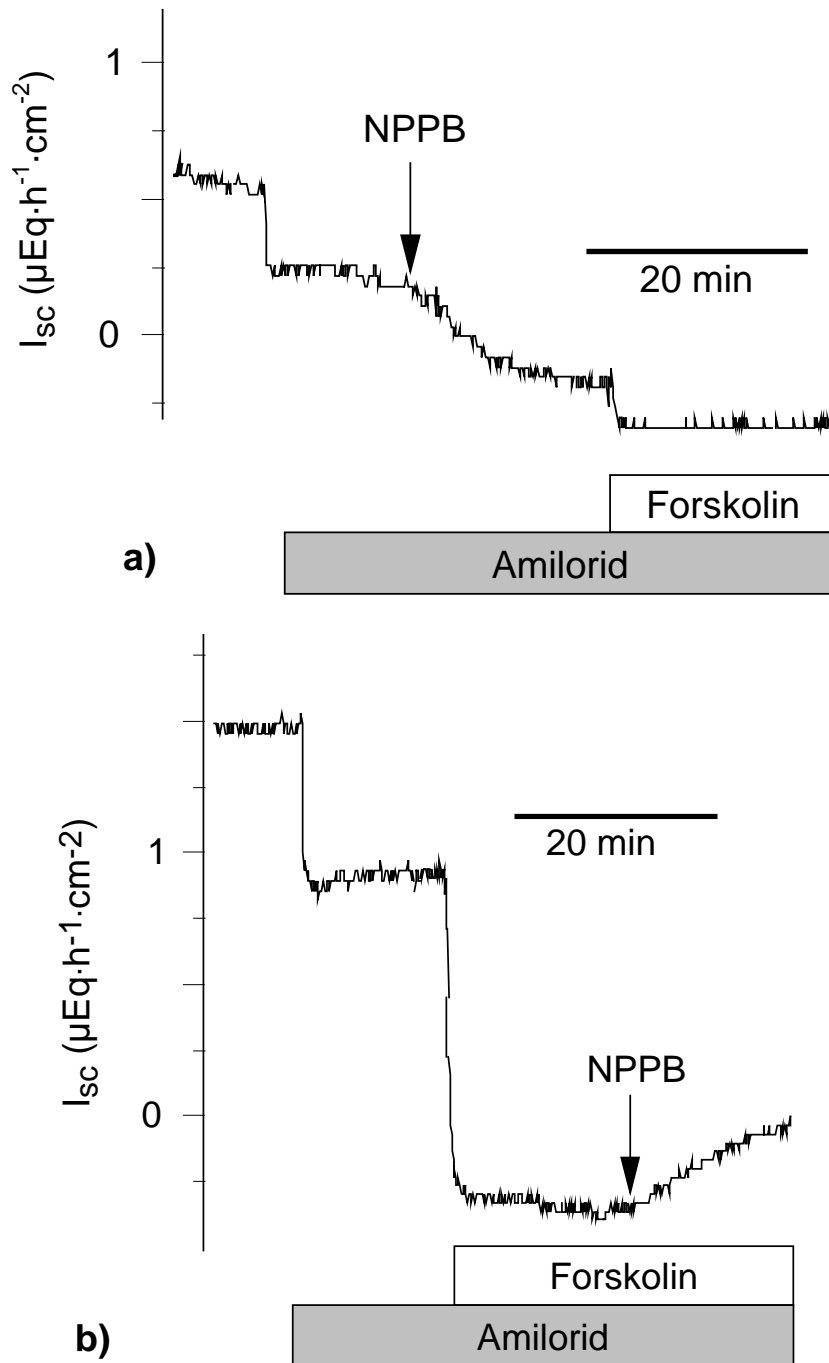


Abb. 24a+b: Der forskolininduzierte ( $5 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; m+s)  $I_{sc}$ -Abfall ist nach NPPB ( $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; m) signifikant kleiner gegenüber der Kontrolle ohne NPPB-Vorbehandlung (Beispielkurve für  $n=10$ ). Nach Forskolin bewirkt NPPB einen signifikanten  $I_{sc}$ -Anstieg. Es fand eine Amilorid-Vorbehandlung ( $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; m) statt. (Beispielkurve für  $n=8$ ). Statistik siehe Text.

## Ergebnisse

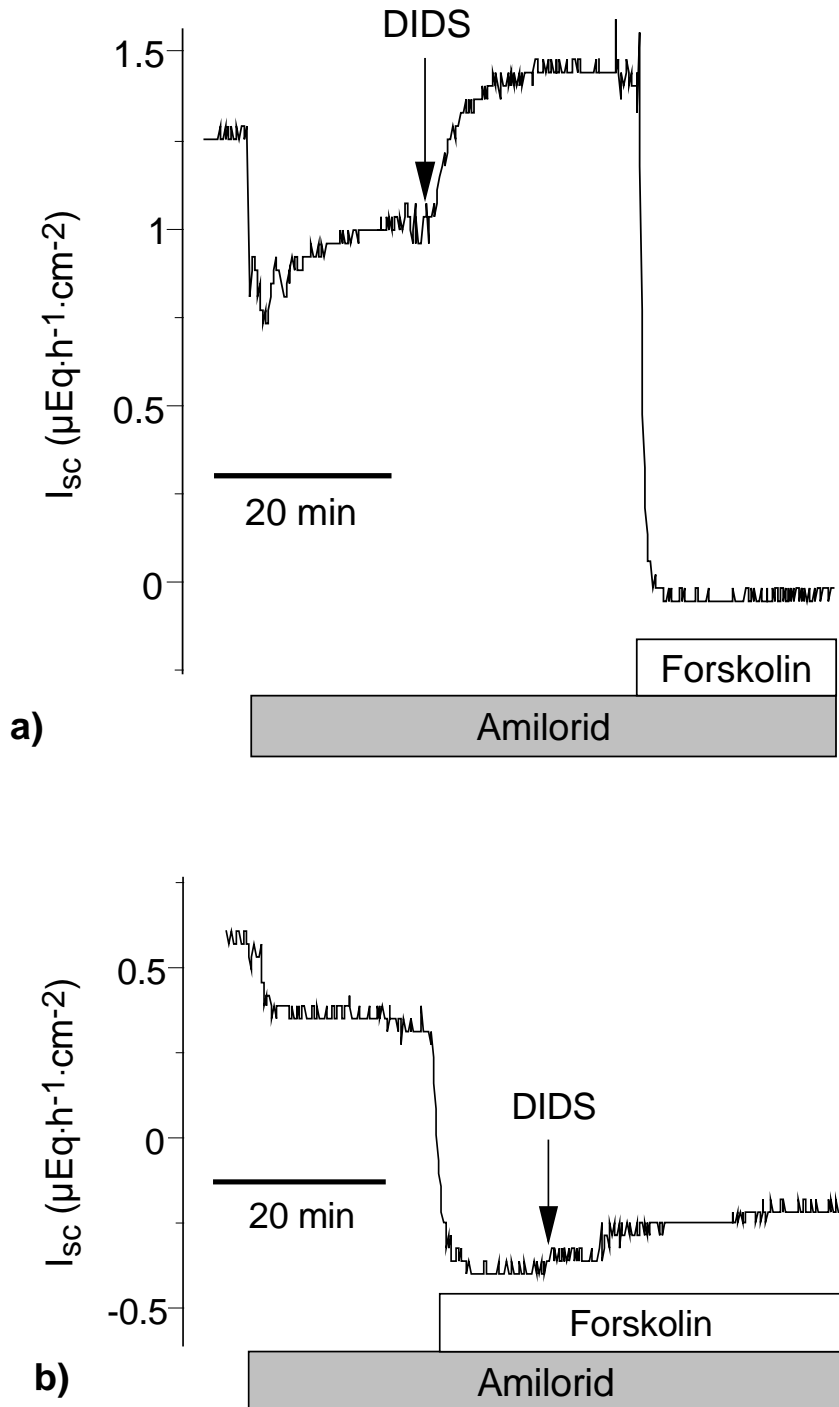


Abb. 25a+b: In Tyrode-Lösung führt DIDS ( $10^{-4}$  mol·l $^{-1}$ ; m) zu einem  $I_{sc}$ -Anstieg. Die darauffolgende Forskolin-Administration ( $5 \times 10^{-6}$  mol·l $^{-1}$ ; m+s) bewirkt einen signifikant größeren  $I_{sc}$ -Abfall gegenüber der zeitgleichen Kontrolle ohne DIDS-Vorbehandlung. (Beispielkurven für je n=10). Statistik siehe Text.

#### 4.4.2.3 Kombination von Bikarbonat- und Chloridgradienten

Es zeigte sich, dass durch das Anlegen von verschiedenen transepithelialen Chlorid- bzw. Bikarbonatgradienten die Richtung der Stromantwort auf Forskolin ebenso beeinflusst werden konnte wie dessen Höhe.

Der unter Tyrode-Bedingungen (bikarbonatfrei) durch Forskolin hervorgerufene  $I_{SC}$ -Abfall ( $-1.00 \pm 0.35 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=7$ ) kann in einen  $I_{SC}$ -Anstieg umgekehrt werden ( $4.36 \pm 0.84 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=8$ ), wenn durch mucosales Einwaschen einer chloridarmen Natrium-Gluconat-Tyrode, ein von serosal nach mucosal gerichteter Chloridgradient über dem Gewebe aufgebaut wird (s. Abb. 26).

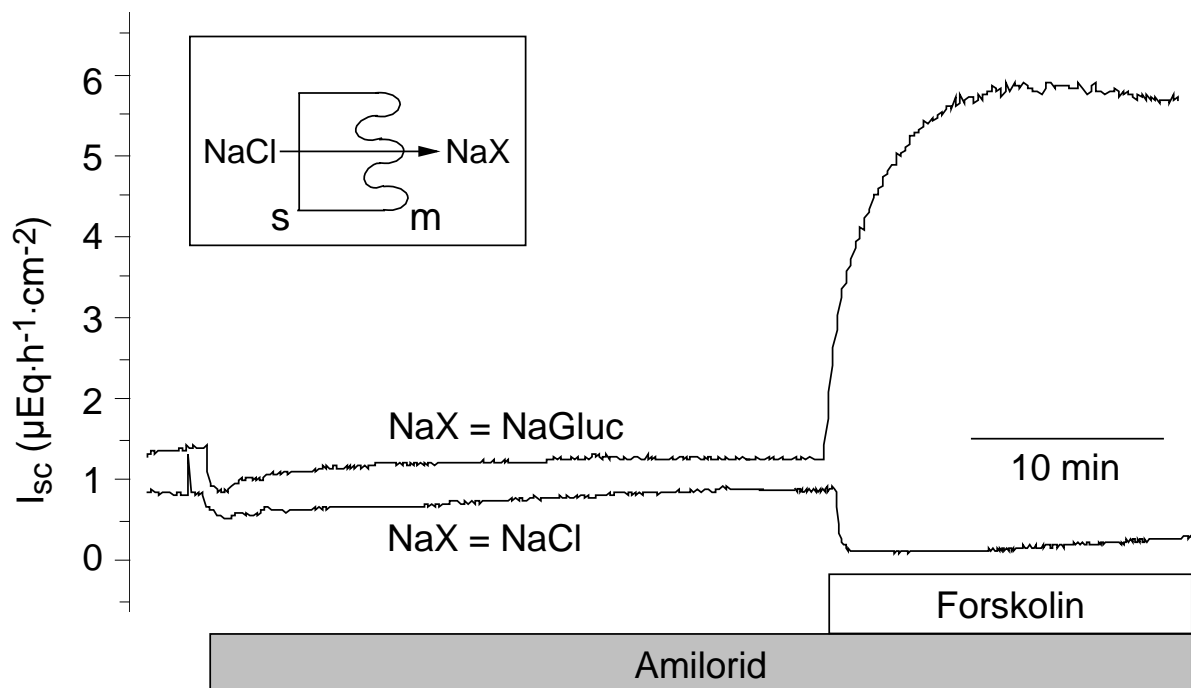


Abb. 26: Durch das Anlegen eines Chloridgradienten von serosal nach mucosal kann in Gegenwart von Amilorid ( $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; m), der durch Forskolin ( $5 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; m+s) ausgelöste  $I_{SC}$ -Abfall (Beispielkurven für  $n=10$ ) in Tyrodelösung in einen Anstieg umgewandelt werden (Beispielkurven für  $n=8$ ). Statistik s. Text.

