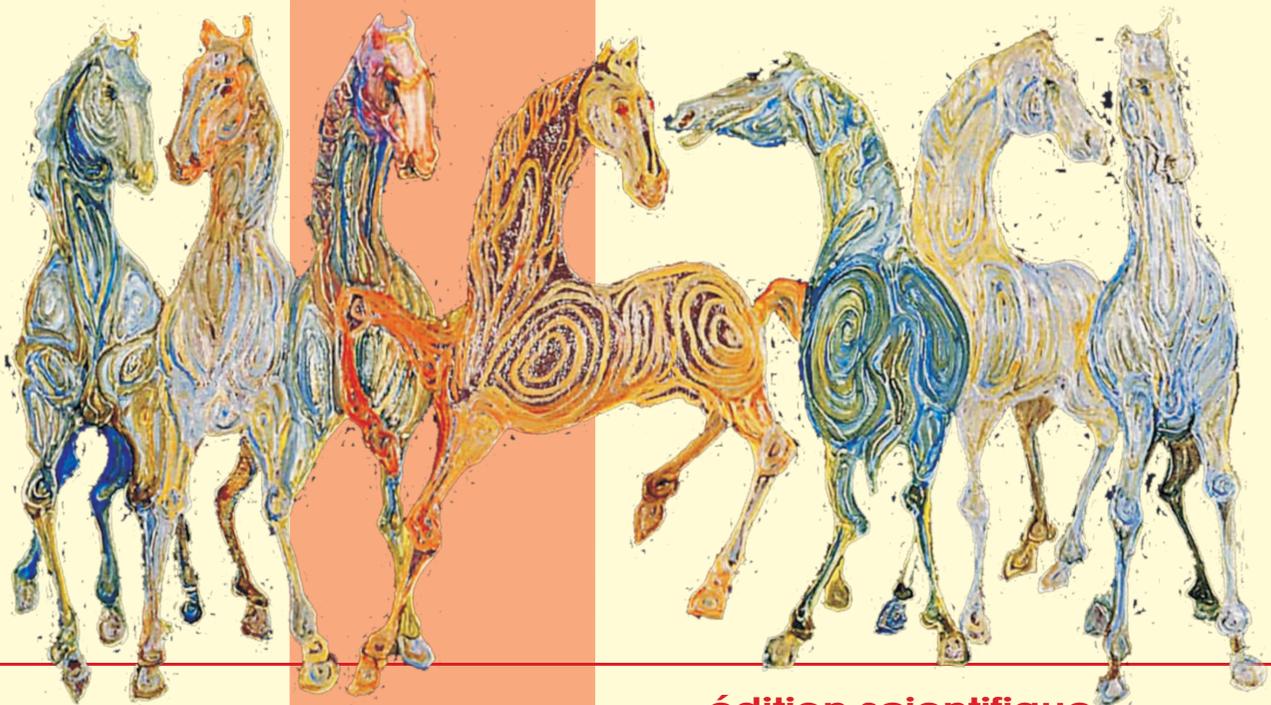


# DIE CARBACHOL-INDUZIERTE CHLORIDSEKRETION AM PROXIMALEN KOLON DES PFERDES

NICOLE LAMBERTI

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
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 2005

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 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG  
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757  
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

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

Aus dem Institut für Veterinärphysiologie  
und der Klinik für Pferde (Innere Medizin und Chirurgie) mit Lehrschmiede  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: PD Dr. Gerhard Schultheiß

**Die Carbachol-induzierte Chloridsekretion am  
proximalen Kolon des Pferdes**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
NICOLE LAMBERTI  
Tierärztin aus Wuppertal

Gießen 2005

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

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

---

1. Berichterstatter: PD Dr. Gerhard Schultheiß
2. Berichterstatter: PD Dr. Kerstin Fey

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2005

---

**Für meine Eltern**



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Einleitung.....	5
1.1 Hintergrund.....	5
1.1.1 Bedeutung des Dünndarms:.....	5
1.1.2 Bedeutung des Dickdarms:.....	6
1.2 Die Colitis X oder Typhlocolitis bei Pferden:.....	8
1.2.1 Prädisponierende Faktoren für die Entstehung der Colitis X:.....	8
1.3 Die zelluläre Ebene:.....	9
1.3.1 Möglichkeiten des Stoffaustausches der Zelle:.....	9
1.3.2 Kanäle der apikalen Membran:.....	11
1.3.2.1 Der CFTR Chloridkanal:.....	12
1.3.2.2 Der Ca <sup>2+</sup> aktivierte Cl <sup>-</sup> Kanal:.....	14
1.4 Intrazelluläre Regulation der epithelialen Sekretion:.....	15
1.4.1 Der intrazelluläre Second messenger cAMP:.....	15
1.4.2 Der intrazelluläre Second messenger cGMP:.....	16
1.4.3 Der Second messenger Calcium:.....	17
1.5 Extrazelluläre Regulation:.....	17
1.5.1 Einfluss des Nervensystems auf den Elektrolyttransport:.....	17
1.5.2 Bedeutung der Prostaglandine:.....	18
1.6 Ziele und eigene Fragestellung:.....	19
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Elektrolytlösungen:.....	20
2.2 Tiermaterial:.....	23
2.3 Gewebeentnahme und -präparation:.....	24
2.4 Histologie.....	25
2.5 Ussing-Kammer:.....	26
2.5.1 Aufbau:.....	27
2.5.2 Elektrische Messungen:.....	29
2.6 Die Technik der Basolateralen Depolarisation:.....	30
2.7 Chemikalien:.....	31
2.8 Auswertung:.....	32
3. Ergebnisse.....	33
3.1 Die basale Wirkung von Carbachol auf den Kurzschlussstrom.....	33

3. 1.1	Carbachol induziert eine Cl <sup>-</sup> Sekretion.....	34
3. 2	Beteiligung des Nervensystems und subepithelialer Zellen an der Carbachol induzierten Cl <sup>-</sup> Sekretion.....	37
3. 2.1	Beteiligung von Neuronen .....	37
3. 2.2	Beteiligung Prostaglandin produzierender subepithelialer Zellen .....	39
3. 3	Wirkung von Carbachol auf K <sup>+</sup> oder Cl <sup>-</sup> Kanäle an der Carbachol induzierten Cl <sup>-</sup> Sekretion.....	41
3. 3.1	Charakterisierung der an der Cl <sup>-</sup> Sekretion beteiligten Cl <sup>-</sup> Kanäle .....	45
3. 4	Der Ca <sup>2+</sup> abhängige Cl <sup>-</sup> Kanal .....	48
3. 5	Apikale Cl <sup>-</sup> Kanäle .....	52
4.	Diskussion.....	56
4. 1	Methodik .....	56
4. 2	Wirkungsweise von Carbachol am Pferdedarm.....	61
4. 2.1	Basale Bedingungen.....	61
4. 2.2	Chloridfreie Bedingungen .....	61
4. 3	Die subepithelial vermittelte Wirkung von Carbachol:.....	62
4. 3.1	Beteiligung des enteralen Nervensystems an der Carbachol induzierten Cl <sup>-</sup> Sekretion: .....	62
4. 3.2	Bedeutung der Prostaglandine für die Carbachol Wirkung: .....	63
4. 4	Die epithelial vermittelte Wirkung von Carbachol .....	66
4. 4.1	Indirekte Stimulierung der Cl <sup>-</sup> Sekretion : .....	66
4. 4.2	Direkte Stimulierung: .....	68
4. 4.2.1	Der CFTR Cl <sup>-</sup> Kanal.....	69
4. 4.2.2	Der Ca <sup>2+</sup> abhängige Cl <sup>-</sup> Kanal .....	70
5.	Zusammenfassung.....	73
6.	Summary .....	75
7.	Literaturverzeichnis.....	77
8.	Danksagung.....	89

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
CAMP	cyclisches-3'-5'-Adenosin-Mono-Phosphat
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (Cl <sup>-</sup> Kanal, der bei der Zystischen Fibrose des Menschen aufgrund einer Genmutation in seiner Proteinzusammensetzung verändert ist)
CGMP	cyclisches-3'-5'-Guanosin-Mono-Phosphat
CIC	Spannungsabhängiger Cl <sup>-</sup> Kanal
CICa	Ca <sup>2+</sup> abhängiger Cl <sup>-</sup> Kanal
DAG	Diacylglycerin
DIDS	4,4'-Diisothiocyanato-Stilbene-2,2'- Disulfonsäure
DMPP	1,2-Dimethyl-1-4-Phenylpiperazinium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EnaC	Epithelialer Na <sup>+</sup> Kanal
GABA	γ- Aminobuttersäure
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GNRP	Guaninnucleotid-releasing-Protein
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
G <sub>T</sub>	Transepitheliale Gewebeleitfähigkeit (= Kehrwert des Widerstandes)
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
hCLCA1	Ca <sup>2+</sup> aktivierter Cl <sup>-</sup> Kanal, der beim Menschen ausschließlich im basalen Kryptenepithel des Darmes zu finden ist
HEK	Human embryonic kidney (Zelllinie)
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IP <sub>3</sub>	Phosphoinositol-1,4,5-Trisphosphat
Isc	Kurzschlussstrom

KvLQT1	K <sup>+</sup> -Kanal, voltage-sensitive, long QT-Syndrome Type 1 (K <sup>+</sup> Kanal in der basolateralen Membran, welcher durch den Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration aktiviert wird)
NANC	nicht-adrenerg-nicht-cholinerg
NBF1 + NBF2	Nucleotidbindende Domänen 1 und 2
NO	Stickstoffmonoxid
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoat
P <sub>D</sub>	Transepitheliale Potentialdifferenz
PEG	Polyethylenglykol
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Phosphoinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
R <sub>T</sub>	Transepithelialer Widerstand
SITS	4-Acetamido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonsäure Natrium Salz
sK <sub>Ca</sub>	Small conductance Ca <sup>2+</sup> activated K <sup>+</sup> channel (K <sup>+</sup> Kanal in der basolateralen Membran, welcher hauptsächlich für den Aufbau der elektrischen Spannung verantwortlich zu sein scheint)
TMS1 + TMS2	Transmembranäre Domänen 1 und 2
TpeA	Tetrapentylammonium
TTX	Tetrodotoxin
TX	Thromboxan
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
v/v	Volume per volume

# 1. Einleitung

## 1.1 Hintergrund

Akute Durchfallerkrankungen kommen weltweit bei Pferden vor. Ihre besondere Bedeutung bei dieser Tierart liegt zum einen in ihrem häufig letalen Ausgang, zum anderen ist ihre Therapie in vielen Fällen sehr zeit- und kostenaufwändig. Oftmals ist, insbesondere bei Fohlen, selbst nach einer überstandenen akuten Diarrhoe die Darmmukosa derart geschädigt, dass die Tiere in ihrer Entwicklung zurückbleiben. Als auslösende Faktoren, die zu einer Entzündung der Darmschleimhaut führen, kommen bei erwachsenen Pferden neben bakteriellen (z.B. Salmonellen und Clostridien) und parasitären Erregern (insbesondere Strongyliden und Cyathostomiden) auch Stressfaktoren, wie häufige Transporte, Futter- und Umgebungswechsel sowie Änderungen in der Herdenzusammensetzung in Frage (SULLINS, 1999). Weiterhin von Bedeutung sind Antibiotikagaben, die die physiologische Darmflora schädigen können. Hierauf scheint die Spezies Pferd besonders empfindlich zu reagieren (HUSKAMP et al., 1999), ebenso wie auf die Gabe nicht steroidaler Antiphlogistika (CAMPBELL et al., 2002).

### 1.1.1 Bedeutung des Dünndarms:

Der Dünndarm gliedert sich in die drei Abschnitte Duodenum, Jejunum und Ileum. Durch die Bewegung des Dünndarms wird der Chymus in der digestiven Phase mit den Verdauungssäften, insbesondere mit dem Pankreassekret und der Galle, intensiv durchmischt. Die Becherzellen der Epithelzotten und der Lieberkühn'schen-Krypten produzieren Muzine, die das Epithel gelartig überziehen. Die Muzine schützen das Darmepithel vor Proteasen sowie im Duodenum vor dem sauren Mageninhalt und ermöglichen ein weitgehend reibungsfreies Gleiten des Darminhaltes. Die Hauptzellen der Dünndarmkrypten sezernieren eine plasmaitone NaCl Lösung. Cl<sup>-</sup> wird dabei zunächst sekundär aktiv über einen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> Kotransporter an der basolateralen Membran aus dem Blut aufgenommen und dann luminal durch einen Cl<sup>-</sup> Kanal abgegeben. Dieser Cl<sup>-</sup> Kanal wird durch vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und Acetylcholin über deren intrazelluläre Botenstoffe cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bzw. Phosphoinositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) aktiviert. Wasser und Na<sup>+</sup> folgen passiv auf parazellulärem Weg (VAUPEL und EWE, 1995).

Sind nun beispielsweise durch bakterielle Erreger, insbesondere durch Salmonellen oder Escherichia coli, die Enterozyten im Zottenbereich beeinträchtigt, kann es zu einem Absinken

der Konzentration von Verdauungsenzymen (z.B. Disaccharidasen) kommen. Dies hat zur Folge, dass osmotisch aktive Substanzen wie beispielsweise Kohlenhydrate in Form von Di- und Oligosacchariden, im Darmlumen verbleiben. Man spricht hier von Maldigestion mit der Folge einer osmotischen Diarrhoe. Der zerstörte Enterozyt wird aus dem Zottenverband ausgestoßen und es kommt zur Zottenatrophie, bei der der Enterozyt durch nicht ausgereifte Darmwandzellen ersetzt wird. Einerseits ist deren Kapazität zur Verdauungsenzymsekretion deutlich vermindert, andererseits besitzen sie nur eine herabgesetzte Resorptionsfähigkeit. Es entsteht eine Maldigestion in Kombination mit einer Malabsorption (WEISS und POSPISCHIL, 1999).

### *1. 1.2 Bedeutung des Dickdarms:*

Die Hauptaufgabe des Dickdarms beim Pferd besteht in der Bereitstellung einer Gärkammer für den mikrobiellen Abbau von in den vorigen Darmabschnitten nicht verdaulichen Pflanzenbestandteilen. Damit die umfangreichen bakteriellen Verdauungsvorgänge stattfinden können, kommt es zu einem nur sehr langsamen Weitertransport der Ingesta (GÜRTLER, 1989). Desweiteren kommt es im Dickdarm des Pferdes zu einer retrograden Propulsion des Darminhaltes innerhalb der von ARGENZIO et al. 1974 beschriebenen vier funktionellen Dickdarmabschnitte Zäkum, dorsale und ventrale Kolonlage sowie das Kolon descendens.

Nicht nur beim Pferd, sondern auch bei anderen Monogastriern werden die entstehenden kurzkettigen Fettsäuren sowie Elektrolyte und Wasser durch die Dickdarmschleimhaut resorbiert (VAUPEL und EWE, 1995).

ARGENZIO et al. führten 1974 Fütterungsversuche an Shetland Ponies durch. Anhand eines Markers (Polyethylenglycol 4000) stellten sie fest, dass Zäkum, dorsale und ventrale Kolonlage sowie das Kolon descendens als vier verschiedene, aber histologisch homogene Kompartimente betrachtet werden müssen. Des weiteren stellte er zyklische Alterationen zwischen Phasen der Nettosekretion und Nettoresorption fest. Die Ponies zeigten in den ersten acht Stunden nach der Fütterung, vor allem im Zäkum und ventralen Kolon, eine deutliche Zunahme der zu messenden Flüssigkeit. Unmittelbar im Anschluss daran folgte eine deutliche Abnahme des Flüssigkeitsvolumens in diesen Darmabschnitten bis zum Ende des 12-stündigen Fütterungsintervalls.

