

# Das Mikroklima des intestinalen Epithels

Bedeutung für die Nährstoffresorption / Von Gertrud Rehner und Hannelore Daniel

Die meisten Nährstoffe – aber auch zahlreiche Nicht-Nährstoffe, z. B. Pharmaka – werden durch Vermittlung der Enterozyten, die als einschichtiges Epithel an den Darmzotten angeordnet sind, resorbiert. Dieser transzelluläre Transport von Substanzen besteht prinzipiell aus drei Teilschritten: Aufnahme aus dem Darmlumen an der luminalen Membran der Epithelzelle, Durchtritt durch die Zelle und Austritt an der kontraluminalen Membran mit anschließender Verteilung durch Blut und Lymphe.

Die Epithelzellen des Dünndarms sind durch eine ausgeprägte morphologische und funktionelle Polarität charakterisiert. Am luminalen Pol ist die Oberfläche der Membran durch zahlreiche Ausstülpungen 20- bis 30fach vergrößert (Bild 1, 2b). An bzw. in dieser „Bürstensaummembran“ ist eine Reihe hydrolytisch spaltender Enzyme und spezifischer Transportsysteme verankert. Die glatte kontraluminale Membran hat eine andere, ihrer Funktion als Austrittsort von Substanzen entsprechende, biochemische Ausstattung.

Der Transport von Substanzen durch die Bürstensaummembran ist u. a. abhängig von den elektro-chemischen Eigenschaften der zu transportierenden Substanz und der transportvermittelnden Membran. Diese sind ihrerseits eine Funktion der physikalisch-chemischen Gegebenheiten unmittelbar an der Membran, die wir im folgenden als „Mikroklima“ bezeichnen werden. Das Interesse unserer Arbeitsgruppe gilt der Analyse einiger Faktoren, die das Mikroklima an der Oberfläche resorbierender Epithelien modifizieren. Besondere Beachtung findet in unseren Untersuchungen der Oberflächen-pH-Wert des Epithels als eine Größe, die den Nährstofftransport grundsätzlich beeinflussen könnte.

Bereits vor mehr als zwanzig Jahren beobachteten Pharmakologen *in vitro* und *in vivo*, daß die Resorption verschiedener Pharmaka nicht der pH-Partitionstheorie folgte. Diese Theorie – auch Theorie der „nicht-ionischen Diffusion“ genannt – besagt, daß eine dissoziablen Substanz durch die Barriere einer Lipoidmembran nur in der nichtdissoziierten Form permeieren kann. Infolgedessen hängt die Resorptionsrate eines schwachen Elektrolyten vom Ionisationsgrad, d. h. vom pK-Wert der Substanz, und vom pH-Wert des Mediums, in dem sie gelöst ist, ab. Die beobachteten Abweichungen von dieser Theorie konnten als Indiz dafür gewertet werden, daß unmittelbar an der Bürstensaummembran des Dünndarmepithels, im Mikroklima-Bereich also, die Wasser-



Bild 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Bürstensaummembran einer Dünndarmepithelzelle im Gefrierbruch. Die dargestellten Mikrovilli sind ca. 0,1–0,2  $\mu\text{m}$  breit und ca. 2–3  $\mu\text{m}$  lang. Die konkaven Flächen repräsentieren die Außenseite, die konvexen die Innenseite der Membran. Aufnahme: W. Haase.

stoffionen ( $\text{H}^+$ )-Konzentration höher ist als in der „bulk phase“ des Darmlumens. Tatsächlich wurde im Verlauf des letzten Jahrzehnts die Existenz des „sauren Mikroklimas“ durch Oberflächen-pH-Elektroden *in vivo* an der narkotisierten Ratte und an isolierten Darmstücken von Ratte und Mensch nachgewiesen.