## Ergebnisse

Gleiches gelang durch das Errichten eines Bikarbonatgradienten von serosal nach mucosal unter chloridfreien Bedingungen. Auf Forskolinzugabe wurde der basale  $I_{sc}$  ( $2.31 \pm 0.65 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=8$ ) signifikant um  $0.31 \pm 0.22 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  erhöht ( $p<0.05$  gegen Baseline,  $n=8$ ; s. Abb. 27).

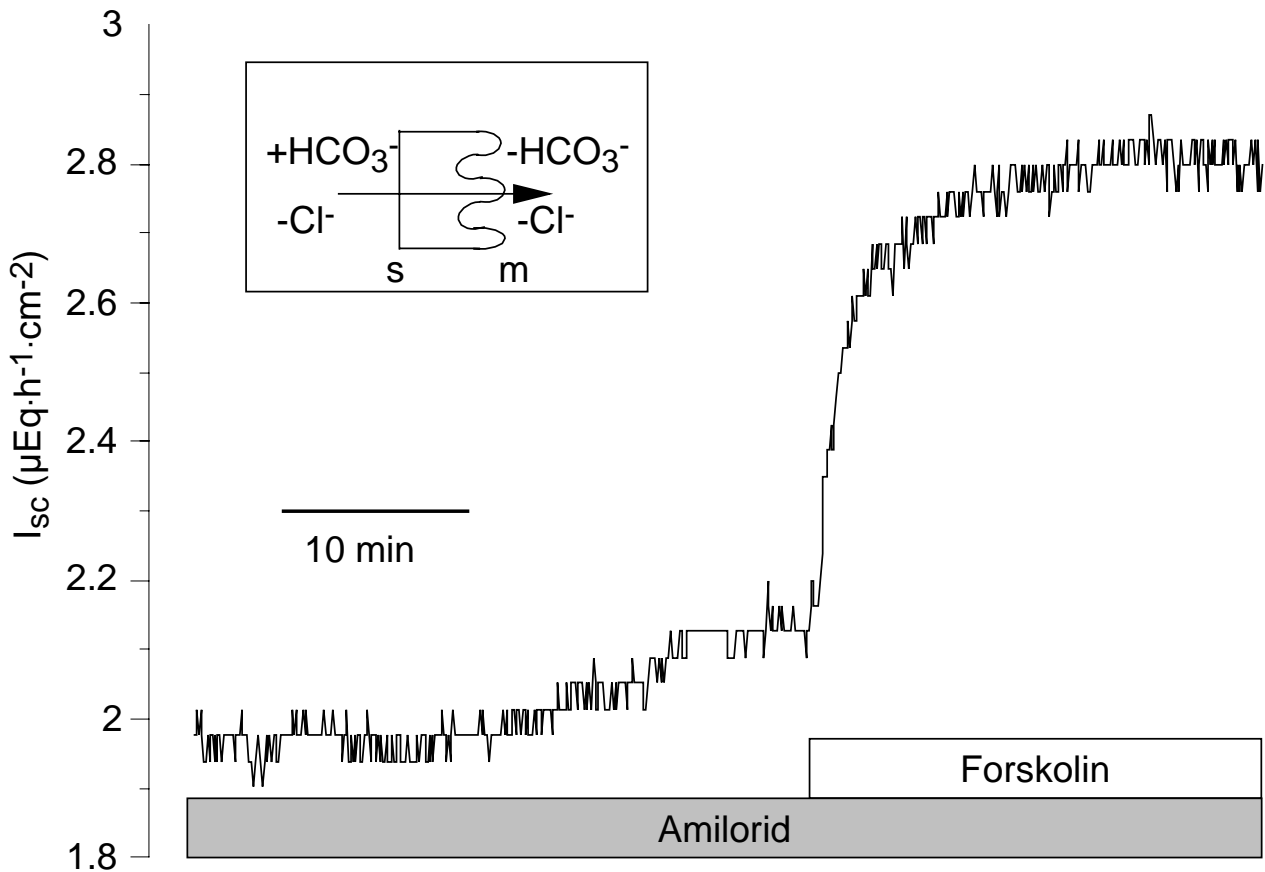


Abb. 27: Unter chloridfreien Bedingungen kann durch das Anlegen eines Bikarbonatgradienten von serosal nach mucosal in Gegenwart von Amilorid ( $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; m) durch Forskolin ( $5 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; m+s) ein  $I_{sc}$ -Anstieg (Beispielkurven für  $n=8$ ) ausgelöst werden. Statistik s. Text.

Hingegen führte Forskolingabe bei Vorhandensein eines nach mucosal gerichteten Bikarbonatgradienten alleine (Chlorid auf beiden Seiten des Gewebes) nach wie vor zu einem signifikantem  $I_{sc}$ -Abfall ( $-0.67 \pm 0.46 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $p<0.05$  gegen Baseline,  $n=8$ ; s. Abb. 28).

## Ergebnisse

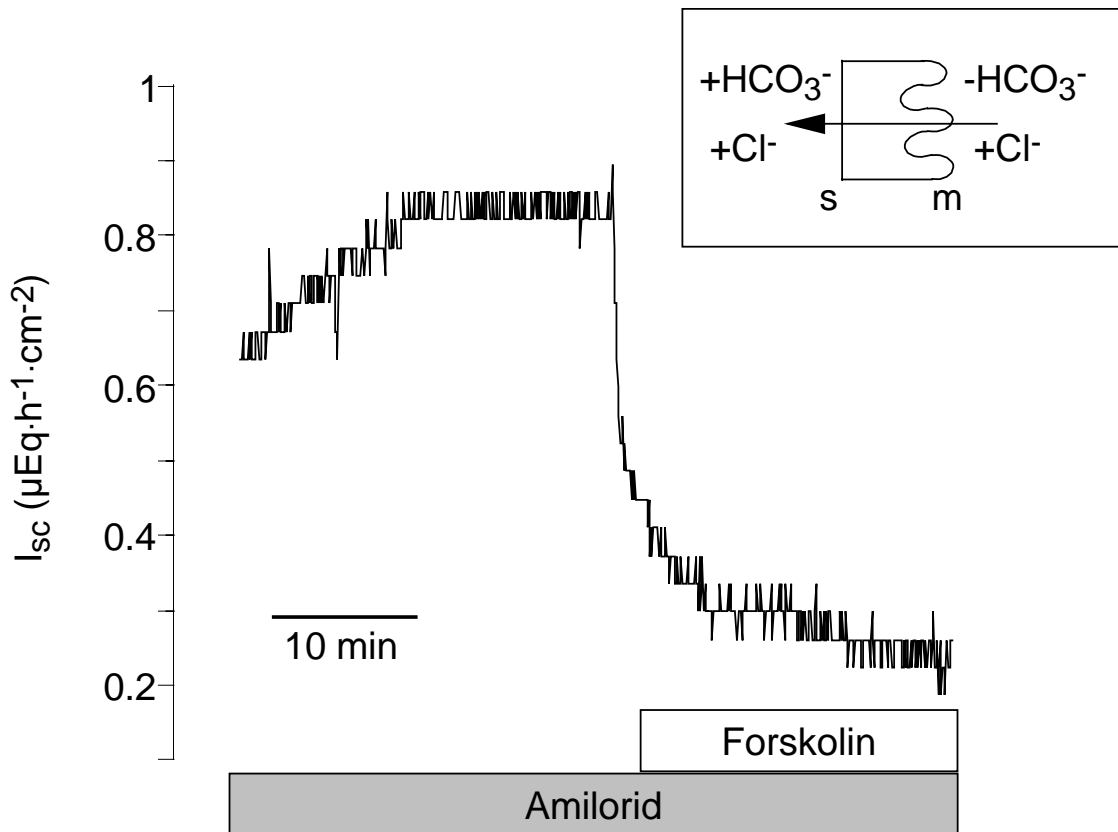


Abb. 28: Unter chloridhaltigen Bedingungen kann durch das Anlegen eines Bikarbonatgradienten von serosal nach mucosal in Gegenwart von Amilorid ( $10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup>; m) durch Forskolin ( $5 \times 10^{-6}$  mol·l<sup>-1</sup>; m+s) kein  $I_{sc}$ -Anstieg mehr, sondern ein  $I_{sc}$ -Abfall (Beispielkurven für n=8) ausgelöst werden. Statistik s. Text.

Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass Forskolin neben einer Chloridresorption gleichzeitig eine Bikarbonatsekretion induziert. Die Einflussnahme durch Forskolin auf die Chloridbewegungen scheinen allerdings die forskolininduzierten Bikarbonatsekretion zu überdecken.

## 5. Diskussion

### 5.1. Rahmenbedingungen für die Versuchsdurchführung

Zur Minimierung der für die Versuche benötigten Tiere testete ich zu Beginn meiner Studie, ob es möglich wäre das Uterusgewebe nach der Präparation über längere Zeit aufzubewahren, um so mehrere Versuchsdurchläufe aus ein und dem selben Tier hintereinander durchführen zu können. Bei dieser Vitalitätskontrolle zeigte sich, dass das Gewebe über mehr als zwei Stunden in Aufbewahrungspuffer badend unbeschadet überdauerte und keine signifikanten Veränderungen im Bezug auf Leitfähigkeit ( $G_t$ ) und Kurzschlussstrom ( $I_{SC}$ ) während des darauffolgenden Versuchsdurchlaufes auftraten. So konnten bei entsprechend großen Uteri mehrere Versuche aus einem Tier nacheinander durchgeführt werden (s. Tab. 4).

Anhand der Untersuchungen über die  $G_t$  und  $I_{SC}$ , die in Kapitel 4.1 beschrieben sind, konnte gezeigt werden, dass sich die Transporteigenschaften der Uterusgewebe von zyklusinaktiven und -aktiven Tieren deutlich unterscheiden. Sowohl der  $I_{SC}$ , als auch die  $G_t$  des Uterusepithels zyklusinaktiver Tiere waren signifikant höher gegenüber denen zyklusaktiver Tiere (s. Tab. 3). Dies steht im direkten Widerspruch zu der 1973 veröffentlichten Arbeit von Cohen und Hurwitz, die einen signifikant höheren Kurzschlussstrom und eine höhere Potentialdifferenz bei zyklusaktiven Tieren messen konnten, wohingegen der trans-epitheliale Widerstand bei diesen Tieren unverändert war [Cohen & Hurwitz, 1973]. Dieser Widerspruch ist derzeit nicht zu erklären, da ich aus meinen Ergebnissen keine Schlussfolgerung ziehen konnte, worauf der Unterschied in der Höhe des basalen  $I_{SC}$  und der basalen  $G_t$  von zyklusaktiven und inaktiven Tieren beruht. Ebenso wenig lieferten Cohen

und Hurwitz eine Erklärung für die Differenzen in ihrer Studie. Möglicherweise beruhen die Unterschiede auf der Gewebepreparationstechnik, denn Cohen und Hurwitz setzten gestripptes Gewebe ein, so dass dieser Umstand mit Sicherheit einen Beitrag zu den genannten Unterschieden in den Ergebnissen leistet. Allerdings führte das Strippen in meinen Versuchen zu einer enormen Steigerung der Leitfähigkeit (s. Tab. 2) weshalb ich von dieser Methode Abstand nahm.

Die weiteren Untersuchungen stützen sich auf die bis dato veröffentlichten Studien zu Unterschieden in den Ionenbewegungen über das Uterusepithel in Abhängigkeit von der Eibildung [Nys, 1999; Simkiss, 1960]. Man würde erwarten, dass sich Unterschiede im  $I_{sc}$ -Verhalten zeigen müssten, je nach dem, ob der Uterus sich zum Zeitpunkt der Messung in der Schalenproduktion, und damit in der Phase der Calciumsekretion befand, oder nicht. Jedoch ergaben sich überraschenderweise unter diesen Umständen keine Unterschiede bezüglich des  $I_{sc}$  und der  $G_t$  (s. Tab. 3).