Hiernach sind Zäkum und die rechte ventrale Kolonlage die bedeutendsten Darmabschnitte für eine phasenabhängige Nettosekretion von Flüssigkeit, während die dorsale rechte Kolonlage und das Kolon descendens für die Nettoresorption verantwortlich sind.

Ist nun das äußerst sensible Gleichgewicht zwischen den Sekretions- und Resorptionsvorgängen im Dickdarm gestört, kann es innerhalb weniger Stunden zu erheblichen Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten kommen. Um diese so entstehende Diarrhoe behandeln zu können, sind genaue Kenntnisse über die Regulation der verschiedenen Ionentransportsysteme erforderlich.

Da, wie oben erwähnt, die rechte ventrale und dorsale Kolonlage ein zeitlich unterschiedliches Sekretionsverhalten zeigen und zudem die Colitis X (siehe unten) sich auf Zäkum und ventrales rechtes Kolon beschränkt, wurde in der vorliegenden Arbeit vergleichend die rechte dorsale und rechte ventrale Kolonlage untersucht, um eventuelle regulatorische bzw. sekretorische Unterschiede zwischen diesen beiden Abschnitten festzustellen.

## 1. 2 Die Colitis X oder Typhlocolitis bei Pferden:

Eine beim adulten Pferd wichtige Erkrankung des Dickdarms ist die Colitis X, wobei X für die noch immer nicht vollständig geklärte Ätiologie dieser Erkrankung steht. Hierbei handelt es sich um eine hämorrhagisch-nekrotisierende Typhlocolitis, welche auch bei intensiver Therapie zu 75-95 % (NICPOŃ et al. 2000) im hypovolämischen und toxischen Schock endet. Es besteht weder eine Alters-, Geschlechts- noch Rassedisposition (HERMANN 1985; POHLENZ et al. 1992).

Auffällig ist das häufige Auftreten der Erkrankung bei hospitalisierten Patienten, insbesondere nach Kolikoperationen (PUOTUNEN-REINERT und HUSKAMP 1986; GREIß et al. 1996).

### 1. 2.1 *Prädisponierende Faktoren für die Entstehung der Colitis X:*

Für die Entstehung der Typhlocolitis spielen prädisponierende Faktoren eine große Rolle (DEEGEN 2000; PRESCOTT et al. 1998).

- Vorgegangene Stresssituationen wie z.B. Umgebungswechsel und operative Eingriffe sind maßgeblich an der Entstehung dieser Erkrankung beteiligt (ROONEY et al. 1963; MESSER 1975; OWEN 1975; ROSE 1975; LAUK et al. 1987; DEEGEN et al. 1994, WOLLANKE 2004). Dabei ist es nicht notwendig, dass die Stresssituation unmittelbar dem Ausbruch der Krankheit vorgegangen ist, sondern sie kann auch bis zu drei Wochen zurückliegen (HUDSON 1968).
- Ein wichtiger, zur Entstehung der Typhlocolitis zumindest beitragender Punkt, sind Fehler im Fütterungsmanagement. Eine ballaststoffarme und dabei zu eiweissreiche Ernährung kann als krankheitsbegünstigend angesehen werden (WIERUP 1977; SCHIEFER 1981). Ebenfalls prädisponierend wirken Hungerphasen (AMTSBERG 2004). Diese führen zu einer Verflüssigung des Dickdarmchymus sowie zu einer Reduktion seines Gehaltes an flüchtigen Fettsäuren. Dadurch steigt der pH-Wert in den alkalischen Bereich (DEEGEN et al. 1995). Solche Veränderungen finden sich auch bei der manifesten Typhlocolitis.
- Ein weiterer prädisponierender Faktor ist die langanhaltende und hochdosierte Behandlung mit nichtsteroidalen Antiphlogistika, wie beispielsweise Phenylbutazon (CAMPBELL et al. 2002).
- Eine antibiotische Behandlung, insbesondere mit Lincomycin, Clindamycin, Erythromycin oder Oxytetracyclin, kann zur Zerstörung der normalen Darmflora führen und so am Entstehen einer Typhlocolitis beteiligt sein. (DEEGEN et al. 2000).

- Seit einiger Zeit werden auch  $\beta_2$ -Toxin produzierende Clostridium perfringens Stämme für die tödlich verlaufenden Enteropathien beim Pferd verantwortlich gemacht (GARMORY et al. 2000; GERBER und STRAUB, 2004). Im Kot von Pferden, die an Colitis X erkrankten, isolierten HERHOLZ et al. (1999) häufiger Clostridium perfringens Stämme, die das  $\beta_2$ -Toxin enthielten, als aus dem Kot gesunder Pferde.

Da sich die prädisponierenden Faktoren naturgemäß bei hospitalisierten Patienten häufen, ist die Zahl der Erkrankungen in Kliniken höher als in Heimatbeständen.

Die initialen Stadien, die zu dem Krankheitsbild der Typhlocolitis führen sind bislang ungeklärt. Im folgenden Abschnitt soll ein Überblick über die wichtigsten Ionenkanäle und Regelmechanismen, die an den Sekretions- und Resorptionsvorgängen am Kolon beteiligt sind, gegeben werden.

### **1.3 Die zelluläre Ebene:**

Das klinische Bild eines sekretorisch bedingten Durchfalls resultiert häufig aus einer gesteigerten Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) Sekretion.  $\text{Cl}^-$  ist das häufigste Anion des Extrazellulärraumes und zusammen mit Natrium ( $\text{Na}^+$ ) und Kalium ( $\text{K}^+$ ) bedeutsam für die Osmolalität des Blutes. Wird nun, z.B. durch bakterielle Enterotoxine, die  $\text{Cl}^-$  Sekretion in das Darmlumen gesteigert, so folgen die Elektrolyte  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  parazellulär aufgrund der elektrischen Triebkraft. Ebenso folgt Wasser aus osmotischen Gründen. Hierdurch kann es schnell zu einem lebensbedrohlichen Defizit des Körpers an Wasser,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  sowie Bicarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) Ionen kommen.

Verschiedene Ionenkanäle, aktive Transportprozesse sowie nervale und humorale Faktoren sind an der Flüssigkeits- und Elektrolytverschiebung beteiligt und sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

#### *1.3.1 Möglichkeiten des Stoffaustausches der Zelle:*

Es gibt für die Zelle verschiedene Möglichkeiten des Stoffaustausches mit ihrer Umgebung. Die einfachste Möglichkeit geschieht energieunabhängig mittels Diffusion, wobei die Transportrichtung durch elektrische und/oder chemische Gradienten vorgegeben ist. Die erleichterte Diffusion geht ebenfalls energieunabhängig, aber unter Beteiligung von Membranproteinen vonstatten. Auch hier bestimmen die eben genannten Gradienten die

Transportrichtung. Ionen können die Zellmembran wegen ihrer Ladung nicht einfach per Diffusion permeieren. Sie verwenden Kanäle oder Transporter/Carrier.

Während der Transport über die Carrier sekundär aktiv erfolgt, ist der Ionenfluss durch Kanäle von passiver Natur, wobei die Triebkraft von den erwähnten Gradienten stammt. Die einzelnen Membrankanäle sind mehr oder weniger selektiv. Es gibt spezifische Kanäle für Kationen (z.B.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) oder Anionen.

Des Weiteren finden primär aktive Transportvorgänge statt, bei denen direkt Energie in Form von ATP zum Transport verbraucht wird. Das wohl am weitesten verbreitete System beim Säuger ist die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase die auch als  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Pumpe bezeichnet wird.

Ionengradienten über die Zellmembran werden durch aktive Transportprozesse stabil gehalten. Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Pumpe transportiert an Plasmamembranen der Zelle  $\text{Na}^+$  aus und  $\text{K}^+$  in die Zelle hinein. Das  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Transportprotein ist eine ATPase, die an der Innenseite der Zellmembran ATP in ADP und Phosphat spaltet. Mit Hilfe der aus einem ATP übernommenen Energie transportiert sie netto drei  $\text{Na}^+$  Ionen aus der Zelle hinaus und zwei  $\text{K}^+$  Ionen in die Zelle hinein (z.B. ALBERTS et al., 1995). Sie stellt damit intrazellulär die niedrige  $\text{Na}^+$  und hohe  $\text{K}^+$  Konzentration sicher. Der so erzielte  $\text{Na}^+$  Konzentrationsgradient an der Membran wird funktionell für die elektrische Informationsweiterleitung, aber auch zum Antrieb anderer sekundär aktiver Transportmechanismen und für die Einstellung des Zellvolumens eingesetzt (FROMM und HIERHOLZER, 1995).

Ebenso wie die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Pumpe befindet sich an der basolateralen (= serosalen = den Blutgefäßen zugewandte Seite) Plasmamembran ein  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  Kotransporter, welcher für die physiologische  $\text{Cl}^-$  Aufnahme in die Zelle und damit auch für die  $\text{Cl}^-$  Sekretion bedeutend ist. Er nutzt die elektrochemische Triebkraft für den  $\text{Na}^+$  Einstrom und transportiert  $\text{Cl}^-$  und  $\text{K}^+$  sekundär aktiv in die Zelle. Hierbei wird  $\text{K}^+$  entgegen seines chemischen Gradienten und  $\text{Cl}^-$  entgegen seines elektrischen und chemischen Gradienten ebenfalls in die Zelle transportiert.  $\text{Cl}^-$  verlässt die Zelle über apikale (= mucosale = dem Darmlumen zugewandte)  $\text{Cl}^-$  Kanäle (FRIZZELL et al., 1979). Im Falle von  $\text{K}^+$  erfolgt ein Auswärtstransport über basolaterale Kanäle oder aber ebenfalls eine  $\text{K}^+$  Sekretion über apikale Kanäle (BINDER und SANDLE, 1994; SCHULTHEISS et al., 2003).

Neben der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Pumpe und dem  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  Kotransporter befinden sich in der basolateralen Zellmembran der Enterozyten verschiedene Typen von  $\text{K}^+$  Kanälen. Einer dieser  $\text{K}^+$  Kanäle ist der  $\text{sK}_{\text{Ca}}$  (small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel) Kanal, welcher hauptsächlich für den Aufbau der elektrischen Potentialdifferenz ( $P_D$ ) an der basolateralen

Membran verantwortlich zu sein scheint (WARTH et al. 1999). Ein weiterer  $K^+$  Kanal, welcher durch den Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration aktiviert wird, ist der KvLQT1 Kanal ( $K^+$ -channel, voltage-sensitive, long QT-Syndrome Type 1), welcher auch in der basolateralen Membran des Rattenkolons vorkommt (BLEICH et al., 1996). Seinen Namen verdankt dieser Kanal der Eigenschaft, bei einem Defekt am Herzen zu einer verlängerten QT-Strecke im EKG zu führen (BLEICH und WARTH, 2000).

Zudem wurde ein Maxi  $K^+$  Kanal in der basolateralen Membran von Kolonkrypten des Kaninchens (Klaerke et al., 1993) und der Ratte gemessen (DIENER et al., 1989).

### 1. 3.2 *Kanäle der apikalen Membran:*

Das  $Cl^-$  Ion ist maßgeblich an der Entstehung von sekretorischen Diarrhoen beteiligt. Es gibt indirekte und direkte Möglichkeiten, um eine  $Cl^-$  Sekretion auszulösen. Die indirekte Möglichkeit besteht in der Aktivierung spezifischer  $K^+$  Kanäle. Durch die hieraus resultierende  $K^+$  Sekretion wird die Triebkraft für die  $Cl^-$  Sekretion über spontan offene  $Cl^-$  Kanäle erhöht. Im Gegensatz zur direkten Möglichkeit der  $Cl^-$  Sekretion aktiviert Carbachol hierbei nicht direkt den  $Cl^-$  Kanal, sondern induziert eine  $Cl^-$  Sekretion durch eine Hyperpolarisation der Zelle. Dadurch wird eine Steigerung der elektrischen Triebkraft für einen  $Cl^-$  Ausstrom indirekt hervorgerufen.

In der apikalen Membran des Rattenkolons befinden sich, neben  $Cl^-$  Kanälen auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll, auch  $K^+$  Kanäle (Übersicht bei BINDER und SANDLE, 1994; DIENER et al., 1989). So zeigten DIENER und SCHARRER (1995) mit hypotonen Badlösungen, dass an der basolateralen Membran der Krypten des Rattenkolons volumensensitive  $K^+$  Kanäle vorhanden sind, und dass es bei Zellschwellung zu einer  $Cl^-$ - und  $K^+$ - Kanalaktivierung kommt.

Bei der direkten Möglichkeit einer Induktion der  $Cl^-$  Sekretion kommt es zur Aktivierung apikal gelegener  $Cl^-$  Kanäle. Es gibt diverse Typen solcher  $Cl^-$  Kanäle in der apikalen Membran. Beschrieben werden spannungsabhängige  $Cl^-$  Kanäle wie der  $ClC$   $Cl^-$  Kanal, der Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR)  $Cl^-$  Kanal, der Swelling-activated  $Cl^-$  Kanal, der Calcium aktivierte  $Cl^-$  Kanal, der p64  $Cl^-$  Kanal sowie  $Cl^-$  Kanäle mit GABA ( $\gamma$  Aminobuttersäure) und Glycin Rezeptoren. Auf die wichtigsten dieser Kanäle und auf ihre Regulation wird im folgenden näher eingegangen.

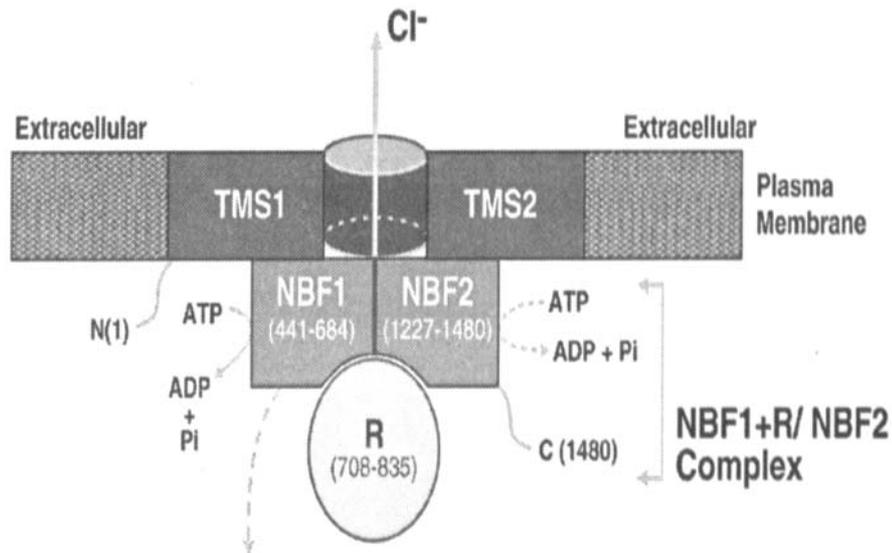
Über die Regulation der  $Cl^-$  Sekretion am Kolon des Pferdes sowie eventuell vorhandene  $Cl^-$  Kanäle ist nach Kenntnis der Autorin bislang nichts bekannt.