Mittels selbsthergestellter Mikro-pH-Elektroden mit einem Spitzendurchmesser unter 10  $\mu\text{m}$  ist uns in den letzten Monaten ein weitgehend exaktes punktuell Erfassen der pH-Werte in Mikroregionen entlang der Dünndarmzotte des isolierten Rattenjunums gelungen (Bild 2a). Inkubierten wir Darmsegmente in einem Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 (= 40 nmol  $\text{H}^+$ /l), so registrierten wir eine Ansäuerung in der Mikroklima-Region mit einer charakteristischen Verteilung der  $\text{H}^+$ -Ionen. Die höchste  $\text{H}^+$ -Konzentration (214–224 nmol/l) und einen entsprechend niedrigen pH-Wert von etwa 6,7 fanden wir 10–100  $\mu\text{m}$  unterhalb der Zottenspitze, in einer Zone, wo die ausgereiften Enterozyten mit der höchsten digestiven und resorptiven Kapazität lokalisiert sind. Basalwärts, in Richtung Krypte konnten wir einen steilen Abfall der  $\text{H}^+$ -

Konzentration messen. Es erscheint wahrscheinlich – wenn auch noch nicht definitiv bewiesen –, daß die Zellen der Kryptenregion  $\text{OH}^-$  und/oder Bicarbonat $^-$  sezernieren und damit die in den oberen Regionen der Zotten entstehenden  $\text{H}^+$ -Ionen nicht nur neutralisieren, sondern an der Kryptenbasis eine relativ stark alkalische Zone hervorbringen. Lumenwärts war der Abfall der  $\text{H}^+$ -Konzentration weniger steil, erst in einer Entfernung von ca. 400  $\mu\text{m}$  von der Zottenspitze entfernt war der pH-Wert des Puffers (7,4) erreicht. Der Grund für diesen allmählichen Ausgleich der  $\text{H}^+$ -Konzentration dürfte in der Existenz der viskosen Glykoproteine des gastrointestinalen Mucus sowie einer unbewegten Wasserschicht an der Oberfläche der Bürstensaummembran liegen. Die – mit anderen Methoden gemessene – Dicke dieser Wasserschicht stimmt exakt mit der Breite der Zone des Ausgleichs der  $\text{H}^+$ -Konzentration überein.

Die Begrenzung der Region mit der höchsten  $\text{H}^+$ -Konzentration auf den Teil der Zotte, wo sich die Epithelzellen mit der ausgeprägtesten resorptiven Fähigkeit befinden, legte den Schluß nahe, daß die  $\text{H}^+$ -Ionen von diesen Zellen sezerniert werden. Unser Interesse richtete sich auf den biochemischen Mechanismus der  $\text{H}^+$ -Anreicherung im Mikroklima-Bereich. Als erstes stellten wir fest, daß der Prozeß der Ansäuerung durch metabolisierbare Zucker stimulierbar ist, wobei sich Mikroklima-pH-Werte um pH 6,0 ergaben. Hierbei war es prinzipiell gleichgültig, ob die Zucker nach *in vitro* Zusatz zum Inkubationsmedium, oder aber nach peroraler bzw. intravenöser Zufuhr an Ratten in die Enterozyten gelangten.

Die Epithelzellen des Darmes verstoffwechseln auch unter aeroben Bedingungen einen erheblichen Anteil der Glucose zu Milchsäure. Wir versuchten, eine quantitative Beziehung zwischen der  $\text{H}^+$ -Sekretion durch die Enterozyten und der Glucoseaufnahme, dem Glucosetransfer sowie der Milchsäureproduktion dieser Zellen aufzustellen. Etwa 40% der in der Glykolyse verstoffwechselten Glucose wurden zu Lactat abgebaut. Gemäß dem intrazellulären Lactat Spiegel, dem pK-Wert des Lactats und dem intrazellulären pH-Wert verließ ein Teil des Lactats die Zelle in Richtung Darmlumen in Form der gut permeablen Milchsäure (Bild 3). Unter den pH-Bedingungen des Mikroklimas an der Außenseite der Bürstensaummembran dissoziiert die Milchsäure in Lactat $^-$  und  $\text{H}^+$ . Das Lactat wird zusammen mit  $\text{Na}^+$  durch einen in der Bürstensaum-