Die Gründe für solche Abweichungen in den Ergebnissen zwischen *in vivo* und *in vitro* Versuchen liegen unter Umständen an der Vielzahl der möglichen Variablen der Rahmenbedingungen unter denen die Versuche durchgeführt wurden. Abgesehen von Unterschieden

- im Alter [Vetter & O`Grady, 2005; Warren & Scott, 1935b]
- dem Tagesrhythmus (Lichtregime) [Parsons & Combs, 1981]
- der Haltung (Mangelernährung) [Balnave et al., 1992] und
- dem Hormonstatus [Navickis et al., 1979], kann auch
- mechanische Manipulation (Prostaglandine) [Lundholm & Bartonek, 1992a] zu derartig unterschiedlichen Ergebnissen beitragen.

Zudem könnte es sein, dass unter *in vitro* Bedingungen übergeordnete Regulationsmechanismen wegfallen, die für die Sekretion der Ionen verantwortlich sind. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Calciumfluxmessungen (s. u.). Hierbei ergab sich die Erkenntnis, dass die Calciumsekretion in Ussingkammern auch bei Tieren, die sich in der Phase der Schalenproduktion befanden, derart gering ist, dass Unterschiede im  $I_{sc}$  von zyklusinaktiven Tieren oder Tieren außerhalb der Calciumsekretionsphase aufgrund dieser Ladungsverschiebung nicht zu erwarten sind.

Das Herstellen von Epithel-Subepithel-Präparaten, durch mechanisches Entfernen von Serosa und Teilen der Tunica muscularis führte zu einem deutlichen Anstieg der  $G_t$  und des basalen  $I_{sc}$ . Es ergaben sich jedoch keine Unterschiede in der  $I_{sc}$ -Antwort auf die von mir getesteten Substanzen (zum Beispiel Forskolin, s. Tab. 2), so dass in den weiteren Versuchen ungestripptes Gewebe eingesetzt wurde, um eine mechanische Irritation zum Beispiel in Form einer gesteigerten parazellulären Durchlässigkeit, zu vermeiden. Der Anstieg der  $G_t$  und des basalen  $I_{sc}$  an gestripptem Epithel gegenüber ungestripptem Epithel bestätigt die durch Ehrenspeck et al. erhobenen Daten, die ebenfalls nach Entfernen der Serosa und Teilen der Muskularis eine zehnfach gesteigerte Durchlässigkeit für Calcium gemessen hatten [Ehrenspeck et al., 1971]. Dies deutet daraufhin, dass es durch die mechanische Beanspruchung des Gewebes möglicherweise zu einer Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit oder auch zum Öffnen mechanosensitiver Kanäle kommt.



## 5.2. Regulationsmechanismen am Uterusepithel

Es herrscht bislang in der Literatur kein Konsens darüber, ob am Uterusepithel des Haushuhnes eine Regulation des Ionentransportes durch nervale Stimuli oder Prostaglandinausschüttung erfolgt oder nicht. Vetter und O`Grady scheinen beispielsweise von einer solchen Beteiligung auszugehen, da sie ihre Versuche stets unter der Vorbehandlung mit dem Cyclooxygenasehemmer Indomethazin und dem Neurotoxin TTX durchführten [Vetter & O`Grady, 2005]. Eine Beteiligung von Nerven an der Regulation des Ionentransportes an diesem Epithel scheint jedoch sehr unwahrscheinlich. Schon Eastin und Spaziani zeigten, dass nach Denervation keine Änderung der Schalenbildung unter *in vivo* Bedingungen stattfand [Eastin & Spaziani, 1978a]. Meine Ergebnisse bestätigen diese *in vivo* Daten, denn durch das Fehlen einer Reaktion auf Tetrodotoxin, ein Blocker- sowie Veratridin, ein Aktivatorspannungsabhängiger Natriumkanäle (s. Kap. 4.4.1) in Ussingkammerversuchen und fehlender Änderungen des  $I_{sc}$  durch Versuche mit elektrischer Feldstimulation, scheint die Beteiligung des Nervensystems an Ionentransportvorgängen am Uterusepithel des Huhnes als modulierender Faktor nicht zu bestehen (s. Kap. 4.4.1).

Auch Prostaglandine scheinen nicht an der Regulation der Ionentransportvorgänge beteiligt zu sein. Zwar konnte Lundholm ebenfalls durch *in vivo* Versuche zeigen, dass der Cyclooxygenasehemmer Indomethazin die Schalendicke negativ beeinflusst [Lundholm, 1985c], allerdings führte der Einsatz dieser Substanz in meinen Versuchen ebenfalls zu keiner Beeinflussung des Kurzschlussstroms oder der Leitfähigkeit (s. Kap. 4.4.1). Dieser Widerspruch zur Literatur könnte darauf beruhen, dass am isolierten Uterus zum Beispiel übergeordnete Regulationsmechanismen fehlen, an denen

Prostaglandine beteiligt sind. Ein Hinweis auf diesen Sachverhalt besteht in der Tatsache, dass die Calciumsekretion *in vitro* deutlich geringer ausfällt, als sie *in vivo* zur Bildung der Schale sein muss.

### 5.3. Kationenbewegungen über das Uterusepithel

#### 5.3.1 Natriumbewegungen über das Uterusepithel

Eastin und Spaziani zeigten an Hand ihrer Studien, dass Natrium *in vivo* resorbiert wird [Eastin & Spaziani, 1978b], was auch *in vitro* bestätigt wurde [Vetter & O`Grady, 2005]. Es blieb jedoch die Frage offen, ob nur der epitheliale Natriumkanal (ENaC) als Mechanismus für solch eine Resorption in Frage kommt.

Da sich Amilorid in niedrigen Konzentrationen, wie in vielen Studien gezeigt [Garty & Benos, 1988; Kleyman & Cragoe, 1988], sehr gut als selektiver Blocker für den (ENaC) eignet, und darüber hinaus aufgrund der einzusetzenden wirksamen Konzentration eine Aussage über die Selektivität und Sensitivität der Bindung getroffen werden kann [Garty & Benos, 1988], ergaben sich durch den Gebrauch dieser Substanz viele aufschlussreiche Resultate über die Verhältnisse unter *in vitro* Bedingungen. Danach gilt Amilorid als hoch selektiver Blocker für den ENaC bei einer halbmaximalen Hemmkonzentration von  $<1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ab einer Konzentration von ca.  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  wird auch der  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher geblockt und Konzentrationen über ca.  $1 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  hemmen zusätzlich den  $\text{Na}^+\text{-Ca}^+$ -Austauscher [Kleyman & Cragoe, 1988].

Bei einer Konzentration von  $1.5 \times 10^{-6} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ( $n=15$ ) war die halbmaximale Hemmung des basalen  $I_{\text{SC}}$  durch Amilorid erreicht. Daher ist davon auszugehen, dass bei der von mir eingesetzten Dosierung

(1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) vorrangig der ENaC am Uterusepithel des Huhnes blockiert wurde. Die maximale Hemmwirkung ( $I_{\text{max}}$ ) wurde bei ca.  $10^{-4}$   $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  erreicht. Da es nach den oben genannten Studien in diesem Bereich jedoch zusätzlich zu einem Block von Natrium-Protonen-Austauschern kommen kann, verzichtete ich auf den Einsatz höherer Konzentrationen als  $10^{-6}$   $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Anhand der Ergebnisse aus Kapitel 4.2.1 konnte gezeigt werden, dass der elektrogene Natriumtransport hauptsächlicher Träger des basalen  $I_{\text{SC}}$  ist, denn Amilorid blockt den positiven  $I_{\text{SC}}$  bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  bereits zu über 72 % (basaler  $I_{\text{SC}} = 0.84 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ;  $\Delta I_{\text{SC}} - 0.61 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Dieser Teil des positiven  $I_{\text{SC}}$  ist somit eindeutig natriumgetragen und die apikale Aufnahme von  $\text{Na}^+$  in die Zelle findet über einen amiloridsensitiven epithelialen Natriumkanal statt. Die Transport-Messungen von  $^{22}\text{Na}^+$  bestätigten den resorptiven Charakter dieses Gewebes, der unabhängig vom Status der Eibildung einen etwa doppelt so hohen  $J_{\text{MS}}$  gegenüber dem  $J_{\text{SM}}$  ergab. Bestätigt wird dieses Ergebnis darüber hinaus dadurch, dass die Höhe des  $I_{\text{SC}}$ -Abfalls auf Amilorid eindeutig mit der Höhe des positiven Ausgangs- $I_{\text{SC}}$  korreliert (s. Abb. 14), d.h. je höher die Natriumresorptionsrate um so höher der amiloridinduzierte  $I_{\text{SC}}$ -Abfall bzw. der positive Ausgangs- $I_{\text{SC}}$ .

Die Varianz in der Höhe des Ausgangs- $I_{\text{SC}}$  (s. Abb. 14) ließ vermuten, dass das Organ zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Eibildung unterschiedliche Sekretions- bzw. Resorptionsmechanismen aktiviert.

*In vivo* Ergebnisse zeigen dies, indem während der Schalenbildungsphase Natrium und Chlorid resorbiert, Kalium, Bikarbonat und Calcium sezerniert werden. Hierbei soll es jedoch in den ersten 8 Stunden der

Schalenbildung zu eine Natriumsekretion und erst im späteren Verlauf zu einer Resorption kommen [Sauveur & Mongin, 1971]. Ich konnte jedoch bei keinem Tier einen höhere  $J_{sm}$  denn  $J_{ms}$  messen, was man bei einer Nettosekretion erwarten würde.

Die Wirkung von Amilorid zeigte darüber hinaus ebenfalls keine signifikanten Unterschiede unabhängig davon, ob sich zum Zeitpunkt der Organentnahme ein Ei im Uterus befand oder nicht (s. Kap. 4.1). Eine Korrelation zwischen der Höhe des Ausgangs- $I_{sc}$ , der Amiloridwirkung und dem Stadium der Eibildung hätte einen Rückschluss auf die Höhe der Natriumresorption bei den verschiedenen Schritten der Eibildung zugelassen, war aber anhand meiner Daten nicht möglich.

Ferner stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu den von Vetter und O`Grady publizierten Daten. Sie fanden diesen signifikanten Unterschied in der Höhe des basalen  $I_{sc}$  an Geweben, die zum Zeitpunkt der Schalenbildung oder nach Abschluss der Schalenbildung in den Versuch genommen wurden. Auch maßen sie einen signifikant höheren  $I_{sc}$ -Abfall auf Amilorid bei Uterusgeweben in der Schalenproduktion als nach dessen Abschluss [Vetter & O`Grady, 2005]. Auch zur Erklärung dieser Unterschiede muss erneut auf die verschiedenen Ausgangsbedingungen verwiesen werden. Zum einen verwendeten Vetter und O`Grady eine Pufferlösung, deren Osmolarität deutlich über der unseren lag (70 mosmol·l<sup>-1</sup> Differenz zu unserer Lösung), zum anderen führten sie ihre Versuche an gestripptem Epithel durch. Da das Entfernen von Muskularis und Serosa, wie von mir gezeigt zu einer drastischen Steigerung der Durchlässigkeit des Gewebes führt ( $G_t$  stieg von  $16.2 \pm 2.9$  auf  $34.9 \pm 3.0$  mS·cm<sup>-2</sup>), kann nicht ausgeschlossen werden, dass es dadurch auch zu einer Aktivierung mechanosensitiver Kanäle kommt.