### 1. 3.2.1 Der CFTR Chloridkanal:

Einer der in der apikalen Membran von Enterozyten vorkommenden  $\text{Cl}^-$  Kanälen ist der Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR)  $\text{Cl}^-$  Kanal. Er ist bei der Zystischen Fibrose des Menschen aufgrund einer Genmutation in seiner Proteinzusammensetzung verändert. Hieraus resultiert eine Beeinflussung des aktiven  $\text{Cl}^-$ -Transports v.a. aus epithelialen Zellen und führt zu einer Erhöhung der Viskosität von Körpersekreten.

Bemerkenswert ist, dass der CFTR Chlorid Kanal Mitglied einer großen ATP abhängigen Protein Familie ist, welche auch als „ABC transporters“ oder „Traffic ATPases“ bezeichnet werden. All diese ATP abhängigen Proteine sind für den Transport von Metaboliten, Peptiden und Ionen durch biologische Membranen verantwortlich (HIGGINS, 1992; DOIGE and AMES, 1993). Die Einzigartigkeit des CFTR  $\text{Cl}^-$  Kanals beruht auf der Tatsache, dass er als einziges bekanntes Mitglied der ABC Transporter Familie über eine Regulatordomäne verfügt und seine Funktion eher die eines Kanals als die eines Transporters bzw. Carriers ist. Die Kanäle bilden lediglich Tunnel durch die Zellmembran, während es sich bei Carriern um komplexe Transportproteine handelt. Neben der Funktion eines  $\text{Cl}^-$  Kanals beeinflusst der CFTR  $\text{Cl}^-$  Kanal regulatorisch andere Transportmöglichkeiten z.B. hemmt er den epithelialen  $\text{Na}^+$  Kanal oder den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Austauscher (MALL et al., 1999; GREGER 2000; GAWENIS et al., 2003).

Das CFTR Protein ist eine einsträngige, aus 1480 Aminosäuren bestehende Polypeptidkette, welche in fünf Domänen unterteilt werden kann. Man unterscheidet zwei transmembranäre Domänen (TMS1 und TMS2), zwei nucleotidbindende Domänen (NBF1 und NBF2) sowie eine Regulatordomäne (R) (KO and PEDERSEN 2001, Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Bau des CFTR Chlorid Kanals. Nach KO and PEDERSEN, 2001.

Die beiden transmembranären Domänen (TMS1 und TMS2) bilden sechs transmembranäre Segmente, von denen die Segmente M1 und M6 den eigentlichen Cl<sup>-</sup> Kanal darstellen (AKABAS et al., 1994; AKABAS et al., 1997). Die nucleotidbindende Domäne NBF1 bindet und hydrolysiert ATP (THOMAS et al., 1991; KO et al., 1993; HOWELL et al., 2000), während NBF2 als Katalysator für die ATP Hydrolyse fungiert (RANDAK et al., 1997).

Die Aktivität der CFTR Cl<sup>-</sup> Kanäle kann durch die Bindung eines Agonisten an die Zelle stimuliert werden. Dies geschieht beispielsweise über Prostaglandin E<sub>2</sub>, welches über einen EP<sub>2</sub> Rezeptor an die Zelle bindet. Auf diesem Weg wird über ein G-Protein die Adenylatzyklase aktiviert und die zelluläre cAMP Konzentration steigt an. Alternativ kann durch Hemmung der hydrolytischen Spaltung von cAMP, indem die Phosphodiesterase inhibiert wird, beispielsweise durch cGMP die cAMP Konzentration ansteigen (BEAVO und REIFSNYDER, 1990).

Für die Regulation der CFTR Cl<sup>-</sup> Kanäle wird in erster Linie eine cAMP abhängige Protein Kinase A abhängig gemacht, welche die Regulator-domäne (R) phosphoryliert. Die Anwesenheit der Protein Kinase A allein genügt jedoch nicht, um den Kanal zu öffnen. Hierfür muss hydrolytisch spaltbares ATP in micromolaren Konzentrationen anwesend sein (ANDERSON et al., 1991), während die Anwesenheit von ADP die Kanalaktivität hemmt. ATP dient dabei nicht nur als Lieferant einer Phosphatgruppe zur Phosphorylierung der entsprechenden Stellen im Protein, sondern es muss auch ATP an die R-Domäne gebunden

sein (FOSKETT, 1998). Das Öffnen und Schließen des Kanals ist also abhängig von ATP und ADP (SCHULTZ et. al 1999).

Geblockt werden kann der CFTR Cl<sup>-</sup>- Kanal über das Sulfonylharnstoffderivat Glibenclamid, welches ebenfalls als Blocker von ATP abhängigen K<sup>+</sup> Kanälen fungiert (HASSELBLATT, 1996). Ebenfalls inhibitorisch wirkt 5-Nitro-2-(3-Phenylpropylamino)benzoat (NPPB), allerdings mit einer geringeren Spezifität.

Für das Kolon der Ratte ist eine Beteiligung des CFTR Cl<sup>-</sup> Kanals an der Cl<sup>-</sup> Sekretion bekannt. Durch den Einsatz von Glibenclamid wurde die Anwesenheit des CFTR Cl<sup>-</sup> Kanals am Pferdekolon in dieser Arbeit untersucht.

### 1. 3.2.2 Der Ca<sup>2+</sup> aktivierte Cl<sup>-</sup> Kanal:

Ein anderer Cl<sup>-</sup> Kanal ist der Ca<sup>2+</sup> aktivierte Cl<sup>-</sup> Kanal, welcher erstmals im Epithel der Trachea von Rindern identifiziert wurde (RAN et al., 1992). Es gelang den Ca<sup>2+</sup> abhängigen Cl<sup>-</sup> Kanal durch 4,4'-Diisothiocyanato-Stilbene-2,2'-Disulfonsäure (DIDS) zu hemmen, nicht aber durch NPPB (FISCHER et al. 1992; KUBITZ et al., 1992), und durch die Calmodulin Kinase II, in Anwesenheit von Calmodulin, Ca<sup>2+</sup> und ATP, zu aktivieren. Ebenfalls ein potenter Blocker der Ca<sup>2+</sup> aktivierten Cl<sup>-</sup> Kanäle ist 4-Acetamido-4'-isothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonsäure Natrium Salz (SITS) (NILIUS und DROOGMANN, 2001). Im Gegensatz zu dem CFTR Cl<sup>-</sup> Kanal ist der Ca<sup>2+</sup> aktivierte Cl<sup>-</sup> Kanal nicht durch die Proteinkinase A regulierbar.

Über die funktionelle Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> aktivierten Cl<sup>-</sup> Kanälen am Darm wurde lange kontrovers diskutiert. Studien von ANDERSON und WELSH 1991 zeigten, dass eine Ca<sup>2+</sup> abhängige Cl<sup>-</sup> Leitfähigkeit an Tumorzellen des Kolonepithels nur in einem nicht ausdifferenzierten Stadium nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten MERLIN et al. 1998 an humanen Tumorzelllinien T 84 (Tumorzelllinie von humanen Darmkryptenzellen) eine DIDS sensitive Ca<sup>2+</sup> abhängige Cl<sup>-</sup> Leitfähigkeit nachweisen, nachdem die basolaterale Membran permeabilisiert wurde. GRUBER et al. (1998) klonete und charakterisierte molekular und funktionell das erste Mitglied der Familie der Calcium aktivierten Cl<sup>-</sup> Kanäle beim Menschen (human CLCA1). Er fand heraus, dass der hCLCA1 beim Menschen ausschließlich im basalen Kryptenepithel des Darmes zu finden ist. Ein weiteres Mitglied der ClCa Familie (mClCa6) wurde am Mäusedarm isoliert, welches nach Expression in human embryonic kidney (HEK) 293 Zellen zu einer Ionomycin stimulierten, Niflufenamat sensitiven Cl<sup>-</sup> Leitfähigkeit führt (EVANS et al., 2004).

SCHULTHEISS et al. (in Vorbereitung) wiesen die Anwesenheit eines  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierten  $\text{Cl}^-$  Kanals funktionell und immunhistochemisch am Darmepithel der Ratte nach.

Am Kolon des Pferdes wurde, nach Kenntnis der Autorin, in dieser Arbeit die Anwesenheit eines  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierten  $\text{Cl}^-$  Kanals durch den Einsatz von SITS und DIDS erstmals untersucht.

## **1. 4 Intrazelluläre Regulation der epithelialen Sekretion:**

Steuernde Informationen, die von außen auf die Zelle eintreffen, werden, sofern sie die Membran nicht permeieren können, innerhalb der Zelle durch sekundäre Botenstoffe (Second messengers) nach erfolgter Rezeptorbindung weitergeleitet. Wichtige Second messenger sind z.B. cyclisches-3'-5'-Adenosin-Mono-Phosphat (cAMP), cyclisches-3'-5'-Guanosin-Mono-Phosphat (cGMP) und  $\text{Ca}^{2+}$ .

### *1. 4.1 Der intrazelluläre Second messenger cAMP:*

Von außen auf die Zelle eintreffende Stoffe, wie beispielsweise Proteohormone, binden an einen in die Plasmamembran integrierten spezifischen Rezeptor. Dies führt über ein heterotrimeres G-Protein zu einer Aktivitätszunahme der auf der Innenseite der Zellmembran lokalisierten katalytischen Einheit, der Adenylatzyklase.

Das Adenylatzyklasesystem besteht aus einer Reihe von Proteinen und besitzt Rezeptoren für stimulierende oder hemmende Substanzen. Die Bindung des entsprechenden Effektors an den Rezeptor wird als Signal auf das entsprechende heterotrimere G-Protein weitergeleitet. Die aktivierten Rezeptoren dienen als GNRPs (Guaninnucleotid-releasing-Protein) und lösen die Freisetzung des zuvor gebundenen GDP aus. Der Komplex aus aktiviertem Rezeptor sowie dem leeren heterotrimeren G-Protein bindet nun GTP, was zur Abdissoziation des aktivierten Rezeptors sowie Freisetzung der, für den stimulierenden Effekt wichtigen, Untereinheit  $\text{G}_s\alpha$  führt. Diese bindet ein GTP und ist in dieser Form zur Aktivierung der katalytischen Untereinheit C, der eigentlichen Adenylatzyklase, imstande, was zu einer vermehrten cAMP Bildung führt (LÖFFLER, 1998).

cAMP wird durch eine Adenylatzyklase aus ATP gebildet und steuert u.a. über Proteinkinasen des Typs A Phosphorylierungsprozesse.  $\text{ATP} \rightarrow 3',5'\text{-cAMP} + \text{Pyrophosphat}$ . An den Enterozyten hat cAMP stimulierende Effekte auf  $\text{Cl}^-$  Kanäle, z.B. den CFTR  $\text{Cl}^-$  Kanal in der apikalen Membran (siehe oben) und auf basolaterale  $\text{K}^+$  Kanäle (GREGER 2000). Hemmende Eigenschaften von cAMP sind bekannt auf den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Austauscher

(BINDER und SANDLE, 1994) und indirekt, über die Aktivierung des CFTR Cl<sup>-</sup>-Kanals, auf epitheliale Na<sup>+</sup> Kanäle ENaC (ECKE et al., 1996; MALL et al., 1999).

#### 1. 4.2 *Der intrazelluläre Second messenger cGMP:*

Auf hormonelle Signale durch das natriuretische Atriumpeptid, aber auch nach gesteigerter NO-Produktion erfolgt ein Anstieg der intrazellulären Konzentration von cyclo GMP (cGMP). Dieser Second messenger entspricht in seinem Aufbau dem cAMP, nur dass es aus GTP nach der Gleichung:  $GTP \rightarrow 3',5'cGMP + \text{Pyrophosphat}$  gebildet wird.

Die durch das natriuretische Atriumpeptid stimulierte membrangebundene (konstitutive) Guanylatzyklase unterscheidet sich vom Adenylatzyklasesystem dadurch, dass es sich um ein einziges Transmembranprotein handelt, auf dessen extrazellulärer Seite die Bindungsstelle für den aktivierenden Liganden liegt. Es entfällt folglich das G-Protein. Die Guanylatzyklase ist auf der cytoplasmatischen Seite stark phosphoryliert. Nach Bindung des Liganden kommt es zur Aktivierung des Enzyms. Anschließend erfolgt die Signallöschung durch Dephosphorylierung, was zu einem Aktivitätsverlust des Enzyms führt, auch wenn der Ligand noch an die Cyclase gebunden ist. Außer der membrangebundenen Guanylatzyklase findet sich in sehr vielen Zellen eine lösliche (induzierbare) Guanylatzyklase. Es handelt sich um ein dimeres Enzym aus zwei identischen Untereinheiten, welches in einem inaktiven und einem aktiven Zustand vorkommt. Das Verhältnis von inaktiver zu aktiver Form des Enzyms hängt von der Konzentration von Stickstoffmonoxid (NO) ab: je höher die NO-Konzentration desto höher die Guanylatzyklaseaktivität. NO ist ein intra- und interzelluläres Signalmolekül. Es entsteht enzymatisch unter Katalyse der NO-Synthese aus Arginin (LÖFFLER, 1998).

Das durch Aktivierung der membrangebundenen wie der löslichen Guanylatzyklase in Enterozyten letztlich entstehende cGMP führt ebenfalls zur Sekretion von Cl<sup>-</sup> in das Darmlumen (NOBLES et al., 1991; MARKERT et al., 1999). Dies geschieht einmal über eine direkte Stimulation des luminalen Cl<sup>-</sup> Kanals durch eine cGMP abhängige Proteinkinase G II (VAANDRAGER et al., 2000) und andererseits indirekt über eine Hemmung einer Phosphodiesterase (Typ V), welches zu einer intrazellulären cAMP-Konzentrationserhöhung führt (NOBLES et al., 1991).

### 1. 4.3 *Der Second messenger Calcium:*

Ein weiterer wichtiger Zellbotenstoff ist das  $\text{Ca}^{2+}$ . Es besitzt ionisiert in ruhenden Zellen eine sehr niedrige Konzentration von  $10^{-8}$ - $10^{-7}$  M (DUDEL, 1995). Wenn es beispielsweise nach Membranpotentialänderungen durch Öffnen spezifischer Membrankanäle in die Zelle eindringt, wird die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration erhöht.  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen können aber auch aus intrazellulären Speichern, wie dem endoplasmatischen Retikulum, durch Phosphoinositol-1,4,5-Trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) vermittelt, freigesetzt werden. Wenn von außen beispielsweise Neurotransmitter oder Hormone auf die Zelle eintreffen, binden diese an membranständige Rezeptoren. Von hier aus wird die Erregung auf ein heterotrimeres G- Protein, welches an der Innenseite der Membran liegt, übertragen. Im nächsten Schritt wird nun ein gewöhnliches Lipid der Membran, Phosphatidylinositol (PI), das zuvor zwei zusätzliche Phosphatgruppen erhalten hatte und so zu Phosphoinositol-4,5-Bisphosphat (PIP2) wurde, von der aktivierten Phosphodiesterase Phospholipase C (PLC),  $\text{IP}_3$  und dem Lipid Diacylglycerin (DAG) gespalten. Inositoltrisphosphat ist der wasserlösliche Botenstoff, der in das Zytosol diffundiert und aus dem endoplasmatischen Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$  freisetzt (TOESCU, 1995). Ein Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration führt am Kolonepithel primär zur Aktivierung von  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeiten. Basolateral ist ein „small conductance“  $\text{K}^+$  Kanal mit einer Leitfähigkeit von 16 pS (BLEICH et al., 1996; NIELSEN et al., 1998; WARTH et al., 1999) betroffen, apikal zeigt sich ein durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierbarer  $\text{K}^+$  Kanal (GREGER 2000; SCHULTHEISS et al., 2003). Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle, was wiederum eine  $\text{Cl}^-$  Sekretion in das Darmlumen zur Folge hat (STRABEL und DIENER, 1995).