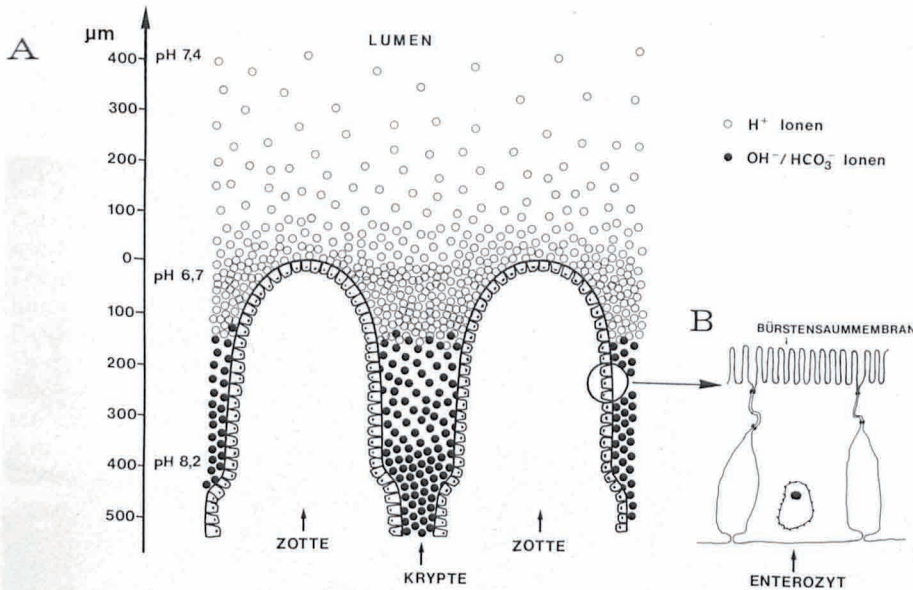


Bild 2: A. Schematische Darstellung der mittels Mikro-pH-Elektroden ermittelten Verteilung von  $H^+$ -Ionen und Basenäquivalenten ( $OH^-/HCO_3^-$  Ionen) entlang der Zotten des proximalen Dünndarmes.

B. Schematisierte Struktur eines ausgereiften Enterozyten im Zellverband.

membran verankerten Co-Transporter elektroneutral in die Zelle zurücktransportiert, während das  $H^+$  sich in der Mikroklima-Region anreichert. Der in diesem Modell angenommene „Lactat-shuttle“ würde erklären, daß netto etwa fünfmal mehr  $H^+$  als Lactat $^-$  von der Epithelzelle abgegeben wird.

Bei Untersuchungen über die Wirkung metabolisierbarer Zucker auf die Ansäuerung der Mikroklima-Region stellten wir fest, daß eine maximale  $H^+$ -Sekretion durch 10 mmol/l Glucose hervorgerufen wurde. Eine noch höhere Glucosekonzentration erbrachte keine weitere Stimulation der Ansäuerung. Wir nahmen daher als Arbeitshypothese an, daß der glucosestimulierte pH-Abfall im Mikroklima-Bereich zu einer Herabsetzung der Transportkapazität der Bürstensaummembran für Glucose führt – möglicherweise durch eine pH-bedingte Modifikation des Glucosecarriers. Dieses

Tabelle: Glucoseaufnahme in isolierte Bürstensaummembranvesikel im  $Na^+$ -Gradienten bei verschiedenen pH-Werten des Inkubationsmediums

Vesikel pH <sub>in</sub>	Medium pH <sub>out</sub>	Glucoseaufnahme pmol/mg Protein/10 Sekunden
7.4	7.4	205,4 ± 17,4
7.4	6.5	165,8 ± 14,8
7.4	5.75	72,1 ± 3,5

( $Na_{in}^+ : Na_{out}^+ : 100$  mmol/l)  $\bar{x} \pm sd/n = 12$   
 Glucosekonzentration: 21  $\mu$ mol/l  $^3H$ -Glucose  
 Inkubationstemperatur: 25 °C.

Postulat prüften wir an isolierten Bürstensaummembran-Vesikeln. Wir stellten fest, daß der  $Na^+$ -abhängige unidirektionale Flux der Glucose in den intravesikulären Raum bei einem pH-Wert von 5.75 im Außenmedium signifikant niedriger war als bei pH 6.5 bzw. pH 7.4 (Tabelle). Es wäre daher – mit der gebotenen Vorsicht – anzunehmen, daß die glucosestimulierte Anreicherung von  $H^+$ -Ionen im Mikroklima-Bereich einer Autoregulation unterliegt, indem der pH-Abfall rückkoppelnd den Glucosetransport schwächt, wodurch der weiteren  $H^+$ -Produktion und -Sekretion eine Grenze gesetzt wäre. Eine weitere Möglichkeit der Einstellung eines bestimmten Mikroklima-pH-Wertes ist dadurch denkbar, daß es bei gleichzeitigem Absinken des intrazellulären pH-Wertes zu einer Drosselung der Glykolyse kommt.