Das Uterusepithel ist somit primär natriumresorbierend, jedoch erfolgt mengenmäßig der größte Teil über elektroneutrale Prozesse, denn stellt man den durchschnittlichen  $I_{SC}$ -Abfall auf Amilorid ( $-0.61 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  = elektrogen) in Relation zu der Nettoresorption von Natrium ( $3.74 \pm 1.18 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) wird deutlich, dass nur zirka 15 % des Natriums über den ENaC resorbiert werden können. Dies würde auch die Tatsache erklären, dass der in der Ussingkammer ermittelte, deutliche Beweis für das Existieren eines amiloridsensitiven ENaC nicht durch einen Rückgang der Fluxmessungen bestätigt werden konnte. Denn:

1. die große Streuung der Daten führt dazu, dass kleinere Änderungen statistisch nicht signifikant werden,
2. im Gegensatz zu den Ussingkammer Versuchen können durch die Fluxmessungen auch elektroneutrale Natriumbewegungen erfasst werden, die unter Umständen so groß sein können, dass die elektrogenen Natriumbewegungen in den Fluxmessungen von den elektroneutralen überdeckt werden und
3. Natrium kann auch über andere elektrogene Wege außer den ENaC (z.B. nichtselektiver Kationenkanal) resorbiert werden.

Die weitere Untersuchung galt daher dem nach Blockade des ENaC verbleibendem positiven Ausgangs- $I_{SC}$ , der entweder auf einer Anionensekretion oder auf weiterer Kationenresorption beruhen kann.

Die Kombination von Amilorid mit Lanthan führte dazu, dass es nach Amilorid-Einsatz zu einer weiteren Hemmung des  $I_{SC}$  durch  $\text{La}^{3+}$  um  $-0.16 \pm 0.06 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  kam. Zwar blockt  $\text{La}^{3+}$  nicht sehr selektiv, denn neben dem nicht-selektiven Kationenkanal wird auch der  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher bzw. die Calcium-ATPase geblockt. Beim Block einer

Calcium-ATPase käme es jedoch statt des beobachteten  $I_{SC}$ -Abfalls zu einem  $I_{SC}$ -Anstieg und die Höhe des gemessenen Calcium-Fluxes ( $16.49 \pm 4.57 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) spricht eindeutig gegen den Block eines Natrium-Calciumaustauschers, sodass möglicherweise an der elektrogenen Resorption von Natrium ein nicht-selektiver Kationenkanal beteiligt ist.

Dennoch wird als ein weiterer elektrogener Transportweg für Natrium am Uterusepithel des Haushuhnes über einen Natrium-Calcium-Austauscher spekuliert [Eastin & Spaziani, 1978a], der an anderen Epithelien, zum Beispiel dem Kolon der Ratte, auf der mucosalen Epithelseite beschrieben ist [Schultheiss et al., 2003].

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zu den Transportwegen für Calcium ergab sich ein Hinweis auf diesen möglicherweise beim Haushuhn existierenden Resorptionsweg für Natrium. Der Einsatz von DCB, einem Blocker dieses Natrium-Calcium-Austauschers führte zu einer deutlichen Hemmung des basalen  $I_{SC}$ . (weitere Details s. Kap. 5.3.3).

Alternative Transportsysteme zur apikalen Natriumaufnahme sind an diversen Epithelien beschrieben. Elektroneutral kann Natrium über einen Natrium-Protonen-Austauscher wie zum Beispiel am Gastro-Intestinal-Trakt [Binder & Sandle, 1994; Rajendran et al., 1995] oder auch ein Natrium-Kalium-2-Chlorid-Cotransporter, wie er in der Niere vorkommt, aufgenommen werden [Fromm, 2005]. Diese Transportsysteme wurden nicht weiter untersucht, allerdings könnten sich die Ergebnisse die durch den Einsatz des Amiloridderivates DCB ergaben auch im Sinne der Hemmung eines Natrium-Protonen-Austauschers interpretieren lassen (weitere Details s. Kap. 5.3.3).

Zusammenfassend lässt sich basierend auf diesen Ergebnissen ein mögliches Zellmodell erstellen, nach dem Natrium über den ENaC, nichtselektive Kationenkanäle und möglicherweise über einen Natrium-Calcium-Austauscher sowie evtl. weitere elektroneutrale Transportmechanismen apikal aufgenommen wird und schließlich über die von Lavelin et al. nachgewiesene, Natrium-Kalium-ATPase die Zelle basolateral verlässt [Lavelin et al., 2001]:

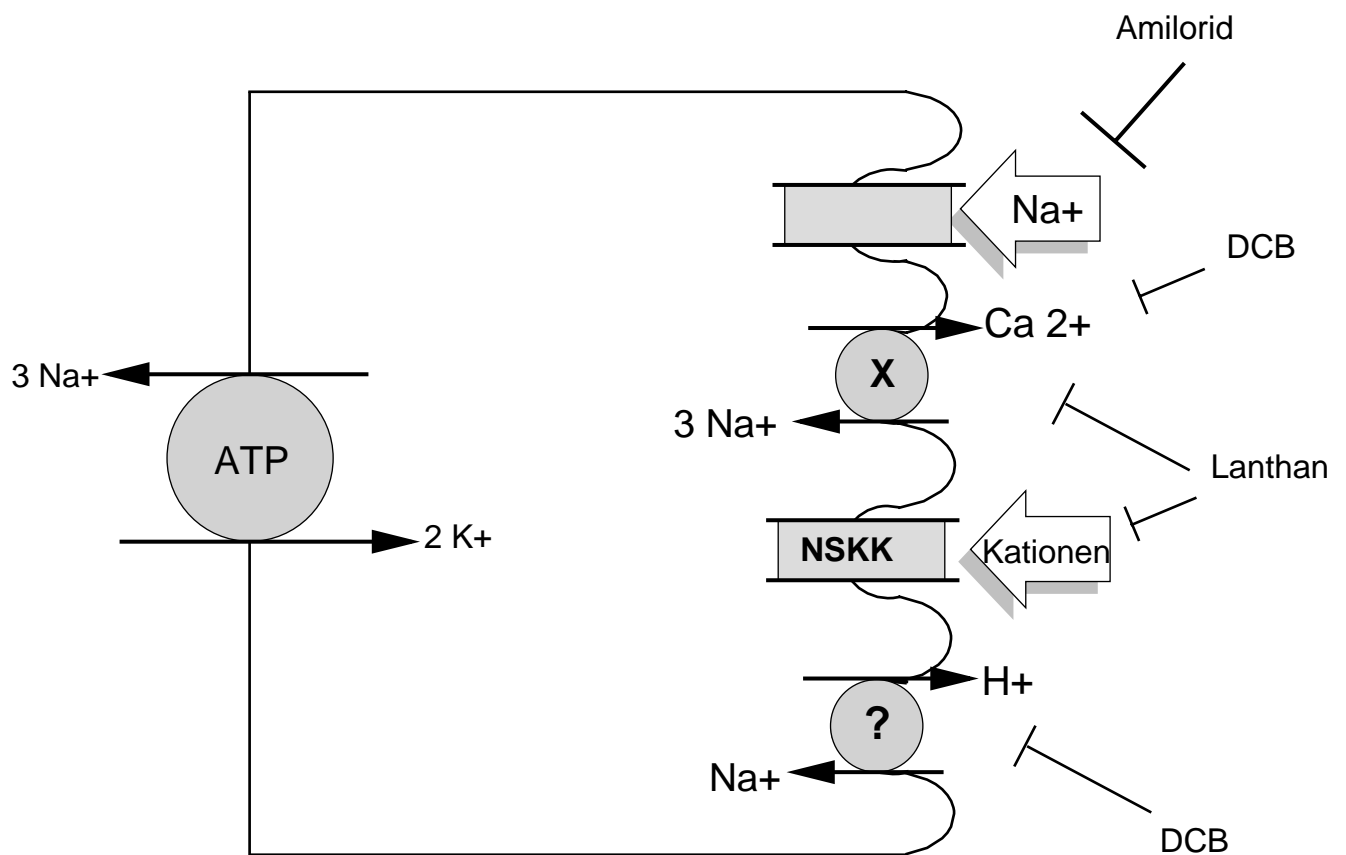


Abb. 29: Mögliches Zellmodell für den Natriumtransport: DCB = Dichlorobenzamil; ? = möglicherweise vorhandener Transportweg, x = unwahrscheinlicher Transportweg. NSKK = Nicht selektiver Kationenkanal

### 5.3.2 Kaliumbewegungen über das Uterusepithel

In einer Grundlagenstudie von Eastin und Spaziani wurden die basalen Transportrichtungen für die verschiedenen Ionen am Uterus des Haushuhnes während der Schalenbildung anhand von *in vivo* Studien veröffentlicht. Hiernach wird Kalium gemeinsam mit Calcium und Bikarbonat sezerniert [Eastin & Spaziani, 1978b]. Sie beurteilten in dieser Arbeit weiterhin die Schalendrüse des Haushuhnes als ein hochpermeables Gewebe, dass seine parazelluläre Durchlässigkeit während der Schalenbildung noch steigert [Eastin & Spaziani, 1978b]. Die Kaliumsekretion ist laut ihrer Untersuchungen völlig unabhängig von der Zusammensetzung der uterinen Flüssigkeit und lässt sich durch keinerlei Ionensubstitutionsversuche modifizieren. Gefördert wird hierbei der Kationentransport in das Uteruslumen durch die transmurale Potentialdifferenz von etwa 10-16 mV [Eastin & Spaziani, 1978b]. Bestätigt werden diese Daten durch weitere *in vivo* Befunde, wobei es in der Phase der Schalenbildung zu einem Anstieg der Kaliumkonzentration in der uterinen Flüssigkeit von etwa 4 mmol·l<sup>-1</sup> auf etwa 60 mmol·l<sup>-1</sup> innerhalb von 18 Stunden kommt, was somit einer Transportleistung von 3.33 mmol·l<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> entspricht [Sauveur & Mongin, 1971].

Aufgrund meiner Flux-Versuche zum Kaliumtransport ( $J_{\text{net}}=0.12 \pm 0.099$  μmol·h<sup>-1</sup>·cm<sup>-2</sup>) konnte ich im Gegensatz dazu keine Ergebnisse finden, die auf eine Sekretion von Kalium hinweisen (s. Kap. 4.2.2, Tab. 5).

Der signifikante  $I_{\text{sc}}$ -Abfall auf die Kaliumkanalblocker Tetrapentylamonium ( $-0.42 \pm 0.20$  μEq·cm<sup>-2</sup>·h<sup>-1</sup>) und Quinin ( $-0,58 \pm 0.07$  μEq·cm<sup>-2</sup>·h<sup>-1</sup>) muss auf sekundären Effekten beruhen. Ein Abfall des  $I_{\text{sc}}$  auf einen dieser Blocker bedeutet zunächst eine Hemmung von Kationenresorption bzw. Anionensekretion. Aufgrund der Konzentrations-



verhältnisse von intrazellulärem gegenüber extrazellulärem Kalium ist es jedoch unmöglich, das Kalium über einen Kanal in die Zelle gelangt. Daher könnte man die Reaktion im  $I_{SC}$  so erklären, dass es nach dem Block einer Kaliumsekretion durch Quinin oder Tetrapenthylamonium, durch die Verschiebung des Membranpotentials, zum Erliegen einer Chloridsekretion kommt, die sich in besagtem Abfall des  $I_{SC}$  äußern würde. Darüber hinaus sind die Rubidiumfluxe zu gering, als dass sich die  $I_{SC}$ -Änderungen durch Kaliumbewegungen interpretieren ließen.

Aufgrund dieser geringen Fluxrate scheint auch der parazelluläre Flux für Kalium eher unwahrscheinlich und steht damit im Gegensatz zu der von Eastin und Spaziani postulierten hohen parazellulären Durchlässigkeit [Eastin & Spaziani, 1978b].

Zur Erklärung dieser Abweichungen zu den in der Literatur beschriebenen *in vivo* Ergebnissen ist zu bedenken, dass unter den Versuchsbedingungen in der Ussingkammer die physiologische Potentialdifferenz zwischen Blut- und Lumenseite fehlt, welche bei *in vivo* Bedingungen den Kaliumtransport in das Uteruslumen fördert. Dass die PD einen großen Einfluss auf die Transportrate hat, konnte ich selbst anhand der Calciumfluxe zeigen (s. Abb. 16). Andererseits ist zu bedenken, dass in den *in vivo* Studien von Eastin und Spaziani von 1978 lediglich der Kaliumgehalt der uterinen Flüssigkeit zu den unterschiedlichen Stadien der Eibildung untersucht wurde. Eine Möglichkeit für die Steigerung der Kaliumkonzentration wäre daher eine Kaliumsekretion in weiter cranial gelegenen Abschnitten des Legedarms, und somit ein Zufluss innerhalb des Organs ohne tatsächliche Beteiligung des Uterusepithels selbst [Eastin & Spaziani, 1978b]. Möglicherweise fehlt aber auch ein physiologischer Stimulus zur

Steigerung einer Kaliumsekretion (s. auch Diskussion zum Calciumtransport).