## 1. 5 Extrazelluläre Regulation:

### 1. 5.1 *Einfluss des Nervensystems auf den Elektrolyttransport:*

Der Elektrolyttransport am Darm wird unter anderem neural geregelt. Dies wird durch das autonom arbeitende enterale Nervensystem gewährleistet (VAUPEL und EWE, 1995). Hierbei spielt für die Steuerung der Ionensekretion der Plexus submucosus (Meißnerscher Plexus) der sich zwischen innerer Zirkulärmuskulatur und dem Epithel befindet, eine wichtige Rolle (SURPRENANT et al., 2000).

Das vegetative Nervensystem wirkt nur modulierend auf das Darmnervensystem. Grundsätzlich fördert der Parasympathikus Motilität und Sekretion während der Sympathikus einen eher hemmenden Einfluss ausübt. Zudem vermindert eine Sympathikuserregung die Durchblutung des Darmes und steigert den Tonus der gastrointestinalen Sphinkteren.

Der Transmitter des Parasympathikus, Acetylcholin, reagiert mit nikotinartigen Rezeptoren an Ganglienzellen und ist ebenfalls Überträgersubstanz an den postganglionären Nervenendigungen, wo es mit den muskarinergen Rezeptoren der Effektorzellen des Kolons reagiert. Die cholinergen postganglionergen Fasern in dem Plexus submucosus vermitteln vor allem exzitatorische Effekte. Neben diesen erregenden Neuronen finden sich auch hemmend wirkende Fasern, die nicht-adrenergisch-nicht-cholinerg sind (NANC-Neurone). Sie benutzen wahrscheinlich die Neuropeptide VIP, ATP, Somatostatin und NO als Transmitter. Einige NANC-Neurone können allerdings auch erregend wirken. In diesem Fall sind die Substanz P, endogene Opioide und andere Peptide möglicherweise die Transmitter.

Transmitter der sympathischen postganglionären Neurone ist Noradrenalin. Die direkte Wirkung sympathischer Neurone auf die glatte Muskulatur des Darmes ist schwach, lediglich die glatte Sphinktermuskulatur wird über  $\alpha_1$ -Rezeptoren direkt aktiviert, wodurch eine funktionelle Trennung verschiedener Abschnitte des Magen-Darm-Kanals erreicht wird. Ansonsten besteht die Wirkung des Sympathikus vor allem in einer Hemmung erregender Neurone des Plexus (VAUPEL und EWE, 1995).

### 1. 5.2 *Bedeutung der Prostaglandine:*

Prostaglandine stimulieren über Neurone des Plexus submucosus die  $\text{Cl}^-$  Sekretion der Mucosa. Der Plexus submucosus steht in enger Verbindung zu den Epithelzellen und beeinflusst deren resorptive und sekretorische Funktionen (VAUPEL und EWE 1995). Über eine direkte Aktivierung der Enterozyten haben Prostaglandine des weiteren die Möglichkeit, die mukosale  $\text{Cl}^-$  Sekretion zu steigern (DIENER et al., 1988b). Da die Prostaglandine, wie auch Acetylcholin, nicht in der Lage sind die Zellmembran zu durchdringen, binden auch sie an membranständige Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt. Entsprechend ihrer jeweils höchsten Affinität zu den Prostaglandinen der D-, F-, I- und E-Serie werden sie in die Haupttypen DP, FP, IP, EP eingeteilt. Innerhalb der EP-Rezeptoren unterscheidet man vier Subtypen. Die assoziierten intrazellulären Signaltransduktionswege sind entweder Stimulation oder Hemmung der Adenylatcyclase sowie Stimulation der Phospholipase C (PESKAR, 2001).

Da der Hauptanteil der mucosal wirksamen Prostaglandine von subepithelialen Zellen gebildet wird (CRAVEN und DE RUBERTIS, 1984) sollte deren Beteiligung an der Cl<sup>-</sup> Sekretion über eine mögliche Aktivierung des CFTR Cl<sup>-</sup> Kanals näher untersucht werden.

## **1. 6 Ziele und eigene Fragestellung:**

In der vorliegenden Arbeit wurden die rechte ventrale und rechte dorsale Kolonlage des Pferdes hinsichtlich der Mechanismen zur Cl<sup>-</sup> Sekretion vergleichend untersucht. Der Grund dieser vergleichenden Untersuchung basiert auf der Tatsache, dass sich die pathologischen Veränderungen der an Colitis X erkrankten Pferde in der Regel auf das Zäkum sowie die rechte ventrale Kolonlage bis hin zur Zwechfellflexur beschränken. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich die beiden Kolonlagen in der Regulation der Sekretion unterscheiden. Hierauf weisen auch die Untersuchungen von ARGENZIO et al. 1974 hin, die zyklische Alterationen in Phasen der Nettosekretion und Resorption in den vier funktionell verschiedenen Dickdarmabschnitten beim Pferd nachgewiesen haben.

Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Was gibt es für Unterschiede in der Regulation der Cl<sup>-</sup> Sekretion im rechten dorsalen und rechten ventralen Kolon?
2. Welche Rolle spielen K<sup>+</sup> Kanäle bei der Cl<sup>-</sup> Sekretion?
3. Inwieweit ist das enterale Nervensystem beteiligt?
4. Welche Rolle spielen subepitheliale Zellen und welche Bedeutung bei der Cl<sup>-</sup> Sekretion kommt den Prostaglandinen über eine Aktivierung des CFTR Cl<sup>-</sup> Kanals zu?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Elektrolytlösungen:

#### Lösung 1:

Die Versuche sowie der Eichvorgang wurden in Parsons-Standard-Lösung (PARSONS and PATERSON, 1965) mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

**Tabelle 1:** Parsons-Standard-Lösung, Angaben in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

NaCl	107,00
KCl	4,50
NaHCO <sub>3</sub>	25,00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,80
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20
CaCl <sub>2</sub>	1,25
MgSO <sub>4</sub>	1,00
Glucose	12,00

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit HCl/NaOH auf einen Wert von 7,4. Die Lösung wurde während der Versuchsdauer mit Carbogen (5 % CO<sub>2</sub> / 95 % O<sub>2</sub> v/v) begast. Die Begasung mit CO<sub>2</sub> diente der Konstanthaltung des pH-Wertes.

**Lösung 2:**

Für den Transport vom Schlachthof bis zum Labor wurde eine Standard-Tyrode-Lösung mit folgender Zusammensetzung verwendet:

**Tabelle 2:** Standard-Tyrode-Lösung, Angaben in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

NaCl	140,00
KCL	5,40
HEPES	10,00
Glucose	12,20
CaCl <sub>2</sub>	1,25
MgCl <sub>2</sub>	1,00

Die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 erfolgte mit HCl/NaOH ohne Begasung.

**Lösung 3:**

Bei Anwendung der Technik der basolateralen Depolarisation, in Verbindung mit einem Chlorid Gradienten von serosal nach mucosal, wurde in der Parsons-Standard-Lösung auf der mucosalen Seite NaCl durch NaGluconat ersetzt.

**Tabelle 3:** Cl<sup>-</sup>-arme Parsons-Standard-Lösung, eingesetzt im Protokoll der basolateralen Depolarisation auf der mukosalen Seite. Hierdurch wurde ein Cl<sup>-</sup>-Gradient in mukosaler Richtung angelegt. Angaben in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

NaGluconat	107,00
Glucose	12,20
CaGluconat	5,75
KCl	4,50
NaHCO <sub>3</sub>	25,00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,80
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20
MgSO <sub>4</sub>	1,00

Da Gluconat die  $\text{Ca}^{2+}$  Ionenaktivität drastisch reduziert (KENYON und GIBBONS, 1977) wurde die  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration entsprechend erhöht. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit HCl/NaOH auf 7,4. Die Lösung wurde während der Versuchsdauer mit Carbogen (5 %  $\text{CO}_2$  / 95 %  $\text{O}_2$  v/v) begast.

#### **Lösung 4:**

Für das Protokoll der basolateralen Depolarisation wurde NaCl isoosmolar durch KCl ersetzt, wodurch die basolaterale Membran elektrisch ausgeschaltet wird.

**Tabelle 4:** Variation der Parsons-Standard-Lösung. Angaben in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

KCl	111,50
Glucose	12,20
$\text{NaHCO}_3$	25,00
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,80
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,20
$\text{CaCl}_2$	1,25
$\text{MgSO}_4$	1,00

In Lösung 4 erfolgte ebenfalls die Einstellung des pH-Wertes mit HCl/NaOH auf 7,4. Während der Versuchsdauer wurde das Gewebe mit Carbogen (5 %  $\text{CO}_2$  / 95 %  $\text{O}_2$  v/v) begast.

Bei Versuchen der basolateralen Depolarisation ohne  $\text{Cl}^-$ -Gradienten wurden folgende Lösungen eingesetzt: **mucosal** Lösung Nummer 3 und **serosal** Lösung Nr. 5:

**Lösung 5:**

NaCl wurde in dieser Lösung isoosmolar durch KGluconat ersetzt, wodurch die basolaterale Membran depolarisiert wurde ohne gleichzeitiges Anlegen eines  $\text{Cl}^-$ -Gradienten. Auf der mukosalen Seite wurde die Parsons Standard Lösung durch die Lösung Nr. 3 ersetzt. Die  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration wurde auch in dieser Lösung aus den bei Lösung 3 aufgeführten Gründen erhöht.

**Tabelle 5:** Variation der Parsons-Standard-Lösung, eingesetzt im Protokoll der basolateralen Depolarisation ohne gleichzeitiges Anlegen eines  $\text{Cl}^-$ -Gradienten. Angaben in  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

KGluconat	107,00
Cholinbicarbonat	25,00
Glucose	12,20
CaGluconat	5,75
KCl	4,50
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,80
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,20
$\text{MgSO}_4$	1,00

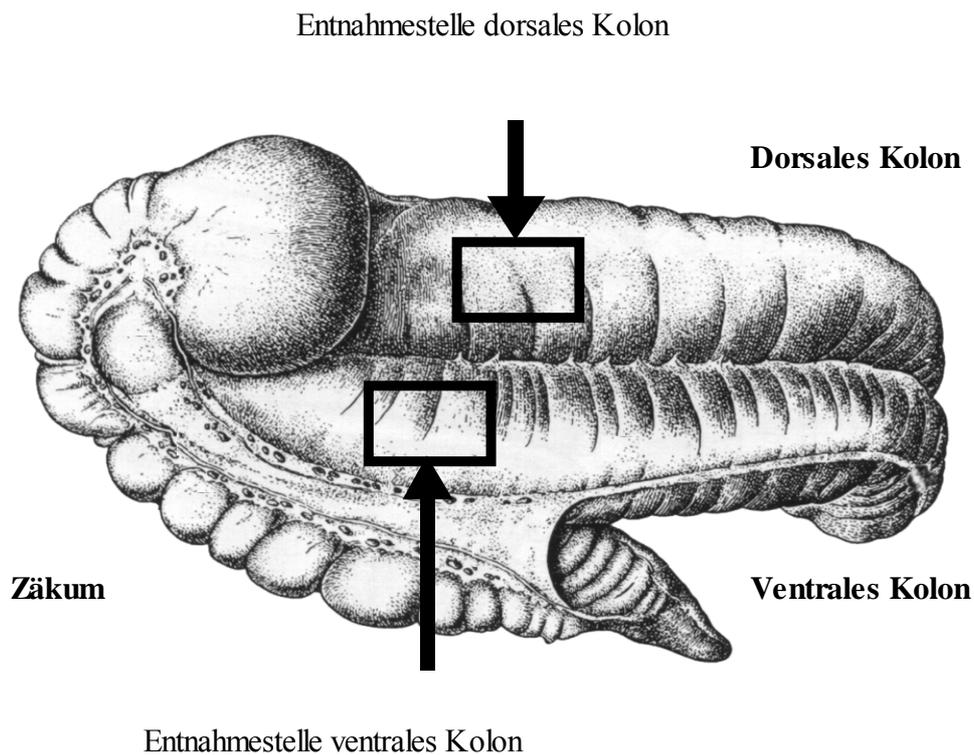
Wiederum erfolgte die pH-Wert Einstellung mit HCl/NaOH auf 7,4. Auch diese Lösung wurde während der Versuchsdauer mit Carbogen (5 %  $\text{CO}_2$  / 95 %  $\text{O}_2$  v/v) begast.

**2.2 Tiermaterial:**

Für die Versuche wurde Darmepithel der rechten ventralen und rechten dorsalen Kolonlage von 64 Warmblutpferden beiderlei Geschlechts im Alter zwischen 2 und 25 Jahren verwendet. Die Tiere wurden am Versuchstag der Schlachtung zugeführt. Zum Zeitpunkt der Tötung zeigten die Pferde keine Hinweise auf Erkrankungen am Magen-Darm-Trakt.

### 2.3 Gewebeentnahme und -präparation:

Die Pferde wurden auf dem Gießener Schlachthof mittels Bolzenschuss betäubt und durch anschließendes Ausbluten getötet. Im Verlauf der Schlachtstraße erfolgte nach Absetzen des Kopfes und der distalen Gliedmaßen sowie Entfernung der Haut und des Schweifes die Ausweidung der Pferde. Der gesamte Magen-Darm-Trakt wurde so herauspräpariert, dass er vollständig in einen bereitstehenden Metallcontainer fiel. Unmittelbar danach erfolgte die Gewebeentnahme, indem erst das Zäkum und, anhand der Plica caecocolica, die rechte ventrale und dorsale Kolonlage aufgesucht wurden. Aus der dorsalen rechten Kolonlage wurde aus der „magenähnlichen Erweiterung“ (Ampulla coli), aus der rechten ventralen Kolonlage am Übergang der Plica caecocolica zur lateralen freien Grimmdarmtaenie mittels Schere und anatomischer Pinzette je ein ca. 10 x 10 cm großes Darmstück herausgeschnitten (Entnahmeorte siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Blinddarm und rechte Längslage des Colon ascendens vom Pferd, rechte Seitenansicht (Nach Nickel et al., 1987)

Die Darmstücke wurden unmittelbar nach der Entnahme in die eisgekühlte Lösung 2 verbracht. Im Labor erfolgten dann die weiteren Schritte, wie der Pufferaustausch in Lösung 1, ebenfalls eisgekühlt und jetzt unter Carbogenbegasung, die weitere Präparation und schließlich das Einspannen in die Ussing-Kammern.

Zur Herstellung des einzuspannenden Mucosa-Submucosa Präparates wurde das Darmstück mit der epithelialen Seite nach unten auf eine mit Lösung 1 befeuchtete Glasplatte gelegt und mit zwei Kanülen am Rand auf einer darunter liegenden Unterlage fixiert. Mittels Skalpell und Metzenbaumschere erfolgte vorsichtig das Abpräparieren der Serosa und der Tunica muscularis, so dass ein Mucosa-Submucosa Präparat zur Messung zur Verfügung stand.