Obwohl der Einfluß des pH-Wertes auf den intestinalen Transport vieler Nährstoffe evident erscheint, fand er bislang wenig Beachtung und schon gar nicht unter dem Aspekt des „wahren“ pH-Wertes im Mikroklima-Bereich. Für den Transport der wasserlöslichen Vitamine beispielsweise, die al-

le eine oder mehrere ionisierbare Gruppen besitzen, müßte die pH-Partitionstheorie gelten. Wir untersuchten u. a. den Einfluß des Mikroklima-pH-Wertes auf den unidirektionalen Flux der Nicotinsäure, eines schwachen Elektrolyten mit einem pK-Wert von 4.9, an isolierten Dünndarmsegmenten der Ratte. Wie aus der Titrationskurve abzuleiten ist, lag beim niedrigsten der untersuchten pH-Werte (5.4) der höchste Anteil an Nicotinsäure undissoziiert vor. Im Einklang mit der pH-Partitionstheorie war bei diesem Mikroklima-pH auch die höchste Fluxrate zu bestimmen, und zwar bei allen untersuchten Vitaminkonzentrationen.

Diese Tatsache könnte auch von pathophysiologischer Relevanz sein. Bei einigen gastrointestinalen Erkrankungen des Menschen – z. B. Zöliakie und Morbus Crohn – ist nämlich festgestellt worden, daß die  $H^+$ -Konzentration im Mikroklima-Bereich signifikant niedriger ist als bei Gesunden. Der erhöhte Mikroklima-pH-Wert der Patientengruppe korrelierte mit einer Verschlechterung der Folsäureresorption und niedrigen Serumfolatspiegeln.

(Die Untersuchungen werden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert.)

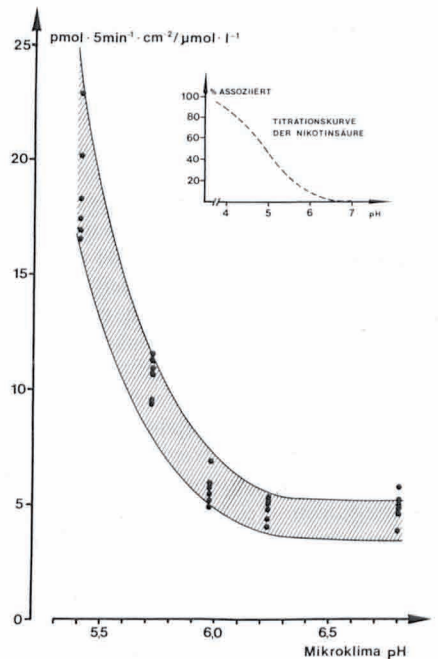


Bild 4: Aufnahme von Nicotinsäure in isolierte Segmente des proximalen Rattendünndarmes in Abhängigkeit vom Mikroklima-pH-Wert. Der Flux war proportional der Nicotinsäurekonzentration und proportional dem beim jeweiligen Mikroklima-pH-Wert nicht-dissoziierten Anteil an Nicotinsäure (s. Titrationskurve) ( $^3H$ -Nicotinsäure; 6 Konzentrationen zwischen  $10^{-7}$  und  $10^{-3}$  mol/l; unidirektionaler Flux/Substratkonzentration).

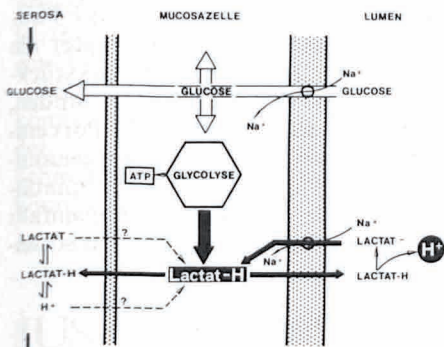


Bild 3: Modell zur Erklärung der stoffwechselabhängigen Protonensekretion der Epithelzellen des proximalen Dünndarmes.