Es lässt sich demnach aufgrund meiner Ergebnisse derzeit kein schlüssiges Zellmodell für den Kaliumtransport erstellen.

### **5.3.3 Calciumbewegungen über das Uterusepithel**

Viele Studien über die Transporteigenschaften am Uterusepithel des Huhnes richten sich auf die Entschlüsselung der Transportwege für Calcium. Sie wurden in der Regel mit *in vivo* Experimenten durchgeführt und stützen ihre Erkenntnisse auf die Veränderungen der Schalendicke oder Elektrolytverschiebungen in der uterinen Flüssigkeit unter bestimmten Versuchsbedingungen. Es sind hierbei viele widersprüchliche Arbeiten veröffentlicht worden, so dass man von einer Aufklärung der Verhältnisse nach wie vor weit entfernt ist.

Balnave et al. [1992] widerlegten in einer Studie die bis dahin veröffentlichten Arbeiten über die Korrelation der Calcium-ATPase-Aktivität und der Eierschalendicke [Castaldo & Maurice, 1990; Pike & Alvarado, 1975; Coty & Mc Conkey, 1982; Watanabe et al., 1989]. Ihre Ergebnisse widersprachen ebenfalls den Studien von Nys und Laage, in denen ein Zusammenhang zwischen der Konzentration an Calcium-bindendem-Protein im Blut und der Schalendicke veröffentlicht wurde [Nys & Laage, 1984]. Während das Vorhandensein der Calcium-ATPase und des Calcium-bindenden-Proteins, sowie deren Beteiligung an der Calciumbereitstellung zur Schalenproduktion trotz dieser Kontroversen als gesichert gelten kann [Wassermann et al., 1991; Coty & Mc Conkey, 1982], gibt es für das Vorhandensein des Natrium-Calcium-Austauschers lediglich Indizien. Einige Autoren postulierten zwar dessen Existenz [Nys

et al., 1999; Eastin & Spaziani, 1978a], de facto gibt es jedoch nach wie vor keinen Beweis und darüber hinaus kann der postulierte Transportmechanismus (Natrium-Calcium-Austauscher in apikaler sowie basolateraler Membran) so nicht arbeiten. Die Natrium-Kalium-Pumpe würde zwar den Calciumtransport in der apikalen Membran energetisieren, dadurch wird jedoch der Transport über die basolaterale Membran mit Hilfe des selben Austauschers unmöglich.

Meine Untersuchungen zu den Calciumtransportmechanismen über das Uterusepithel richteten sich daher vor allem auf Untersuchungen zu diesem möglichen Natrium-Calcium-Austauscher.

Der Einsatz von  $\text{La}^{3+}$  lieferte in den Natriumversuchen einen ersten Hinweis auf das Vorhandensein eines solchen Natrium-Calcium-Austauschers, da Lanthan sowohl als Blocker von unspezifischen Kationenkanälen aber auch als Blocker des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers und der Calcium-ATPase in Frage kommt [Lagnado et al., 1990].

Hierbei ist der Block einer Calcium-ATPase jedoch unwahrscheinlich, da es im Falle einer gehemmten Calcium-ATPase durch  $\text{La}^{3+}$  zu einem  $I_{\text{SC}}$ -Anstieg hätte kommen müssen, in meinen Versuchen jedoch ein  $I_{\text{SC}}$ -Abfall ( $-0.16 \pm 0.06 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $n=8$ ) resultierte. Als spezifischer Blocker für den  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers wird das Amiloridderivat Dichlorobenzamil (DCB) beim Säuger eingesetzt [Kleyman & Cragoe, 1988]. Auch dieser Blocker führte in meinen Versuchen zu einem signifikanten  $I_{\text{SC}}$ -Abfall, sodass eine Existenz des Austauschers zunächst wahrscheinlich war. Gegen die Existenz dieses Transporters sprechen jedoch weit mehr Ergebnisse als für sein Vorhandensein:

1. Der Calciumtransport ließ sich durch den Einsatz von DCB in den Fluxstudien nicht hemmen,

2. Es gelang nicht die Netto-Calciumfluxrichtung durch Anlegen eines von serosal nach mucosal gerichteten Natriumgradienten umzudrehen oder die Sekretion auch nur zu reduzieren (siehe Tab. 6). Nach Blaustein hätte durch das Anlegen eines solchen Natriumgradienten die Transportrichtung des  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers umgedreht werden und somit die Calciumsekretion abnehmen müssen [Blaustein & Lederer, 1999].
3. DCB bewirkte unter diesen Bedingungen weiterhin eine signifikante Hemmung des  $I_{\text{SC}}$ , der unter der Annahme eines revers arbeitenden  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers eigentlich hätte ansteigen müssen.
4. Der gemessene  $J_{\text{SM}}$  ( $0.017 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) entspricht nur etwa 1,5 % der gemessenen Kurzschlussstromänderung ( $-0.31 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) nach DCB-Zugabe.

Die  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  Transportmessungen über das Uterusepithel bestätigen zwar die in der Literatur beschriebene Calciumsekretion [Ehrenspeck et al., 1971; Pearson & Goldner 1973; Pearson & Goldner 1974], jedoch maß ich eine basale Nettosekretion von  $0.78 \pm 0.67 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  (je  $n=10$ ), die nur einen Bruchteil dessen darstellt, was das Gewebe *in vivo* zur Eibildung leisten muss, und darüber hinaus noch weit unter den Messungen liegt, die von anderen Arbeitsgruppen veröffentlicht wurden (Ehrenspeck:  $25 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; Pearson & Goldner:  $82 \text{ nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) [Ehrenspeck et al., 1971; Pearson & Goldner, 1973]. Auch hier kann über das Zustandekommen dieser Divergenzen nur spekuliert werden. Zwar ist erwiesen, dass das Alter der Tiere einen gewissen Einfluss auf die Calciumsekretionsleistung des Epithels hat [Warren & Scott, 1935b; Vetter & O'Grady, 2005], dennoch sind die Schwankungen weit geringer

als die gemessenen Unterschiede unter *in vitro* Bedingungen. Die Tatsache, dass Pearson und Goldner ihre Versuche am Uterus der Wachtel durchführten, hat mit Sicherheit den größten Einfluss auf die Ergebnisse, da bekannt ist, dass die Transportleistungen von Spezies zu Spezies beträchtlich variieren [Lundholm, 1985 a+b].

Die geringe Transportleistung des Epithels könnte auch auf dem Fehlen eines nach mucosal gerichteten Calciumgradienten beruhen, wie es unter *in vivo* Bedingungen durch das Ausfällen des Calciums in Form von  $\text{CaCO}_3$  der Fall ist. Aus diesem Grund wurde auf der mucosalen Seite eine EGTA-Tyrode eingesetzt, durch die tatsächlich eine faktische Verdoppelung der Fluxrate erzielt werden konnte. Ein weiterer Unterschied zu *in vivo* Bedingungen ist das Fehlen einer transepithelialen PD. Dies wurde von mir durch das Anlegen eines Klemmpotentials von 25 mV (serosale Seite positiv geladen) imitiert und führte sogar zu einer Steigerung der Nettosekretion um etwa das 6fache (s. Kap 4.2.3 und Tab. 6). Die Steigerung der Calciumtransportrate durch diese beiden speziellen Protokolle steht im Einklang mit der Literatur. Pearson und Goldner zeigten ebenfalls, dass durch das Entfernen von Bikarbonat aus der Pufferlösung ein über 50 %iger Rückgang des Netto-Calciumtransportes erreicht werden kann. Der stete Entzug des Calciums auf der luminalen Seite und damit das Aufrechterhalten eines Konzentrationsgradienten hat demnach einen entscheidenden Einfluss auf den Calciumtransport. Dennoch muss daraufhin gewiesen werden, dass alle Steigerungen der Calciumtransportrate durch die verschiedenen angeführten Möglichkeiten noch immer nur einen Bruchteil dessen darstellen, was das Gewebe *in vivo* transportiert.

Die einfachste Erklärung dieser Tatsache könnten fehlende stimulierende Signale sein, die allerdings weder nervaler Natur noch

Prostaglandine sein können. Basierend auf den Fluxmessungen zeigt sich zudem, dass die Calciumbewegungen über das Uterusepithel in Ussingkammerversuchen kaum einen Beitrag zum gemessenen  $I_{sc}$  leisten.

Der Schluss aus meinen Versuchsergebnissen muss daher sein, dass die Existenz eines  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauschers am Uterusepithel des Huhnes nach wie vor unklar ist, denn weder die Versuchsergebnisse mit DCB noch das Anlegen eines chemischen Gradienten liefern einen Beweis für seine Existenz. Der DCB induzierte  $I_{sc}$ -Abfall muss folglich auf der Hemmung anderer Strukturen beruhen. In Frage kommen hierfür:

1. der ENaC, der jedoch in allen DCB-Versuchen bereits durch Amilorid geblockt war, wobei eine Resthemmung möglich ist, da ich aus Gründen der Spezifität der Blocker nicht die maximale Hemmkonzentration eingesetzt habe.
2. ein  $Na^+$ - $H^+$ -Austauscher, der zwar als elektroneutraler Transporter nicht unmittelbar den  $I_{sc}$  verändert, aber über eine Absenkung des intrazellulären pH-Wertes sekundäre Effekte auslösen kann. Diese Reaktion der Zelle ist zum Beispiel am Kolon der Ratte gezeigt, wo auf Ansäuerung der Zelle Kaliumkanäle geöffnet werden [Diener et al., 1993].

Die Beobachtung, dass die Calciumsekretion stärker durch die Potentialdifferenz beeinflusst werden kann als die Resorption, steht im Einklang mit der im Tier bestehenden Potentialdifferenz zwischen Blut (positiv geladen) und Uteruslumen und ist physiologisch sinnvoll. Interessanterweise stellte sich heraus, dass der potentialunabhängige Transport für Calcium in beide Transportrichtungen fast identisch ist. Die  $J_{ms}$  Richtung erscheint hierbei zunächst paradox, da das Gewebe ja vor

allem Calcium sezernieren muss. Wofür besitzt das Gewebe dann einen Transporter, der unter Energieverbrauch Calcium vom Lumen auf die Blutseite transportiert? Eine mögliche Erklärung für diesen Schritt stellt ein Transportsystem dar, dass evtl. dafür vorgesehen ist, nach Abschluss der Schalenbildung das überschüssige Calcium zu reabsorbieren, um in gewisser Weise einem übermäßigen Verlust vorzubeugen. Zu dieser Art der Fluxmessungen bestehen bislang aus der Literatur keinerlei Vergleichsdaten, so dass auch hierbei weitere Versuche notwendig sind, um den Transportmechanismus, der für diese Reabsorption verantwortlich ist, genauer zu charakterisieren.