Anschließend wurde das Präparat mittels Skalpell in vier ca. 3,5 x 3 cm große Segmente unterteilt und in die Ussing-Kammern eingespannt. Zwei benachbarte Stücke wurden dann als Versuchs- bzw. Kontrollgewebe verwendet.

## **2.4 Histologie**

Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse von ARGENZIO et al. (1974) wurden an Geweben gemessen, deren Entnahme nach Tötung sehr schnell erfolgen konnte. Weiterhin waren die extra für die Versuche getöteten Tiere Ponies. Da bei den vorliegenden Versuchen Schlachtmaterial verwendet wurde, was ausschließlich von Großpferden stammte, wurde einmalig zur Evaluation des Gewebepräparates eine histologische Untersuchung durchgeführt. Hierzu wurde das Mucosa-Submucosa Präparat in Paraffin eingebettet. Die hieraus gewonnenen Schnitte wurden nach dem Entparaffinieren in Alkohol fixiert und nach der Methodik der Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) gefärbt (siehe Färbeprotokoll Tabelle 6, Seite 22). Hierbei handelt es sich um eine Übersichtsfärbung, bei der sich die Zellkerne blau und das übrige Gewebe rot darstellen.

**Tabelle 6:** Färbeprotokoll zur Durchführung der HE-Färbung nach Angaben aus dem Institut für Veterinär-Pathologie, JLU Gießen

	Substanz		Zeit
1.	Roti-Histol	Xylol-Ersatz	2,00 min
2.	Roti-Histol	Xylol-Ersatz	2,00 min
3.	2-Propanol	Isopropanol	2,00 min
4.	2-Propanol	Isopropanol	2,00 min
5.	Alkohol 96 %	Ethanol 96 %	2,00 min
6.	Alkohol 96 %	Ethanol 96 %	2,00 min
7.	Alkohol 70 %	Ethanol 96 % + Aqua dest.	0,30 min
8.	Kardasewitsch	5 % Ammoniaklösung	4,00 min
9.	Aqua dest.		4,00 min
10.	Aqua dest.		2,00 min
11.	Hämatoxylin		4,00 min
12.	HCl-Alkohol		0,01 min
13.	Wasser	Leitungswasser	5,00 min
14.	Eosin		1,30 min
15.	Alkohol 96 %	Ethanol 96%	1,00 min
16.	Alkohol 96 %	Ethanol 96 %	0,30 min
17.	Alkohol 96 %	Ethanol 96 %	0,30 min
18.	2-Propanol	Isopropanol	0,30 min
19.	2-Propanol	Isopropanol	0,30 min
20.	Xylol Isomere		0,30 min
21.	Xylol Isomere		0,30 min
22.	Xylol Isomere		0,30 min

## 2.5 Ussing-Kammer:

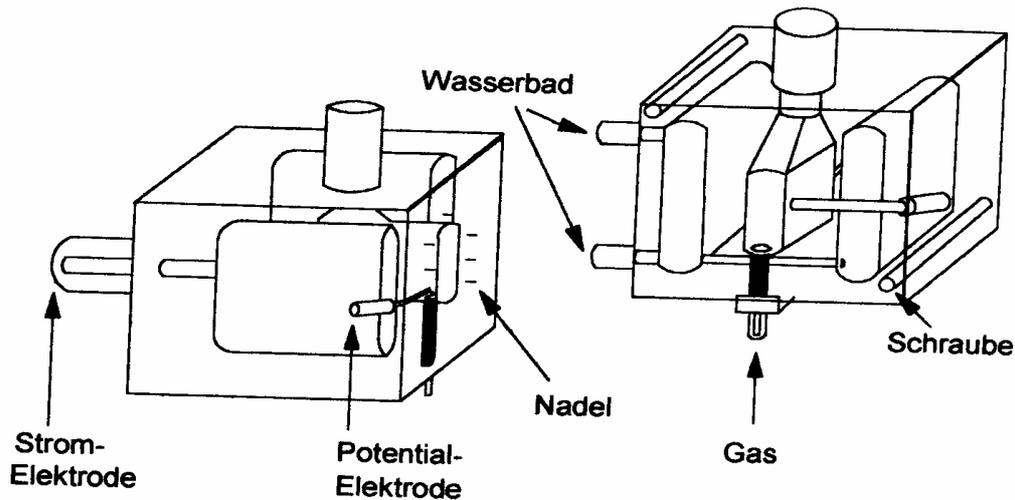
Die Ussing-Kammer Technik ist eine Methode zur Messung des Nettoladungstransportes von Ionen durch polarisiertes Gewebe. Dadurch hat man die Möglichkeit Ladungsverschiebungen elektronisch zu erfassen.

Um die elektrischen Messungen durchzuführen, werden die Ussing-Kammern an eine computerkontrollierte Voltage-Clamp-Anlage angeschlossen (Firma Mußler, Ingenieurbüro für Mess- und Datentechnik; Aachen).

### 2. 5.1 *Aufbau:*

Die Versuche wurden mit Hilfe einer modifizierten Ussing-Kammer (siehe Abbildung 3) durchgeführt, die aus zwei Plexiglasquadern besteht. Das Mucosa-Submucosa-Präparat wird auf eine Kammerhälfte gelegt oder zwischen Nadelspitzen (je nach Kammer 6-7 Stück) aufgespannt. Die Kammerhälften werden durch Plastikschrauben miteinander verbunden. Zuvor wurden die Kontakthälften zum Abdichten und zur Reduktion von Geweberandschäden (edge damage) mit Silikon (Baysilone-Paste® mittelviskös, Bayer AG, Leverkusen) bestrichen.

Zwischen beiden Kammern verbleibt eine freie Gewebefläche von 1 cm<sup>2</sup> mit beidseitigem Kontakt zur Pufferlösung. Das Flüssigkeitsvolumen beträgt auf beiden Seiten des Gewebes je 3,5 ml. An der Oberseite jeder Hälfte der Ussing-Kammer befinden sich Öffnungen, durch welche Substanzen zugegeben sowie die Pufferlösungen ausgetauscht werden können. Ebenfalls kann das zur Begasung notwendige Carbogen durch diese Öffnungen entweichen. An der Unterseite besitzt die Kammer zwei Fritten für die kontinuierliche Begasung der Elektrolytlösung mit Carbogen (5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub> v/v). Dies hält den pH Wert konstant und gewährleistet die Sauerstoffversorgung des Gewebes. Um die Temperatur in der Kammer konstant zu halten (38°C), besteht in der Kammer ein Durchfluss-System mit Anschluss an einen Warmwasserkreislauf ohne Verbindung zum Lösungsreservoir.



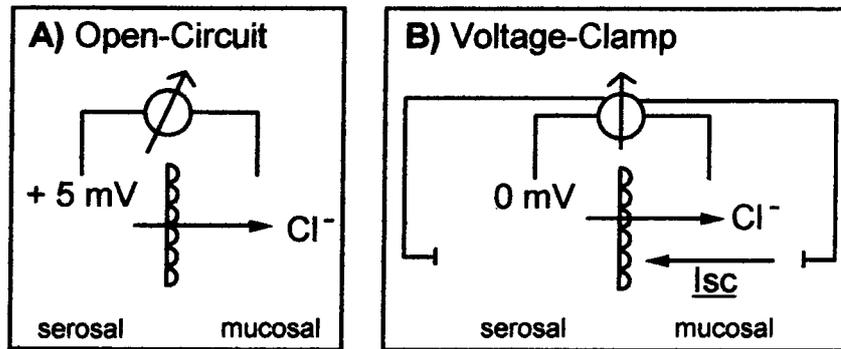
**A) linke Kammerhälfte Frontalansicht,**  
**seitlich sind die Nadeln zu sehen,**  
**auf die das Gewebe aufgespannt wird**

**B) rechte Kammerhälfte**

**Abbildung 3:** Schematischer Bau einer Ussing-Kammer, Details siehe Text

Um die elektrischen Parameter (Potentialdifferenz, Leitfähigkeit) bestimmen zu können, befinden sich an beiden Hälften der Ussing Kammer je eine gewebeferne Elektrode zur Stromapplikation und eine gewebe-nahe Elektrode zur Potentialdifferenzmessung ( $P_D$ ) (siehe Abbildung 3). Verwendet wurden in beiden Fällen Silber-Silberchlorid Elektroden. Um keinen direkten Kontakt zwischen Elektroden und Pufferlösung zu erhalten, wurden Agarbrücken zwischen Badlösung und Elektroden platziert. Die Verbindung zwischen Elektroden und Agarbrücke erfolgt durch das Eintauchen von beiden in eine 3 M KCl Lösung. Damit der Agar leitfähig war, wurden 6g des 3%igen Agars der Firma Merck® KGaA, Darmstadt, Germany, in 150 ml der Lösung 1 gelöst und eine Stunde lang gekocht. Dies diente dazu die Agartrockensubstanz mit der Lösung 1 zu vermischen und eine gießbare Masse zu erhalten. Die Leitfähigkeit wurde durch die in Lösung 1 enthaltenen Elektrolyte erreicht. Diese Agarbrücken wurden für jeden Versuchstag neu hergestellt.

## 2. 5.2 Elektrische Messungen:



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Messprinzips der Ussing-Kammer, **A:** Open circuit Bedingungen: das Gewebe baut durch spontane Cl<sup>-</sup> Sekretion eine Potentialdifferenz auf. **B:** Voltage Clamp Bedingungen: Um den elektrischen Gradienten, der durch die spontane Cl<sup>-</sup> Sekretion entsteht auszuschließen, wird ein Kurzschlussstrom (I<sub>SC</sub>) appliziert (Erklärung siehe Text).

Das zwischen den Kammerhälften eingespannte Kolon sezerniert spontan Anionen, woraus ein Spannungsaufbau zwischen der mucosalen und serosalen Gewebeseite resultiert (siehe Abbildung 4 A), was durch die P<sub>D</sub> Elektroden direkt gemessen wird. Auf den transepithelialen Ionenfluss wirken zwei Triebkräfte, die auf Konzentrationsunterschieden (= chemischer Gradient) oder auf Ionensekretion (= elektrischer Gradient) beruhen.

Um den elektrischen Gradienten als treibende Kraft für eine Ionenbewegung durch das Gewebe auszuschließen, wird die spontane Potentialdifferenz durch Applizieren eines sog. Kurzschlussstroms (I<sub>SC</sub>) über die Stromelektroden kompensiert, d.h. auf Null Volt „geklemmt“ (siehe Abbildung 4 B).

Die hierfür notwendige Applikation des I<sub>SC</sub> erfolgt über ein zweites Paar Silber-Silberchlorid-Elektroden, die ebenfalls durch Agarbrücken von den Kammern getrennt sind und zur gleichmäßig dichten Applikation gewebefern angebracht werden (siehe Abbildung 3).

Durch die Verwendung identischer Ionenkonzentrationen in der mucosalen und serosalen Elektrolytlösung sowie gleicher Lösungsvolumina auf beiden Seiten des Gewebes werden auch chemische und hydrostatische Gradienten ausgeschlossen.

So werden unter diesen Versuchsbedingungen mit der Technik der Ussing-Kammer nur die aus dem aktiven Ionentransport resultierenden Netto-Ströme gemessen. Ein aktiver Netto-

Kationentransport durch das Gewebe von mucosal nach serosal bzw. ein Netto-Anionentransport in umgekehrter Richtung wird als positiver  $I_{SC}$  angezeigt.

Bevor das Gewebe in die Ussing-Kammer eingespannt wird, geht eine Messperiode nur mit der Pufferlösung voraus. Dies dient der Ermittlung des Widerstandes der Lösung und der Potentialdifferenz zwischen beiden  $P_D$ -Elektroden. Die so erhaltenen Werte werden als „off set“ berücksichtigt und fließen bei der Berechnung des  $I_{SC}$  und  $G_T$  ein.

Nach Einspannen des Gewebes und zur Ermittlung des transepithelialen Gewebewiderstandes ( $R_T$ ) bzw. des Kehrwertes hiervon [bezeichnet als Gewebeleitfähigkeit ( $G_T$ )] wurde über die gewebefernen Agarbrücken alle 60 s ein bipolarer Strompuls von 50  $\mu A$  über eine Dauer von 200 ms auf das Gewebe appliziert. Aus der resultierenden kurzzeitigen Spannungsänderung ( $\Delta P_{DT}$ ) wurde anschließend nach dem Ohmschen Gesetz der Gewebewiderstand ( $R_T$ ) bzw. die Gewebeleitfähigkeit ( $G_T$ ) berechnet:

(U = Spannung; I = Strom; G = Leitfähigkeit; T = Transepithelial)

$$\text{Formel 1: } R_T = \Delta P_{DT} / \Delta I$$

$$\text{Formel 2: } G_T = 1 / R_T$$

$$\text{Formel 3: } G = \Delta I / \Delta U$$

Der Lösungswiderstand zwischen den Agarbrücken wurde automatisch kompensiert (siehe „off set“).  $I_{SC}$ ,  $P_D$  und  $G_T$  wurden kontinuierlich alle sechs Sekunden aufgezeichnet und jede Minute ausgedruckt. Für die graphische Darstellung werden die sechs-Sekunden Werte in ein Tabellen Kalkulationsprogramm (Lotus, 1-2-3) exportiert.

## 2.6 Die Technik der Basolateralen Depolarisation:

In einem Teil der durchgeführten Versuche wurde die Technik der basolateralen Depolarisation (FUCHS et al., 1977) angewendet. Hierbei wird die  $Na^+$  Konzentration der serosalen Badlösung isoosmolar durch  $K^+$  Ionen ersetzt. Da in der basolateralen Membran  $K^+$  Kanäle dominieren, verhält sich diese Seite wie eine  $K^+$  selektive Elektrode. Schaltet man nun den chemischen Gradienten über dieser Membranseite aus, indem man extrazellulär die  $K^+$  Konzentration soweit erhöht bis sie etwa der intrazellulären  $K^+$  Konzentration entspricht, depolarisiert die Zelle. Es kommt zur Öffnung aller  $K^+$  Kanäle, wodurch der basolaterale Widerstand aufgehoben wird. Daraus resultiert, dass sowohl der chemische als auch der

elektrische Gradient auf dieser Seite der Zelle ausgeschaltet wird. Durch Anlegen eines chemischen Gradienten von serosal nach mucosal beispielsweise für  $\text{Cl}^-$  oder  $\text{K}^+$  kann dann die Regulation apikaler  $\text{Cl}^-$  oder  $\text{K}^+$  Kanäle durch Sekretagoga untersucht werden.

## 2.7 Chemikalien:

**Tabelle 7:** Eingesetzte Substanzen und deren Lösungsmittel

<b>Substanz</b>	<b>Lösungsmittel</b>
Carbachol	Aqua destillata
TpeA (Tetrapentylammonium)	Aqua destillata
SITS 4-Acetamido-4'- isothiocyanato-stilbene-2,2'- disulfonic acid sodium salt	Lösung Nr.1
Indomethacin	Ethanol
Glibenclamid	Dimethylsulfoxid (DMSO)
DIDS (4,4'-Diisothiocyanato- Stilbene-2,2'-Disulfonic Acid)	Dimethylsulfoxid (DMSO)
TTX (Tetrodotoxin)	$\text{H}_2\text{O}$ + 20 mM Zitronensäure

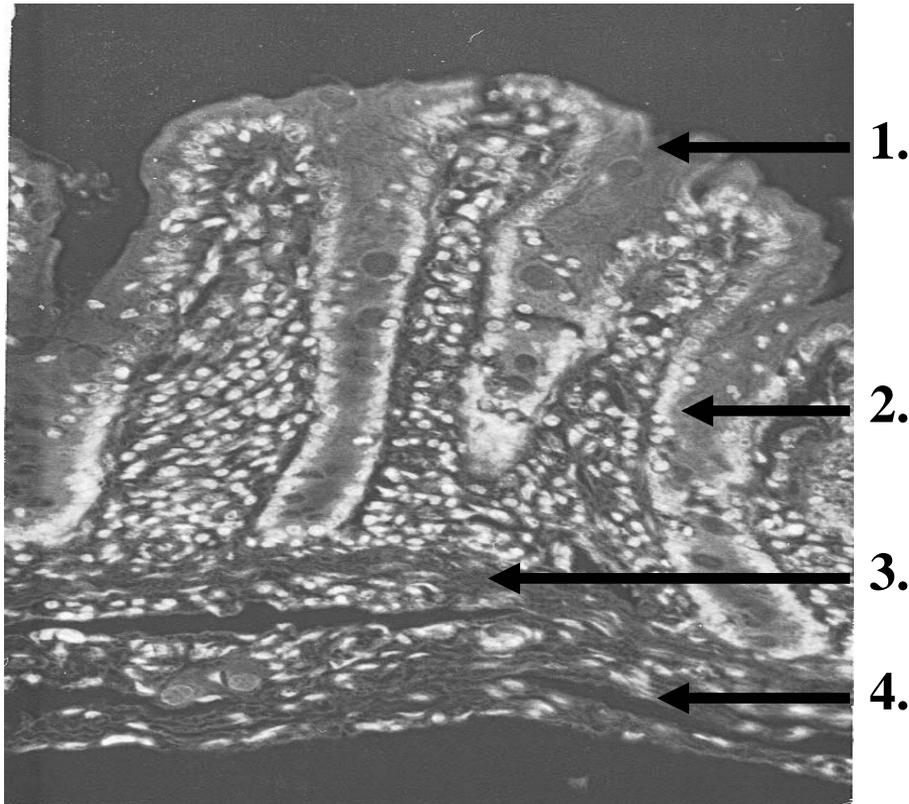
Die Chemikalien der Tabelle 1 wurden mit Ausnahme von Glibenclamid und SITS von der Firma Sigma® (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) bezogen. Glibenclamid wurde von ICN Biomedicals Inc., 1263 South Chillicothe Road; Aurora; Ohio 44202 und SITS von Calbiochem-Novabiochem Corporation / La Jolla, CA 92039 bezogen.

## 2.8 Auswertung:

Alle Versuchsergebnisse wurden als Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean = SEM) angegeben. Statistische Vergleiche wurden zwischen den Versuchsgruppen und der entsprechenden Kontrollgruppe mit paarigem oder unpaarigem Student t-Test durchgeführt oder, falls der F-Test signifikante Abweichungen ergab, mit dem Mann Whitney U-Test. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Als Peak wurde ein höchster Wert innerhalb von fünf Minuten nach der Zugabe von Carbachol und als 10 Minuten Wert wurde ein höchster Wert 10 Minuten nach der Zugabe von Carbachol ermittelt. Die n- Zahlen beziehen sich auf die Anzahl der verwendeten Epithelien. Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm Stat Most der Firma Dat@xion Statistical Analysis + Graphics durchgeführt. In manchen Versuchen konnte kein konstanter basaler  $I_{SC}$  gemessen werden. Hier wurden Regressionsgeraden zur Berechnung der  $I_{SC}$  Änderung verwendet. Hierzu wurde der  $I_{SC}$  -Verlauf 3 Minuten (30 Werte) vor Zugabe einer Substanz zur Berechnung der Regressionsgerade verwendet. Mit Hilfe der dabei erhaltenen Werte wurde der weitere theoretisch zu erwartende  $I_{SC}$  berechnet und von dieser theoretischen Geraden die tatsächlich gemessenen  $I_{SC}$  -Werte abgezogen. Die Qualität der Regressionsgerade wurde anhand des linearen Korrelationskoeffizienten „r“ getestet, der bei den verwendeten Geraden  $>0,85$  war.

### 3. Ergebnisse

Vor Beginn der Versuche wurde zur Evaluation des Gewebes an einem Mucosa-Submucosa Präparat eine histologische Untersuchung durchgeführt. Wie aus Abbildung 5 zu erkennen ist, ließen sich an diesem Präparat keine Hinweise, die auf einen nekrotischen Zelluntergang hindeuten, finden.



**Abbildung 5:** HE Färbung eines Mucosa-Submucosa Präparates eines Pferdekolons

1. Epithelium mucosae; 2. Glandula intestinales (Lieberkühn-Drüse) mit Becherzellen;
3. Lamina propria mucosae; 4. Lamina muscularis mucosae

#### 3.1 Die basale Wirkung von Carbachol auf den Kurzschlussstrom

Bei der Entstehung von sekretorischen Diarrhoen spielt die  $\text{Cl}^-$  Sekretion eine zentrale Rolle, die auch durch einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration induziert werden kann. In einer ersten Versuchsreihe wurde die Stimulation einer  $\text{Cl}^-$  Leitfähigkeit am Pferdedarm durch Carbachol, ein carbamyliertes Analog des Acetylcholins, untersucht.

Der bisher bekannte Weg (Ratte und andere Nager), über den Carbachol eine  $\text{Cl}^-$  Sekretion bewirken kann, geschieht indirekt mittels  $\text{Ca}^{2+}$  (SCHULTHEISS und DIENER, 1997). Nachdem das Acetylcholin Analogon an muskarinergen Rezeptoren des Subtyps  $\text{M}_3$  gebunden hat, (LINDQUIST et al., 1998) wird über ein G-Protein eine Phospholipase C aktiviert. Hierdurch steigt intrazellulär die Inositol-1,4,5-Trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) Konzentration (TAYLOR und BROAD, 1998), woraufhin intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Speicher entleert werden und zusätzlich ein  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom von außen stimuliert wird (FRINGS et al., 1999). Aus diesen Gründen steigt durch Carbachol die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration an (DIENER et al., 1991).

Ein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration führt zur Öffnung von basolateralen und in geringem Umfang auch apikalen  $\text{K}^+$  Kanälen (BINDER und SANDLE, 1994; SCHULTHEISS und DIENER, 2003). Dadurch wird das Membranpotential an das Gleichgewichtspotential der  $\text{K}^+$  Ionen angenähert und die Zellmembran hyperpolarisiert. Dies hat zur Folge, dass sich die Triebkraft für die negativ geladenen  $\text{Cl}^-$  Ionen zum Verlassen der Zelle erhöht (BÖHME et al., 1991; STRABEL und DIENER, 1995; BLEICH et al., 1996). Bei Anwesenheit spontan offener  $\text{Cl}^-$  Kanäle in der apikalen Membran bewirkt Carbachol beim Nager somit eine indirekte  $\text{Cl}^-$  Sekretion ins Darmlumen, wobei Wasser aus osmotischen Gründen folgt.

### 3.1.1 *Carbachol induziert eine $\text{Cl}^-$ Sekretion*

Die Ergebnisdarstellung im Folgenden bezieht sich immer auf den basalen Ausgangsstrom.

Am Pferdedarm ist über die Wirkung von Carbachol nichts bekannt. Es wurden zunächst basale Versuche durchgeführt. Diese dienten als Grundlage mit denen die folgenden Versuche statistisch verglichen wurden.

Typisch für die Wirkung von Carbachol ist der schnelle Anstieg (Peak) und der, in eine 2. Phase übergehende, langsame Abfall des Kurzschlussstroms ( $I_{\text{SC}}$ ). Sowohl im ventralen als auch im dorsalen Kolonsegment wurde diese vom Nager her bekannte Änderung des  $I_{\text{SC}}$  durch Carbachol auch beim Pferd induziert, das heisst rascher Anstieg gefolgt von einem langsamen Abfall.

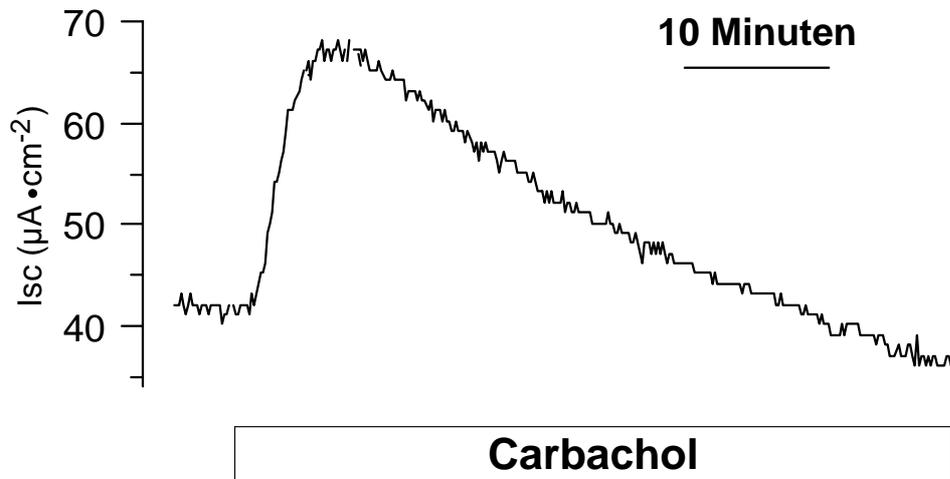
Carbachol wurde auf der serosalen Gewebeseite in einer Konzentration von  $5 \cdot 10^{-5}$  M zugegeben. Diese Konzentration sowie die Seite der Applikation gilt für alle Carbachol Zugaben sowohl im ventralen als auch im dorsalen Segment. Bei diesem Versuchsansatz konnte sowohl im ventralen (Peak:  $33 \pm 7 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ; 10 Minuten Wert:  $18 \pm 4 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ;

$p < 0,05$  gegenüber Ausgangssituation;  $n = 6$ ; siehe Beispiel in Abbildung 6 A) als auch im dorsalen Kolon (Peak:  $25 \pm 8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; 10 Minuten Wert:  $16 \pm 6 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $p < 0,05$  gegenüber Ausgangssituation;  $n = 6$ ; siehe Abbildung 6 B) eine signifikante  $I_{\text{SC}}$  Zunahme beobachtet werden. Zwischen den Segmenten gab es dabei keinen signifikanten Unterschied in der Höhe der beobachteten, durch Carbachol induzierten  $I_{\text{SC}}$  Änderungen.

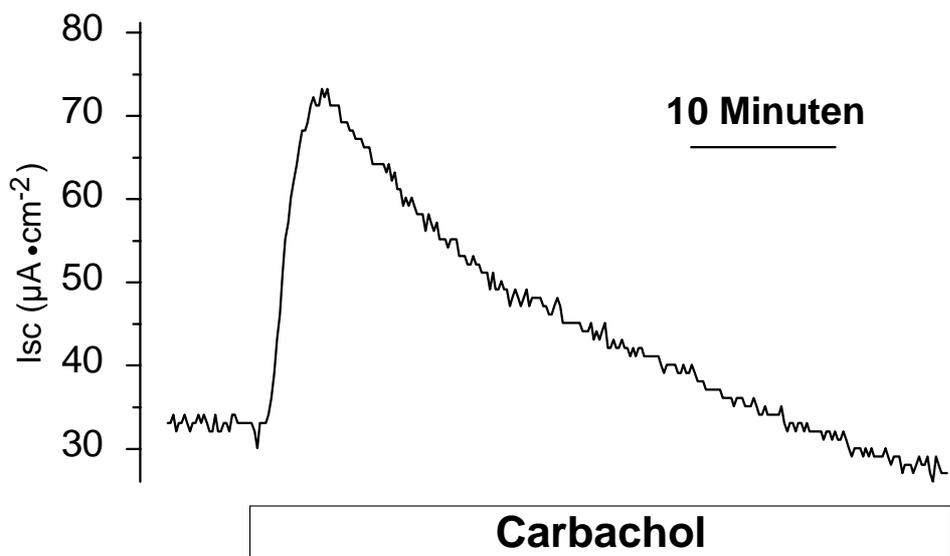
Um die Vermutung zu stützen, dass Carbachol auch am Darm des Pferdes eine  $\text{Cl}^-$  Sekretion bewirkt, wurden Versuche unter  $\text{Cl}^-$  freien Bedingungen durchgeführt. Unter  $\text{Cl}^-$  freien Bedingungen auf beiden Seiten des Epithels führte die Zugabe von Carbachol zu keiner signifikanten Veränderung des  $I_{\text{SC}}$ , weder an der ventralen noch an der dorsalen Kolonlage der rechten Seite. Im ventralen Segment induzierte Carbachol einen maximalen  $I_{\text{SC}}$  Anstieg von  $13 \pm 16 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  gegenüber der Ausgangssituation, der nach 10 Minuten nur noch um  $3 \pm 3 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  erhöht war ( $n = 7$ ). Im dorsalen Kolon stieg der  $I_{\text{SC}}$  auf  $6 \pm 1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  und war nach 10 Minuten nur noch um bei  $2 \pm 2 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  gegenüber der Ausgangssituation erhöht ( $n = 8$ ).

Dieser Versuch zeigt, dass durch Carbachol tatsächlich eine  $\text{Cl}^-$  Sekretion auslösbar ist.

### A Ventrale rechte Kolonlage



### B Dorsale rechte Kolonlage



**Abbildung 6 A und B:** Die basale Wirkung von Carbachol ( $5 \cdot 10^{-5}$  M) nach basolateraler Zugabe. Vergleichend dorsales und ventrales Kolon. Carbachol induziert die vom Nager her bekannte Änderung des  $I_{sc}$ , bestehend aus einer sehr raschen signifikanten Zunahme gefolgt von einem langsamen Abfall. (Beispielkurve von jeweils einem Gewebe;  $n = 6$  ventrales und  $n = 6$  dorsales Kolon, Statistik siehe Text).

## 3.2 Beteiligung des Nervensystems und subepithelialer Zellen an der Carbachol induzierten Cl<sup>-</sup> Sekretion

Wie in der Einleitung erwähnt (Kapitel 1.5.1, Seite 13), unterliegt die Ionensekretion des Epithels unter anderem der Kontrolle des enteralen Nervensystems und subepithelialer Zellen.