Ein mögliches Zellmodell beschränkt sich auf die Klärung der Verhältnisse an der apikalen Membran, denn zur serosalen Aufnahme des Calciums in die Zelle kann ich aufgrund meiner Untersuchungen keine Aussage treffen. Auch aus der Literatur gibt es hierzu bislang keine Angaben:

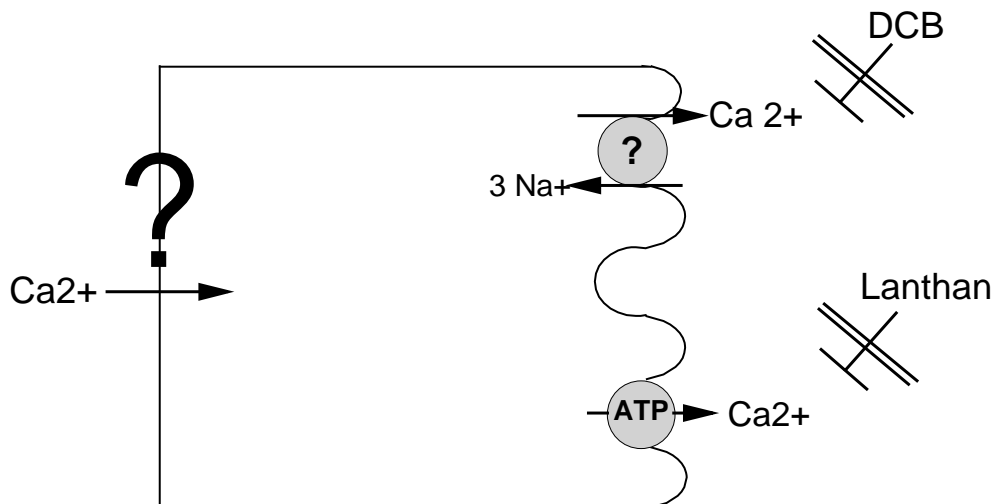


Abb. 30: Mögliches Zellmodell für den Calciumtransport: der basolaterale Transport ist noch völlig unklar // = die getesteten Blocker greifen nicht an diesen Strukturen an; ? = möglicherweise vorhandener Transportweg.

#### 5.4. Anionenbewegungen über das Uterusepithel

Ein erster Hinweis zu den Chlorid- und  $\text{HCO}_3^-$ -Bewegungen über das Uterusepithel ergab sich durch den Vergleich der basalen Ströme von bikarbonathaltiger und -freier Badlösung. Hierbei zeigte sich ein signifikant höherer  $I_{sc}$  bei bikarbonathaltiger Parsonslösung. Dies lässt sich durch das Wegfallen einer Bikarbonatsekretion in Tyrode-Pufferlösung erklären (s. Abb. 20). Der Entzug von Chlorid sowohl aus der Parsons- als auch aus der Tyrode-Pufferlösung führte jeweils zu leicht erhöhten basalen Kurzschlussströmen. Auch ohne Erreichen einer statistischen Signifikanz war dies ein Hinweis auf eine mögliche basale Chloridresorption bei gleichzeitiger Bikarbonatsekretion.

##### 5.4.1 Bikarbonatbewegungen über das Uterusepithel

Bikarbonat stellt neben Calcium die wichtigste Komponente zur Bildung der Eierschale dar. Aufgrund der biologischen Funktion des Uterus besteht über die Transportrichtung für Bikarbonat kein Zweifel in der Literatur. Lundholm konnte zeigen, dass nur 20 % des sezernierten Bikarbonates aus dem Blut stammen [Lundholm, 1987]. In anderen *in vivo* Studien wurde gezeigt, dass durch die Hemmung der Carboanhydrase eine vollständigen Eliminierung der Bikarbonat- und darüber der Calciumsekretion erreicht werden kann [Eastin & Spaziani, 1978b]. Die Blockade der Carboanhydrase durch Methazolamid führte in meinen Versuchen, trotz des zu erwartenden großen Einflusses, lediglich zu einer geringen Reduktion des basalen  $I_{sc}$ . Eine Erklärung hierfür kann sein, dass Bikarbonat vorwiegend über elektroneutrale Transportwege wie z.B. einen Chlorid-Bikarbonat-Austauscher aus der Zelle gelangt, wodurch ein Wegfallen dieser Transportvorgänge durch Blockade der



Bikarbonatbildung in Ussingkammerversuchen nicht sichtbar werden würde. Ein Hinweis auf einen solchen Transportweg lieferten die Versuchsergebnisse mit DIDS, bei dessen Einsatz ein  $I_{SC}$ -Anstieg folgte, im Gegensatz zu den getesteten Chloridkanalblockern welche immer einen  $I_{SC}$ -Abfall bewirkten. Dieser  $I_{SC}$ -Anstieg ließe sich damit erklären, dass DIDS neben Chloridkanälen auch Chlorid-Bikarbonat-Austauscher blockieren kann. Trotzdem der Chlorid-Bikarbonat-Austauscher eigentlich elektroneutral arbeitet, kann man den  $I_{SC}$ -Anstieg über zwei mögliche Modelle erklären:

1. Das Bikarbonat, das nach der Blockade des Chlorid-Bikarbonat-Austauscher in der Zelle bleibt, könnte evtl. über einen Anionenkanal nach mucosal abgegeben werden, was in einem  $I_{SC}$ -Anstieg resultieren würde. Diese Theorie wird durch die Versuchsergebnissen mit NPPB erhärtet. Nach Einsatz dieses Anionenkanalblockers kommt es zu einem signifikanten  $I_{SC}$ -Abfall und DIDS kann nach NPPB-Substitution keinen  $I_{SC}$ -Anstieg mehr auslösen (Daten nicht aufgeführt). Dies würde sich daraus erklären, dass neben dem elektroneutralen Weg nun auch der elektrogene Transportweg für Bikarbonat blockiert ist.
2. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Blockieren des Chlorid-Bikarbonat-Austauschers über eine Alkalisierung der Zelle, analog zu dem Modell für den Block des Natrium-Protonen-Austauschers (s. Pkt. 5.3.3), zu sekundären Effekten führt, wie es an der Froschhaut bereits gezeigt wurde[Urbach et al., 1996].

Dass tatsächlich eine elektrogene  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion stattfindet, wird durch die Ergebnisse mit Forskolin deutlich. Der Einsatz von Forskolin, das über die Stimulation der Adenylatcyclase zu einer Erhöhung des intrazellulären second Messengers cAMP führt, zeigte unter chlorid- und bikarbonathaltigen Bedingungen, dass einige Gewebe (3/8) mit einem Anstieg des Kurzschlussstroms reagierten, während die übrigen (5/8) Gewebe einen  $I_{\text{SC}}$ -Abfall zeigten (s. Abb. 21). Es wurde deutlich, dass diese  $I_{\text{SC}}$ -Änderungen zum einen einer Chloridresorption entsprachen (s. u.), zum anderen aber auch Ausdruck einer Bikarbonatsekretion sind.

Durch das Entfernen von Chlorid aus der Pufferlösung und Anlegen eines Bikarbonatgradienten folgte auf Forskolin stets ein  $I_{\text{SC}}$ -Anstieg. Es gelang nicht, diesen  $I_{\text{SC}}$ -Anstieg durch die Ergebnisse aus der Bikarbonatfluxmessung mittels der Photometrie zu untermauern, da sich herausstellte, dass die Sensitivität der Messtechnik nicht ausreicht, um die geringen Änderungen im Bikarbonattransport zu ermitteln. Aus der Summe meiner Ergebnisse resultiert daher folgendes Modell für den Bikarbonattransport:

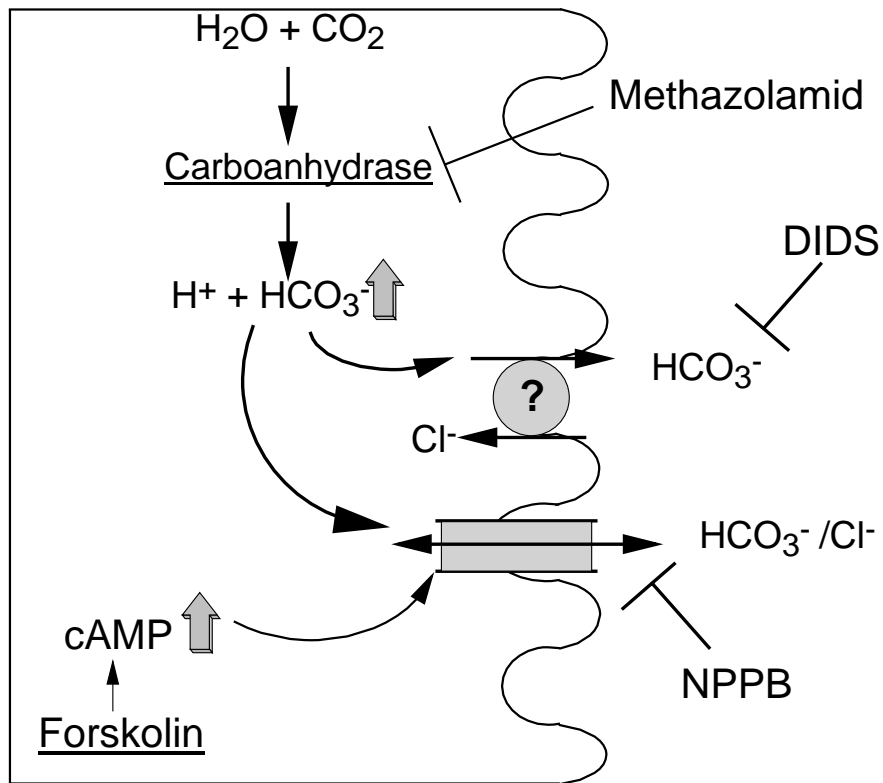


Abb. 31: Mögliches Zellmodell für den Bikarbonattransport: Der basolaterale Transport ist noch völlig unklar; ?= möglicherweise vorhandener Transportweg.

### 5.4.2 Chloridbewegungen über das Uterusepithel

Im Gegensatz zu dem Wissen über die Transportrichtung für Bikarbonat bestehen für die Chloridbewegungen einige Widersprüche. Hier existieren sowohl Arbeiten, die eine Resorption postulieren [Nys et al., 1999; Eastin & Spaziani, 1978a], als auch solche, die von einer Nettosekretion ausgehen [Vetter & O`Grady, 2005].

Meine Untersuchungen zu den Chloridbewegungen wurden in der Regel unter bikarbonatfreien Bedingungen durchgeführt, um eine deutlichere Zuordnung vornehmen zu können. Aus den basalen  $^{36}\text{Cl}$ -Messungen ergab sich eine Nettoresorption von  $0.78 \pm 0.80 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , die sich aus einer  $J_{\text{sm}}$  von  $6.40 \pm 1.12 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  und einer  $J_{\text{ms}}$  von  $7.18 \pm 0.80 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  zusammensetzte. Durch die große Varianz erreichte der Unterschied zwischen  $J_{\text{ms}}$  und  $J_{\text{sm}}$  keine Signifikanz. Gegen eine basale Chloridresorption, wie sie durch *in vivo* Daten beschrieben wurde, sprechen meine Ussingkammerversuchen. Die meisten mucosal eingesetzten Chloridkanalblocker (DPC, Glibenclamid, NPPB) induzierten einen signifikanten  $I_{\text{sc}}$ -Abfall, der sich nur durch geblockte Chloridsekretionsvorgänge erklären lässt, was die von Vetter und O`Grady veröffentlichten Daten über eine Chloridsekretion bestätigt [Vetter & O`Grady, 2005].

Im Falle des DPCs könnte man aufgrund der wenig ausgeprägten Selektivität dieses Blockers noch über die Blockade einer Bikarbonatsekretion spekulieren, die dann allerdings auf endogener Produktion beruhen müsste, da der Versuch unter bikarbonatfreien Bedingungen stattfand. Glibenclamid ist hingegen als sehr wirksamer CFTR-Kanalblocker bekannt, so dass ein Teil der Chloridbewegungen in

Form einer Sekretion besteht, was sich mit der doch beträchtlichen Transportrate für die  $J_{sm}$ -Richtung deckt.

Betrachtet man die Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung von intrazellulärem cAMP, so ergibt sich die Schlussfolgerung, dass Forskolin eine Chloridresorption induziert. In Vorversuchen zu dieser Forskolinantwort kristallisierte sich die Theorie heraus, dass Forskolin zur Öffnung apikaler Anionenkanäle führt. Dieser Kanal scheint NPPB-sensitiv zu sein, da nach NPPB der forskolininduzierte  $I_{sc}$ -Abfall signifikant kleiner ist gegenüber der zeitgleichen Kontrolle. Überraschenderweise scheint der im allgemeinen cAMP-regulierte CFTR-Kanal beim Haushuhn nicht auf Forskolinstimulation zu reagieren, da der forskolininduzierte  $I_{sc}$ -Abfall mit und ohne Glibenclamid gleich hoch war. Somit scheint ein CFTR-Kanal an der Chloridresorption nicht beteiligt zu sein.