### 3.2.1 Beteiligung von Neuronen

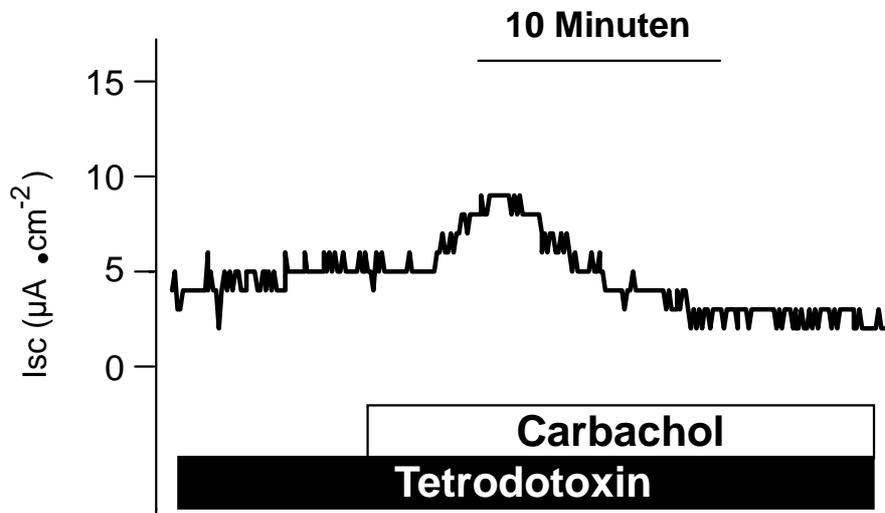
Um eine Beteiligung neuronaler Zellen zu untersuchen wurden Versuche mit Tetrodotoxin durchgeführt. Hierbei handelt es sich um das hoch wirksame Gift des japanischen Kugelfisches, welches in seinen Ovarien und anderen Organen vorhanden ist (STARKE und PALM, 1996). Tetrodotoxin blockiert spannungsabhängige Na<sup>+</sup> Kanäle auf Nervenzellen, deren Funktion die Weiterleitung von Aktionspotentialen ist (CATTERALL, 1995). Auf diesem Wege hemmt dieses Neurotoxin die Aktivität sekreto-motorischer Neurone z.B. des Plexus submucosus (ANDRES et al., 1985). Somit ist in Anwesenheit von Tetrodotoxin Carbachol nicht mehr in der Lage, eine Sekretion von Neurotransmittern auszulösen.

Unter basalen Bedingungen führt die Zugabe von Tetrodotoxin (10<sup>-6</sup> M serosal) zu keiner signifikanten Änderung des I<sub>SC</sub> (ventrales Kolon: 2 ± 1 μA·cm<sup>-2</sup>, n = 6; dorsales Kolon : 2 ± 1 μA·cm<sup>-2</sup>, n = 7).

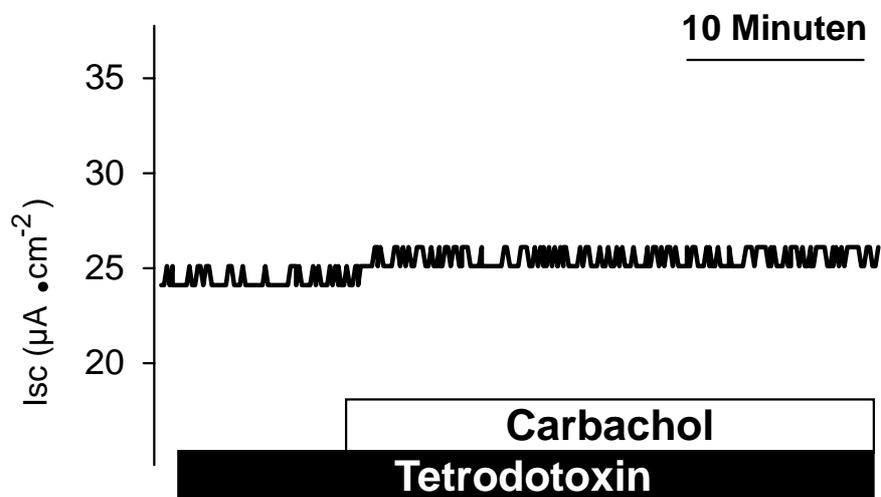
Trotz einer Vorbehandlung des Gewebes mit Tetrodotoxin konnte im ventralen Kolon ein Anstieg des Carbachol induzierten Kurzschlussstromes festgestellt werden, welcher aber im Vergleich zum nicht vorbehandelten Gewebe deutlich geringer ausfiel. In Anwesenheit von Tetrodotoxin führte die Zugabe von Carbachol zu einer maximalen I<sub>SC</sub> Änderung von 3 ± 2 μA·cm<sup>-2</sup> (p < 0,05; n = 6, siehe Abbildung 7 A), welche 10 Minuten später nicht mehr signifikant zum Ausgangsstrom erhöht war (1 ± 1 μA·cm<sup>-2</sup>). Diese Werte waren signifikant niedriger im Vergleich zu der nicht mit Tetrodotoxin behandelten Gruppe. Zum Vergleich noch einmal deren Werte: Carbachol induziert einen maximalen I<sub>SC</sub> von 33 ± 7 μA·cm<sup>-2</sup> (p < 0,05; n = 6), der 10 Minuten nach der Zugabe noch um 18 ± 4 μA·cm<sup>-2</sup> (p < 0,05; n = 6) gegenüber der Ausgangssituation erhöht war.

Im dorsalen Segment wurde die Carbachol induzierte Cl<sup>-</sup> Sekretion durch Tetrodotoxin ebenfalls deutlich gehemmt. Die Zugabe von Carbachol induzierte noch eine maximale I<sub>SC</sub> Änderung von 3 ± 0 μA·cm<sup>-2</sup>, die 10 Minuten nach der Zugabe nur noch um 1 ± 0 μA·cm<sup>-2</sup> erhöht war (p < 0,05; n = 7, siehe Abbildung 7 B).

### A Ventrale rechte Kolonlage



### B Dorsale rechte Kolonlage



**Abbildung 7 A und B:** Die Wirkung von Carbachol. Vergleichend ventrales (Abbildung A) und dorsales (Abbildung B) Kolon nach basolateraler Vorbehandlung mit Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  M). Man kann in beiden Abbildungen den deutlich geringeren Anstieg des  $I_{sc}$  im Vergleich zu basalen Bedingungen (siehe vergleichend Abbildung 6) erkennen. (Beispielkurve für jeweils ein Gewebe;  $n = 6$  ventrales und  $n = 7$  dorsales Kolon; Statistik siehe Text).

Bei den nicht mit Tetrodotoxin vorbehandelten Kontrollgeweben (siehe Kapitel 3.1.1., Seite 30) konnte im dorsalen Segment ein Peak von  $25 \pm 1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  und 10 Minuten nach Zugabe ein  $I_{\text{SC}}$  Wert von  $16 \pm 6 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) beobachtet werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das enterale Nervensystem an der Carbachol induzierten  $I_{\text{SC}}$  - Änderung beteiligt ist.

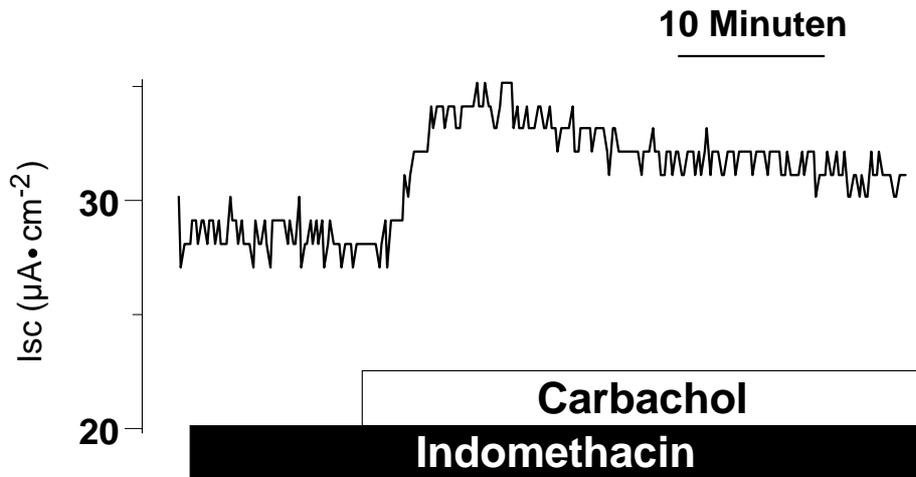
### 3. 2.2 *Beteiligung Prostaglandin produzierender subepithelialer Zellen*

Als nächstes wurde die Beteiligung von Prostaglandinen an der Carbachol induzierten  $I_{\text{SC}}$  - Änderung untersucht. Über die basale Prostaglandinproduktion subepithelialer Zellen (CRAVEN und DE RUBERTIS, 1984) werden apikale  $\text{Cl}^-$  Kanäle offen gehalten (STRABEL und DIENER, 1995). Zudem ist Carbachol in der Lage die Freisetzung von Prostaglandinen am Rattenkolon zu induzieren (CRAVEN und DE RUBERTIS, 1981).

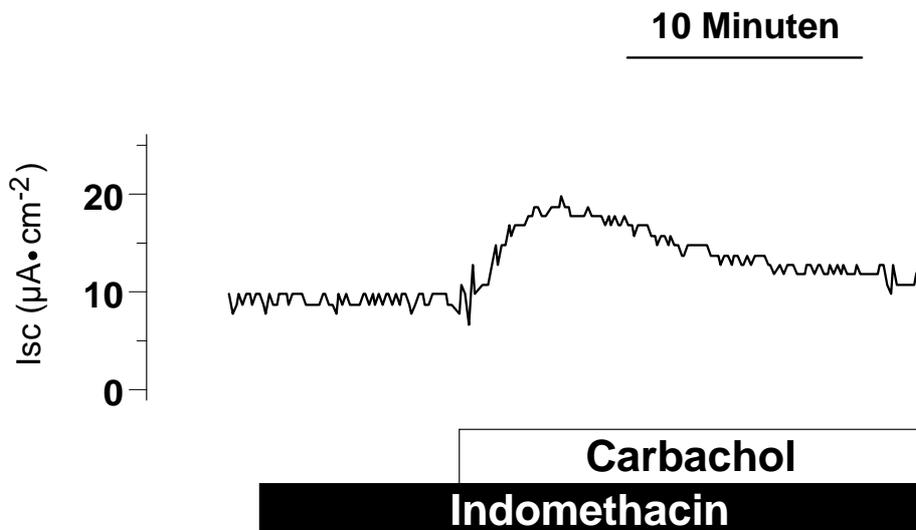
Unter basalen Bedingungen führte die Zugabe von Indomethacin, einem Cyclooxygenasehemmer (CURTIS-PRIOR, 1976), in den beiden Kolonsegmenten zu unterschiedlichen Reaktionen. Während es im rechten ventralen Kolon durch Indomethacin ( $10^{-6}$  M, serosal) zu einem signifikanten  $I_{\text{SC}}$  Abfall um  $-2 \pm 1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ) kam, stieg der  $I_{\text{SC}}$  im rechten dorsalen Segment signifikant um  $2 \pm 1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  an ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ).

Es zeigte sich in beiden Segmenten trotz Vorbehandlung mit Indomethacin ein signifikanter Anstieg des Kurzschlussstroms infolge der Carbachol Zugabe. Dieser ist im ventralen Kolon zwar deutlich niedriger als im Vergleich zur Kontrolle ohne Indomethacin, dennoch sind sowohl der Peak als auch der 10 Minuten Wert des Carbachol induzierten  $I_{\text{SC}}$  signifikant erhöht, wie in Abbildung 8 zu sehen ist.

## A Ventrale rechte Kolonlage



## B Dorsale rechte Kolonlage



**Abbildung 8 A und B:** Die Wirkung von Carbachol auf den  $I_{SC}$  in Anwesenheit von Indomethacin ( $10^{-6}$  M). Vergleichend ventrales und dorsales Kolon. Sowohl im ventralen (A) als auch im dorsalen (B) Kolon lässt sich ein Anstieg des  $I_{SC}$  beobachten, welcher aber deutlich geringer ist im Vergleich zu einer fehlenden Vorbehandlung mit Indomethacin. 10 Minuten nach Zugabe war der  $I_{SC}$  noch signifikant zur Ausgangssituation erhöht (Beispielkurve für jeweils ein Gewebe;  $n = 5$  ventrales und  $n = 7$  dorsales Kolon, Statistik siehe Text).

Im ventralen Segment konnte nach der Zugabe von Indomethacin durch Carbachol ein  $I_{SC}$  Peak von  $7 \pm 1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  induziert werden, welcher nach 10 Minuten auf  $5 \pm 1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  gesunken war ( $p < 0,05$  gegenüber Ausgangssituation;  $n = 5$ , siehe Abbildung 8 A). Bei den ohne Indomethacin vorbehandelten Kontrollgeweben (siehe Kapitel 3.1.1, Seite 30) konnte ventral ein maximaler  $I_{SC}$  von  $33 \pm 7 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  und nach 10 Minuten von  $18 \pm 4 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  aufgezeichnet werden ( $n = 6$ ). Im dorsalen Segment wurde ebenfalls ein maximaler  $I_{SC}$  Wert von  $7 \pm 1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  und 10 Minuten nach der Zugabe ein  $I_{SC}$  von  $4 \pm 1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  aufgezeichnet ( $p < 0,05$  gegenüber Ausgangssituation,  $n = 7$ , siehe Abbildung 8 B).

Bei der Kontrolle im dorsalen Segment (siehe Kapitel 3.1.1, Seite 30) stieg der zu messende  $I_{SC}$  auf maximal  $25 \pm 8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ , nach 10 Minuten konnten Werte von  $16 \pm 6 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  gemessen werden ( $p < 0,05$  gegenüber Ausgangssituation;  $n = 6$ ).

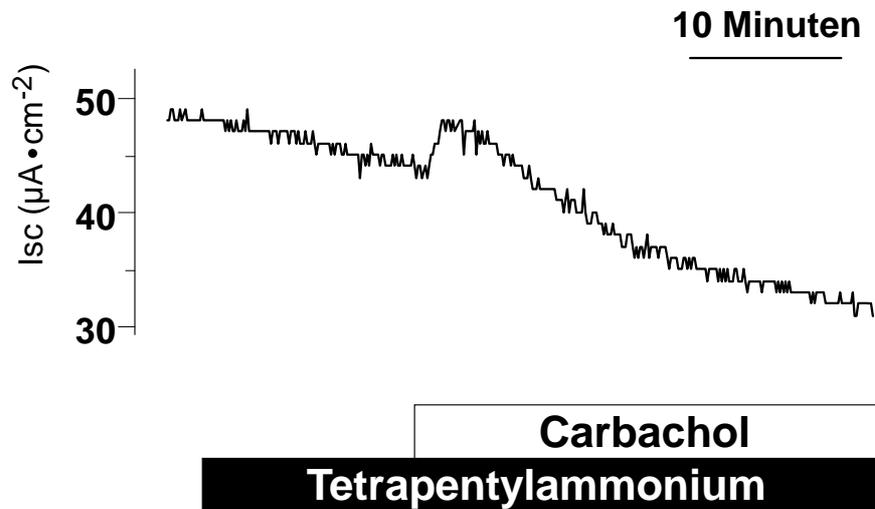
Bei den hier aufgeführten Versuchen mit dem Cyclooxygenaseblocker Indomethacin liess konnte in beiden untersuchten Kolonsegmenten eine signifikante Erhöhung des Carbachol induzierten Kurzschlussstroms beobachtet werden, welcher jedoch im Vergleich zur nicht vorbehandelten Kontrollgruppe deutlich niedriger war.