Durch die Ionensubstitutionsversuche wurde deutlich, dass der forskolininduzierte  $I_{sc}$  zum größten Teil auf Chloridbewegungen beruht, gleichzeitig aber auch Auswirkungen auf den Bikarbonattransport hat. Durch Anlegen eines Chloridgradienten kann die forskolininduzierte  $I_{sc}$ -Änderung von einem Anstieg (sm-Gradient) in einen Abfall umgekehrt werden (ms-Gradient). Dies gelingt bei einem Bikarbonatgradienten ebenfalls, aber nur, wenn kein Chlorid in der Pufferlösung enthalten ist. Dies spricht dafür, dass die von Forskolin angesprochene Struktur (evt. NPPB-sensitiver Anionenkanal) bevorzugt Chlorid anstelle von Bikarbonat transportiert.

Aus der Kombination dieser Ergebnisse kann man darauf schließen, dass basal eine gewisse elektrogene Chloridsekretion besteht, dass jedoch in der Summe aller Chloridbewegungen, spricht auch der

elektroneutralen Transportvorgänge, eine Chloridresorption resultiert, was die *in vivo* Ergebnisse bestätigt. Zudem steigert cAMP diese basale Chloridresorption, neben der oben beschriebenen  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion.

Aus der Gesamtheit dieser Ergebnisse ist für Chlorid folgendes Zellmodell vorstellbar:

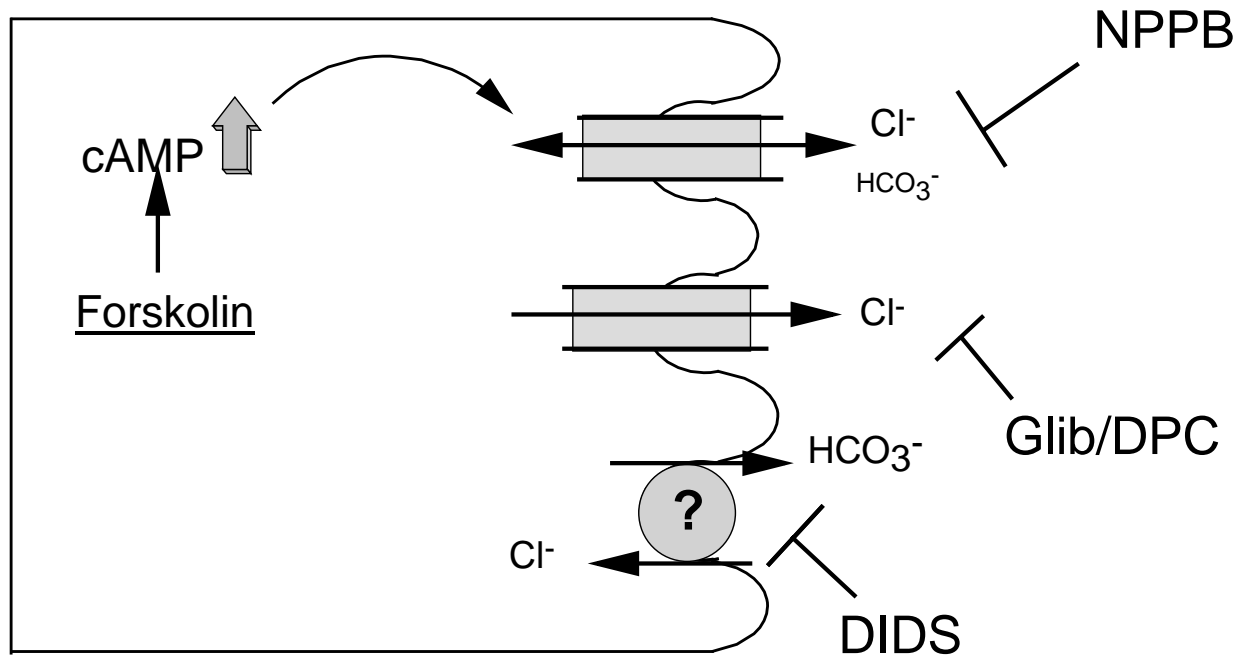


Abb. 32: Mögliches Zellmodell für den Chloridtransport: ?= möglicherweise vorhandener Transportweg.

### 6. Zusammenfassung

Mit den Untersuchungen zu dieser Arbeit sollten die Transporteigenschaften des Uterusepithels des Haushuhns für verschiedene Ionen charakterisiert werden.

Mithilfe von Radioisotopen konnte in der Ussingkammer unter Ausschaltung der natürlichen Potentialdifferenz eine Nettoresorption für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  nachgewiesen werden, wohingegen  $\text{Ca}^{2+}$  erwartungsgemäß sezerniert wird. Damit stimmen die ermittelten Transportbilanzen in der Ussingkammer mit den aus *in vivo* Studien berichteten Transportrichtungen überein, mit Ausnahme von  $\text{K}^+$ , für das im Gegensatz hierzu aus *in vivo* Versuchen eine Nettosekretion berichtet worden ist. Außerdem zeigten Spektroskopie- und Ionensubstitutionsversuche, dass  $\text{HCO}_3^-$  sezerniert wird.

Der positive Kurzschlussstrom wird zu über 70 % aus  $\text{Na}^+$ -Resorption über den epithelialen Natriumkanal getragen. Außerdem wird  $\text{Na}^+$  vermutlich über nichtselektive Kationenkanäle und elektroneutrale  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Austauscher resorbiert.

Sowohl durch den Einsatz von Clamp-Protokollen, als auch durch den Einsatz von Chelatoren konnte gezeigt werden, welchen großen Einfluss die natürliche Potentialdifferenz bzw. das Aufrechterhalten eines Konzentrationsgradienten auf den Calciumtransport hat.

Intrazellulär induziert cAMP eine Steigerung der basalen  $\text{Cl}^-$ -Resorption und der  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion. Die extrazelluläre Regulation der Ionentransportvorgänge ist dahingegen weiterhin unklar, da weder durch elektrische Feldstimulation noch durch Neurotoxine eine nervale Beteiligung gezeigt werden konnte und auch Prostaglandine keinen Einfluss auf die Ionentransportvorgänge haben.

## 7. Summary

### **Basal characterization and regulation of electrolyte transport across the uterine epithelium of domestic fowl (*gallus gallus domesticus*)**

The aim of this study was to characterise the transport properties of the uterine epithelium of the domestic fowl with respect to various ions.

With experiments in the Ussing-chamber using radioisotopes while controlling the transepithelial potential difference it has been demonstrated that  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  - are absorbed whereas  $\text{Ca}^{2+}$  is - as expected - secreted. These findings were almost in line with the results from *in vivo* studies - except for potassium for which *in vivo* experiments have shown secretion. Furthermore, in the present project spectroscopy and ion substitution experiments have demonstrated that bicarbonate is secreted by the uterine epithelium.

More than 70 % of the positive short circuit current was maintained by sodium absorption through the epithelial sodium channel. In addition, sodium has also most likely been absorbed via non-selective cation channels as well as via a sodium-proton-exchanger.

Clamp-experiments and precipitation of calcium have demonstrated the particular influence of trans-epithelial potential differences and the maintenance of a reasonable calcium gradient on the calcium transport across this membrane.

The intracellular second messenger cAMP increased chloride absorption and simultaneously bicarbonate secretion. However, extracellular control remained unclear since neither electrical field stimulation nor neurotoxins have affected short-circuit current nor had prostaglandins any effect on ion transport across the shell gland mucosa.



## 8. Literaturverzeichnis

**Balnave D, Usayran el-Khatibund N & Zhang D** (1992). Calcium and carbonate supply in the shell gland of hens laying eggs with strong and weak shells and during and after a rest from lay. *Poult. Sci.* 71, 2035-2040

**Binder HJ & Sandle GI** (1994). Electrolyte transport in the mammalian colon. *Physiology of the gastrointestinal tract. Vol.2, Third Edition* Hrsg.: Johnson LR, Raven Press, New York 64, 2133-2171

**Blaustein MP & Lederer WJ** (1999). Sodium-calcium exchange: Its physiological implications. *Phys. Rev.* 79 (3), 763-855

**Breen PC & Bruyn PPH** (1969). The fine structure of the secretory cells of the uterus (shell gland) of the chicken. *J. Morph.* 128, 35-66

**Castaldo DJ & Maurice DV** (1990). Shell gland adenosine triphosphatase in hens producing strong and weak egg shells. *Br. Poult. Sci.* 31(1): 225-229

**Clavert J & Benoit J** (1942b), Action de la folliculine sur le métabolisme du calcium chez les oiseaux IV. Retention du calcium alimentaire déterminée chez le pigeon par le dipropionate d'oestradiol. *Trav. Membres, Bull. Soc. Chim. Biol., Paris*, 24, 1469

zitiert nach: Simkiss K (1960). Calcium metabolism and avian reproduction. *Biol. Rev.* 36, 321-367

**Cohen I & Hurwitz S** (1973). The electrical potential difference and the short circuit current of the uterine mucosa of hens in relation to egg shell formation. *Poult. Sci.* 52, 2340-2341

**Common RH, Rutledge NA & Hale RW** (1948). Observations on the mineral metabolism of Pullets. VIII The influence of gonadal hormones on the retention of calcium and phosphorus. *J. agric. Sci.* 38, 64

zitiert nach: Simkiss K (1960). Calcium metabolism and avian reproduction. *Biol. Rev.* 36,321-367

- Cook NS & Quast U** (1990). Potassium channel pharmacology. In: Potassium channels. Structure, classification, function and therapeutic potential. Hrsg.: Cook NS, Ellis Horwood Limited, Chichester, England, 181-209
- Coty WM & Mc Conkey CL Jr.** (1982). A high affinity calcium-stimulated ATPase activity in the hen oviduct shell gland. Arch. Biochem. Biophys. 219(2), 444-453
- Diener M, Helmle-Kolb C, Murer H & Scharrer E** (1993). Effect of short-chain fatty acids on cell volume and intracellular pH in rat distal colon. Pflügers Arch. 424, 216-223
- Eastin WC & Spaziani E** (1978a). On the control of calcium secretion in the avian shell gland (uterus). Biol. Reprod. 19, 493-504
- Eastin WC & Spaziani E** (1978b). On the mechanism of calcium secretion in the avian shell gland (uterus). Biol. Reprod. 19, 505-518
- Etches RJ** (1987). Calcium logistics in the laying hen. J. Nutr. 117 (3), 619-628
- Ehrenspeck G, Schraer H & Schraer R** (1971). Calcium transfer across isolated avian shell gland. Am. J. Physiol. 220 (4), 967-972
- Frizzell RA & Schultz SG** (1972). Ionic conductances of extracellular shunt pathway in rabbit ileum. Influence of shunt on transmural sodium transport and electrical potential differences. J. Gen. Physiol. 59, 318-346
- Fromm M** (2005). Transport in Membranen und Epithelien. In: Physiologie des Menschen Hrsgs: Schmidt, Lang, Thews, 29. Auflage, Springer Verlag, S. 45
- Garty H & Benos DJ** (1988). Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na<sup>+</sup>-channel. Physiol. Rev. 68 (2), 309-373

- Gilben AB, Mitchell GG, Davidson MF, Laughlin KF & Hughes BO** (1982). Effect of administering two prostaglandin synthetase inhibitors (indomethacin and aspirin) on egg production in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Res. Vet. Sci.* 33 (2), 216-220
- Greger R** (1990). Chloride channel blockers. *Methods Enzymol.* 191, 793-810
- Greger R, Bleich M, Riedmann N, Van Drissche W, Eche D & Warth R** (1997). The role of K<sup>+</sup>-channels in colonic chloride secretion. *Comp. Biochem. Physiol.* 118, 271-275
- Hassanien S** (1979) : Aufbau der Eischale. In: Geflügel Kap.2.2, Hrsg: Scholtyssek S (1987), Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 31-81
- Hummel G** (2000). Anatomie und Physiologie der Vögel, Eugen Ulmer Verlag Stuttgart, 182
- Hutson JM, Donahoe PK & MacLaughlin DT** (1985). Steroid modulation of Mullerian duct regression in the chicken embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 57, 88-102
- Jackson MJ & Norris SH** (1985). Transport of sodium and chloride across rat gastric mucosa *in vitro*. *J. Physiol.* 360, 293-310
- Johnson AL** (1999). Reproduction in the female. In: Sturkie's Avian Physiology, 5. Aufl., Whittow GC (Hrsg.), New York, Academic Press, 569-596
- Kenyon JL & Gibbons WR** (1977). Effects of low-chloride-solutions on action potentials of sheep cardiac Purkinje fibers. *J. Gen. Phys.* 70, 635-660
- Kleyman TR & Cragoe Jr. EJ** (1988). Amilorid and its Analogs as tools in the study of ion transport. *J. Mem. Biol.* 105, 1-21
- Kyes P & Potter TS** (1934). Physiological marrow ossification in female pigeons. *Anat. Rec.* 60, 377

**Lagnado L & Mc Naughton PA** (1990). Electronic properties of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-exchanger. *J. Mem. Biol.* 113, 177-191

**Landauer W, Pfeifer CA, Gardner WV & Man EB** (1939). Hypercalcification, calcemia and lipemia in chickens following administration of estrogens. *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.* 41, 80

**Lavelin I, Meiri N, Genina O, Alexiev R & Pines M** (2001). Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase gene expression in the avian eggshell gland: distinct regulation in different cell types. *Am. J. Physiol.* 281, 1169-1176

**Lundholm CE** (1985a). Relation between Ca<sup>2+</sup>-uptake and ATPase activities in the particulate fractions of the eggshell gland mucosa of domestic fowl and duck. *Biochem. Physiol.* 81A (4), 787-799

**Lundholm CE** (1985b). Relation between Ca<sup>2+</sup>-metabolism and ATPase activities in the subcellular fractions from duck eggshell gland mucosa after DDE administration during different stages of eggshell formation. *Biochem. Physiol.* 82C (1), 1-16

**Lundholm CE** (1985c). Studies of the effect of DDE on the calcium metabolism of the eggshell gland during formation of eggshell in ducks and domestic fowl

zitiert nach: **Lundholm CE & Bartonek M** (1992a) Inhibition of eggshell formation in domestic fowl by indomethacin: relation to calcium and prostaglandin metabolism in the eggshell gland mucosa. *Comp. Biochem. Physiol.* 102 (3), 379-383

**Lundholm CE** (1987). Thinning of eggshell in birds by DDE. Mode of action of the eggshell gland. *Comp. Biochem. Physiol.* 88c, 1-22

**Lundholm CE** (1991). Increased eggshell thickness in domestic fowl after administration of the antiprogestosterone RU 38486 (Mifepristone<sup>®</sup>). *Pharmac. Toxicol.* 67, 185-187

**Lundholm CE & Baronek M** (1992a). Inhibition of eggshell formation in domestic fowl by indomethacin: relation to calcium and prostaglandin metabolism in the eggshell gland mucosa. *Comp. Biochem. Physiol.* 102 (3), 379-383

- Lundholm CE & Baronek M** (1992b). Furosemide decreases eggshell thickness and inhibits  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake by a subcellular fraction of eggshell gland mucosa of the domestic fowl. *Comp. Biochem. Physiol.* 101 (2), 317-320
- Malo Vergara A**, (1987). Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Veränderungen am Respiration- und Genitaltrakt beim Huhn durch eine Infektion mit dem Erreger der Infektiösen Bronchitis. Inaug. Diss. Hannover:
- Marschall RC, Fox JA, Butland SL, Ouellette BFS, Brinkman FSL & Tibbits GF** (2005). Phylogeny of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX) genes from genomic data identifies new gene duplications and a new family member in fish species. *Physiol. Genomics* 21, 161-173
- Mongin P** (1978), Studies on the avian shell gland during egg formation: The effect of acetazolamide on the composition of the mucosa. *Br. Poult. Sci.* 19, 501-509
- Müller WJ, Brubaker RL & Caplan MD** (1969). Eggshell formation and bone resorption in laying hens. *Fed. Proc.* 28 (6), 1851-1856
- Navickis RJ, Katzenellenbogen BS & Nalbandov AV** (1979). Effects of the sex steroid hormones and vitamin D<sub>3</sub> on calcium-binding proteins in the chick shell gland. *J. Biol. Rep.* 21, 1153-1162
- Nys Y** (1987). Progesterone and testosterone elicit increases in the duration of shell formation in domestic hens. *Brit. Poult. Sci.*, 28, 57-68
- Nys Y & de Laage X** (1984). Effects of suppression of eggshell calcification and of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  on  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}\text{-HCO}_3^-$ -ATPase, alkaline phosphatase, carbonic anhydrase and CaBP levels--I. The laying hen uterus. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 78(4): 833-838
- Nys Y, Hincke MT, Arias JI, Garcia-Ruiz JM & Solomon SE** (1999). Avian eggshell mineralisation. *Poult. Avian Biol.* 28, 57-68

**Odom TW & Harrison PC** (1985). The effect of carbon dioxide on the unidirectional transport of calcium in the isolate shell gland. *Poult. Sci.* 64, 1368-1370

**Parsons AH & Combs GF** (1981). Blood ionized calcium cycles in the chicken. *Poult. Sci.* 60, 1520-1524

**Pearson TW & Goldner AM** (1973). Calcium transport across avian uterus. 1. Effects of electrolyte substitution. *Am. J. Physiol.* 225 (6), 1508-1512

**Pearson TW & Goldner AM** (1974). Calcium transport across avian uterus. 2. Effects of inhibitors and nitrogen. *Am. J. Physiol.* 227 (2), 465 – 468

**Pearson TW, Pryor T & Goldner AM** (1977). Calcium transport across avian uterus. 3. Comparison of laying and non-laying birds. *Am. J. Physiol.* 232 (4), 437-443

**Perrone RD & McBride DE** (1988). Aldosterone and  $\text{PCO}_2$  enhance rubidium absorption in rat distal colon. *Am. J. Physiol.* 254, 898-906

**Pike JW & Alvarado RH** (1975).  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -activated ATPase in the shell gland of japanese quail. *Comp. Biochem. Phys.* 51b, 119-125

**Rabon HW Jr. & Roland DA Sr.** (1991). Uterine calcium-binding-protein activity of non-laying hens and hens laying hard-shelled or shell-less eggs. *Poult. Sci.* 70, 2280-2283

**Rajendran VM, Geibel J & Binder HJ** (1995). Chloride-dependent Na-H exchanger. *J. Biol. Chem.* 270 (19), 11051-11054

**Salevsky E & Leach RM** (1980). Studies on the organic components of shell gland fluid and the hen`s egg shell. *Poult. Sci.* 59, 438-443

**Sauveur B & Mongin P** (1971). Etude comparative du fluide utérin et de l`albumen et l`œuf in utero chez la poule. *An. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 11, 213-224

zitiert nach: **Nys Y et al.** Avian eggshell mineralisation. *Poult. Avian Biol. Rev.* 10 (3), 143-166

- Scholtyssek S** (1987). Geflügel, Ulmer Verlag, Stuttgart, 31-81
- Schultheiss G, Kocks S & Diener M** (2002). Methods for the study of ionic currents and Ca<sup>2+</sup>-signals in isolated colonic crypts. Biol. Proced. Online 3, 70-78
- Schultheiss G, Ribeiro R, Schäfer KH & Diener M** (2003). Activation of apical K<sup>+</sup> conductances by muscarinic receptor stimulation in rat distal colon: Fast and slow components. J. Memb. Biol. 195, 183-196
- Simkiss K** (1960). Calcium metabolism and avian reproduction. Biol. Rev. 36, 321-367
- Solomon S, Freyer JR & Baird T** (1975). The ultrastructural localization of calcium in the avian shell gland. J. Microsc. 105 (2), 215-222
- Strabel D & Diener M** (1995). The effect of neuropeptid Y on sodium, chloride and potassium transport across the rat distal colon. Brit. J. Pharmacol. 115, 1071-1079
- Sturkies PD** (2000). Avian Physiology, 5. Aufl., Whittow GC (Hrsg.), New York, Academic Press, 569-596
- Takahashi T, Kawashima M, Yasuoka T & Tanaka K** (1997). Appearance of an arginine vasotocin receptor of large molecular size in the uterus (shell gland) of the hen at oviposition. J. Repr. Fert. 110, 245-248
- Tyler C** (1940), Studies of calcium and phosphorus metabolism in relation to chemical structure of bone. 1.Experiments with laying birds. Biochem. J. 34, 202
- Urbach V, van Kerkhove E, Marguire D, Harvey BJ** (1996). Rapid activation of K-ATP-channels by aldosterone in principal cells of frog skin. J. Physiol. 491, 111-120
- Ussing HH & Zerahn K** (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Acta Physiol. Scand. 23, 110-127

**Vetter AE & O'Grady SM** (2005). Sodium and anion transport across the avian uterine (shell gland) epithelium. *J. Exp. Biol.* 208, 479-486

**Waibl H & Sinowatz F**(1992). Harn- und Geschlechtsorgane. In: Nickel R, Schummer A & Seiferle E. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band V, Hersg. Vollmershaus B., 2. Auflage, 251-261

**Warren DC & Scott HM** (1935a). The time factor in egg formation. *Poult. Sci.* 14,195

**Warren DC & Scott HM** (1935b). Physiological factors influencing the rate of egg formation in the domestic fowl. *J. Agric. Res.* 51, 565

**Wassermann RH, Smith CA, Smith CM, Brindak ME, Fullmer CS, Krook L, Penniston JT, Kumar R** (1991). Immunohistochemical localisation of calcium pump and calbindin-D28k in the oviduct of the laying hen. *Histochemistry* 96, 413-418

**Zondek B** (1936). Impairment of anterior pituitary functions by follicular hormone . *Lancet*, 231, 842

zitiert nach: Simkiss K (1960). Calcium metabolism and avian reproduction. *Biol. Rev.* 36, 321-367



### 9. Danksagung

Einen herzlichen Dank all denen, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei **Herrn PD Dr. Gerhard Schultheiß** für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Doktorarbeit bedanken. Bei der Bearbeitung von Problemen und Fragen war er mir durch seine Geduld und sein Engagement stets eine große Hilfe.

Besonders danke ich ihm für seine Bereitschaft zu intensiven und fruchtbaren Diskussion, durch die er mich immer aufs Neue motivieren konnte.

Besonders möchte ich auch *Herrn Prof. Dr. Martin Diener* danken, der mir durch seine freundliche, geduldige und rasche Hilfestellung bei Problemen und Fragen sehr geholfen hat, diese Arbeit zu einem guten Abschluss zu bringen.

Ich danke *Alice Metternich, Bärbel Schmidt, Brigitta Brück und Eva-Maria Haas* für ihre tatkräftige Hilfe bei der Laborarbeit und vor allem ihre moralische Unterstützung durch manch vertrautes Gespräch.

Einen Dank möchte ich auch an *Herrn Gerd Weigand* richten, der mir mit Rat und Tat bei den Isotopenversuchen zur Seite stand.

## Danksagung

---

Ein Dankeschön an *Britta Hennig*, die durch ihr ruhiges Wesen die ideale Ergänzung zu mir (und Chilly) in unserem gemeinsamen Büro war und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso danke ich den übrigen Mitarbeitern des Institutes für Veterinär-Physiologie für die im allgemeinen angenehme Arbeitsatmosphäre.

Vielen Dank an *meine Eltern* dafür, dass sie mir zu jederzeit durch ihre bedingungslose Liebe und Zuversicht die größtmögliche Stütze waren. Darüber hinaus danke ich meinem Vater für seine fachliche Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ein letzter Dank an meine Brüder *Tim* und *Daniel* und meinen deutsch-spanischen Freundeskreis, die immer ein offenes Ohr für mich und meine Sorgen hatten, und meinem Hund Chilly, die mir in den entscheidenden Momenten die Kraft zum Durchhalten gab.

Ohne die Unterstützung all dieser Menschen hätte ich vielleicht in manch schwieriger Situation die Geduld und das Ziel aus den Augen verloren.

Danke!

### **10. Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5133-5



9 78 3 835 951334 ©