### **3.3 Wirkung von Carbachol auf $\text{K}^+$ oder $\text{Cl}^-$ Kanäle an der Carbachol induzierten $\text{Cl}^-$ Sekretion**

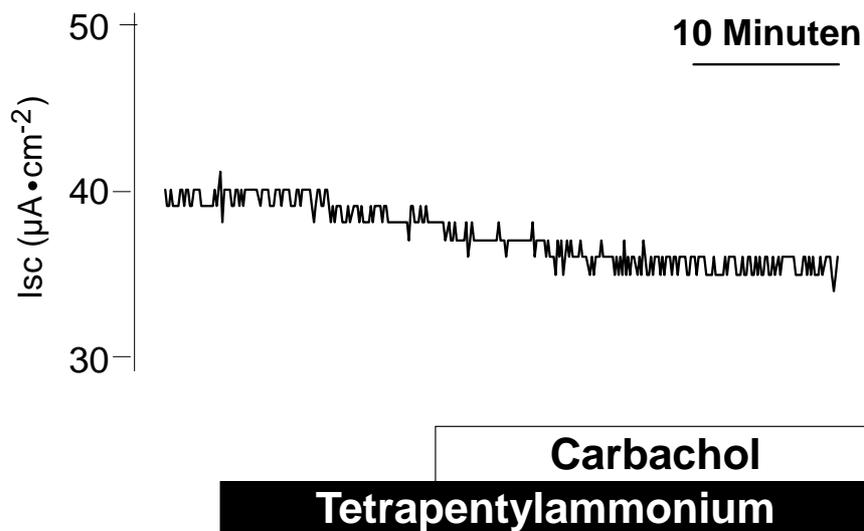
Wie bereits in der Einleitung erwähnt (Kapitel 1.3.2, Seite 7) gibt es indirekte und direkte Möglichkeiten eine  $\text{Cl}^-$  Sekretion zu induzieren. Die indirekte Möglichkeit besteht in einer Aktivierung von  $\text{K}^+$  Kanälen. Die folgende Versuchsreihe dient dazu, die Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierten  $\text{K}^+$  Kanälen an der Carbachol induzierten  $\text{Cl}^-$  Sekretion am Kolon des Pferdes zu untersuchen. Ein Blocker solcher  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen  $\text{K}^+$  Kanäle ist Tetrapentylammonium (QUAST und COOK, 1990).

Basal zeigte Tetrapentylammonium ( $10^{-4}$  M), zugegeben auf der mucosalen und serosalen Seite, keine signifikante Änderung des  $I_{SC}$  sowohl im ventralen ( $-1 \pm 1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,  $n = 8$ ) als auch im dorsalen Segment ( $3 \pm 2 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,  $n = 6$ ). In Anwesenheit von Tetrapentylammonium führte Carbachol nur noch zu einem kurzzeitigen  $I_{SC}$  -Anstieg. Im ventralen Kolon erhöht sich der  $I_{SC}$  um maximal  $4 \pm 1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $p < 0,05$  gegenüber Ausgangssituation;  $n = 8$ ), während der  $I_{SC}$  10 Minuten nach Zugabe mit  $0 \pm 1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  nicht mehr signifikant erhöht ist (siehe Abbildung 9 A).

## A Ventrale rechte Kolonlage



## B Dorsale rechte Kolonlage



**Abbildung 9 A und B:** Die Wirkung von Carbachol in Anwesenheit von Tetrabutylammonium ( $10^{-4}$  M auf beiden Seiten) auf den I<sub>sc</sub> im ventralen (A) und dorsalen (B) Kolon. Man sieht in Abbildung A einen geringgradigen Anstieg des I<sub>sc</sub> nach der Zugabe von Carbachol, während im dorsalen Segment (B) keine signifikante Carbachol induzierte I<sub>sc</sub>-Änderung in Anwesenheit des K<sup>+</sup> Kanalblockers Tetrabutylammonium zu erkennen ist. (Beispielkurve für jeweils ein Gewebe; n = 8 ventrales und n = 6 dorsales Kolon, Statistik siehe Text).

Im dorsalen Segment war Carbachol in Anwesenheit von Tetrapentylammonium nicht mehr in der Lage, eine signifikante Änderung des  $I_{SC}$  zu induzieren (Peak:  $2 \pm 1 \mu A \cdot cm^{-2}$ ; 10 Minuten Wert:  $0 \pm 0 \mu A \cdot cm^{-2}$ ,  $n = 6$ , siehe Abbildung 9 B). Die Ergebnisse mit Tetrapentylammonium zeigen, dass Carbachol indirekt eine  $Cl^{-}$  Sekretion durch Aktivierung von  $K^{+}$  Kanälen induzieren kann.

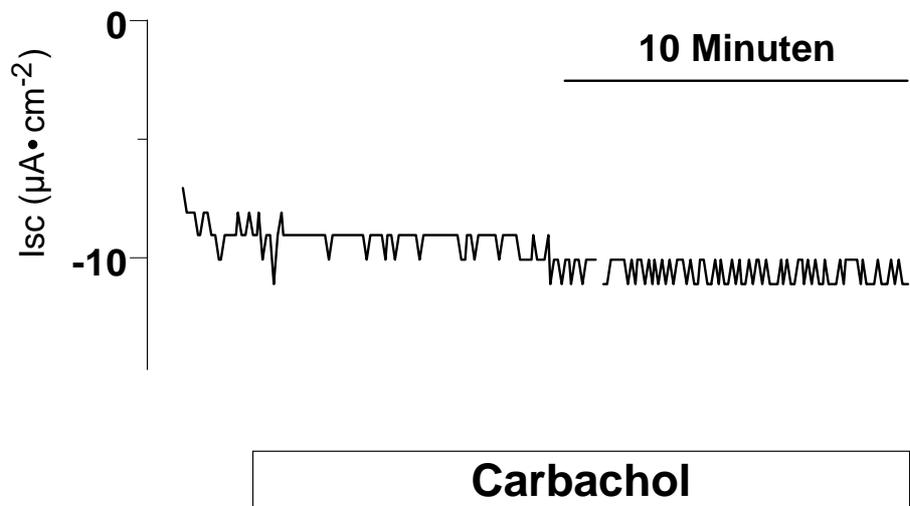
In den bisherigen Versuchsreihen wurde der Strom über das gesamte Epithel gemessen, also der Ionentransport sowohl über die basolaterale als auch über die apikale Membran. Um nun den Ionenstrom nur über die apikale Membran zu messen, wurde die basolaterale Seite durch das Protokoll der basolateralen Depolarisation (siehe Material und Methoden) ausgeschaltet. Somit kann man durch die zu messenden Änderungen im Kurzschlussstrom eine direkte Aussage über Änderungen von Leitfähigkeiten in der apikalen Membran treffen (FUCHS et al., 1977).

Im ersten Versuchsansatz wurde die Aktivierung apikaler  $K^{+}$  Kanäle untersucht. Hierzu wurde ein von serosal nach mucosal gerichteter  $K^{+}$  Gradient von 107 mM (serosal 111,5 mM KCl, Lösung Nr. 4; mucosal 107 mM NaCl + 4,5 mM KCl, Lösung Nr. 3) angelegt.

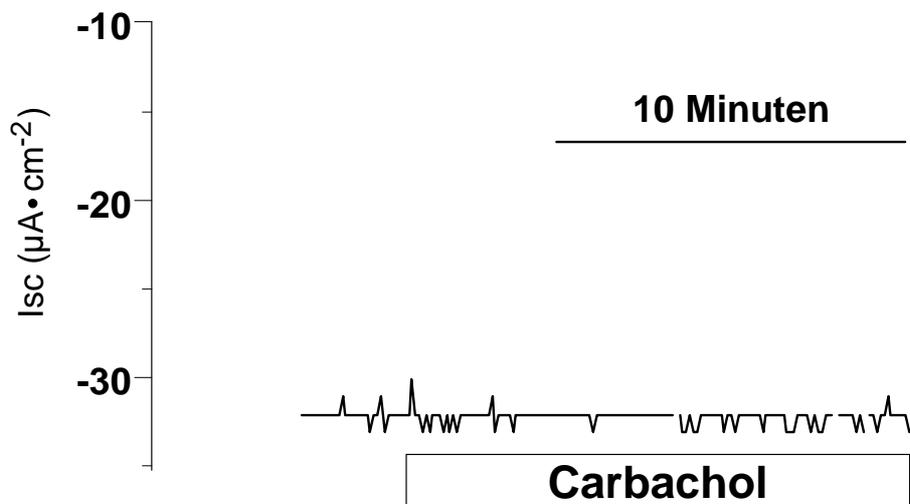
Unmittelbar nach dem Puffertausch konnte man einen massiven Abfall des  $I_{SC}$  auf Werte von  $-29 \pm 3 \mu A \cdot cm^{-2}$  im ventralen Segment und Werte von  $-24 \pm 3 \mu A \cdot cm^{-2}$  im dorsalen Segment beobachten, so dass größtenteils negative  $I_{SC}$  Werte vor Zugabe von Carbachol gemessen wurden.

Im Vergleich zum Nager konnten beim Pferd kaum Änderungen des  $I_{SC}$  durch die Carbachol Zugabe beobachtet werden. 10 Minuten nach der Zugabe waren die maximal zu messenden Werte im ventralen Segment bei  $-1 \pm 0 \mu A \cdot cm^{-2}$  ( $n = 8$ ) und im dorsalen bei  $1 \pm 1 \mu A \cdot cm^{-2}$  ( $n = 8$ ) (siehe Abbildung 10 A und B). Da keine  $I_{SC}$  Änderung nach der Carbachol Zugabe beobachtet werden konnte wurde für diesen Versuch keine Statistik erstellt.

## A ventrale rechte Kolonlage



## B Dorsale rechte Kolonlage



**Abbildung 10 A und B:** Wirkung von Carbachol nach basolateraler Depolarisation mit 111,5 mM KCl serosal und 107 mM NaCl + 4,5 mM KCl mucosal auf den  $I_{sc}$  im ventralen (A) und dorsalen (B) Kolon. Man sieht sowohl in Abbildung A als auch in Abbildung B nur minimale, zeitlich bedingte Änderungen im  $I_{sc}$  (Beispielkurve für jeweils ein Gewebe;  $n = 8$  ventrales und  $n = 8$  dorsales Kolon, Statistik siehe Text).

### 3.3.1 Charakterisierung der an der Cl<sup>-</sup> Sekretion beteiligten Cl<sup>-</sup> Kanäle

Um eine Beteiligung des CFTR Cl<sup>-</sup> Kanals an der Carbachol induzierten Cl<sup>-</sup> Sekretion zu untersuchen, wurde Glibenclamid, ein Sulfonylharnstoffderivat, welches (neben ATP sensitiven K<sup>+</sup> Kanälen) Cl<sup>-</sup> Kanäle vom CFTR-Typ hemmt (SCHULTZ et al., 1999), eingesetzt. Bei diesem Versuch wurde in der Kontrolle das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) zeitgleich zugesetzt, um einen Lösungsmittelleffekt auf den I<sub>SC</sub> zu kontrollieren.

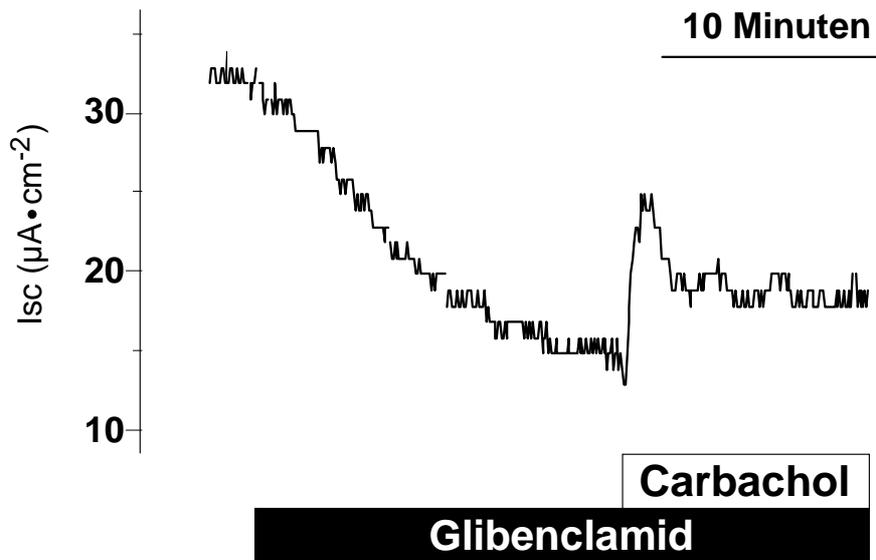
Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse des folgenden Versuches tabellarisch dargestellt (siehe auch die graphische Darstellung in den Abbildungen 11 A und B sowie 12 A und B).

**Tabelle 8:** Tabellarische Darstellung des Versuches Glibenclamid in Parsons Standard Lösung sowie der Kontrollen mit DMSO:

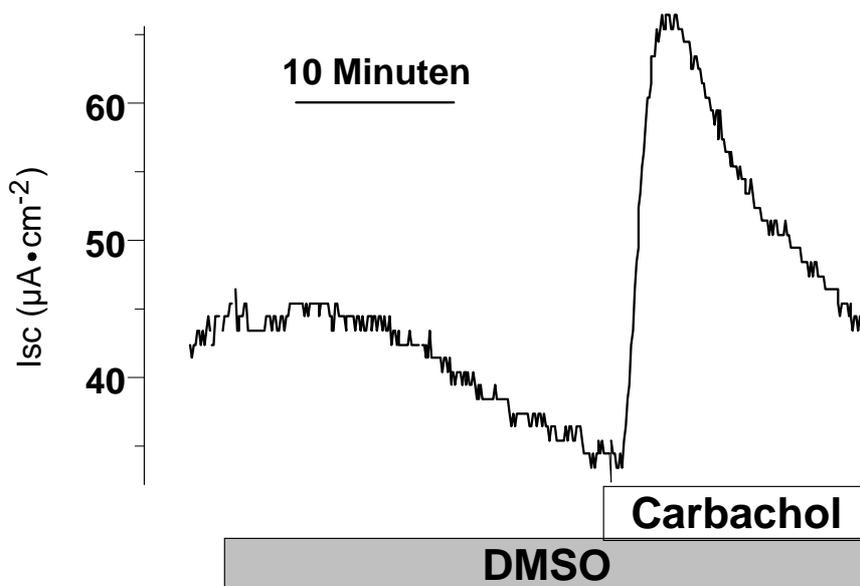
		<b>Glibenclamid</b> <b>μA·cm<sup>-2</sup></b>	<b>N</b>	<b>DMSO</b> <b>μA·cm<sup>-2</sup></b>	<b>n</b>
<b>ventral</b>	basal	-12 ± 2 *	5	-3 ± 2	5
	Carbachol I <sub>MAX</sub>	12 ± 2 *	5	20 ± 4 *	5
	Carbachol I 10 <sub>MIN</sub>	1 ± 1	5	18 ± 5 *	5
<b>dorsal</b>	basal	3 ± 3	7	-1 ± 1 #	7
	Carbachol I <sub>MAX</sub>	11 ± 3 *	7	12 ± 5 *	7
	Carbachol I 10 <sub>MIN</sub>	2 ± 2	7	6 ± 4	7

\* = p < 0,05 gegenüber Ausgangssituation; # < 0,05; Carbachol 5 · 10<sup>-5</sup> M serosal; Glibenclamid 5 · 10<sup>-4</sup> M mucosal; DMSO 10 μl mucosal; I<sub>MAX</sub> = ein einziger höchster I<sub>SC</sub> Wert innerhalb 5 Minuten nach Carbacholzugabe; I 10<sub>MIN</sub> = ein einziger I<sub>SC</sub> Wert zehn Minuten nach Carbacholzugabe, Angaben als Mittelwert ± SEM

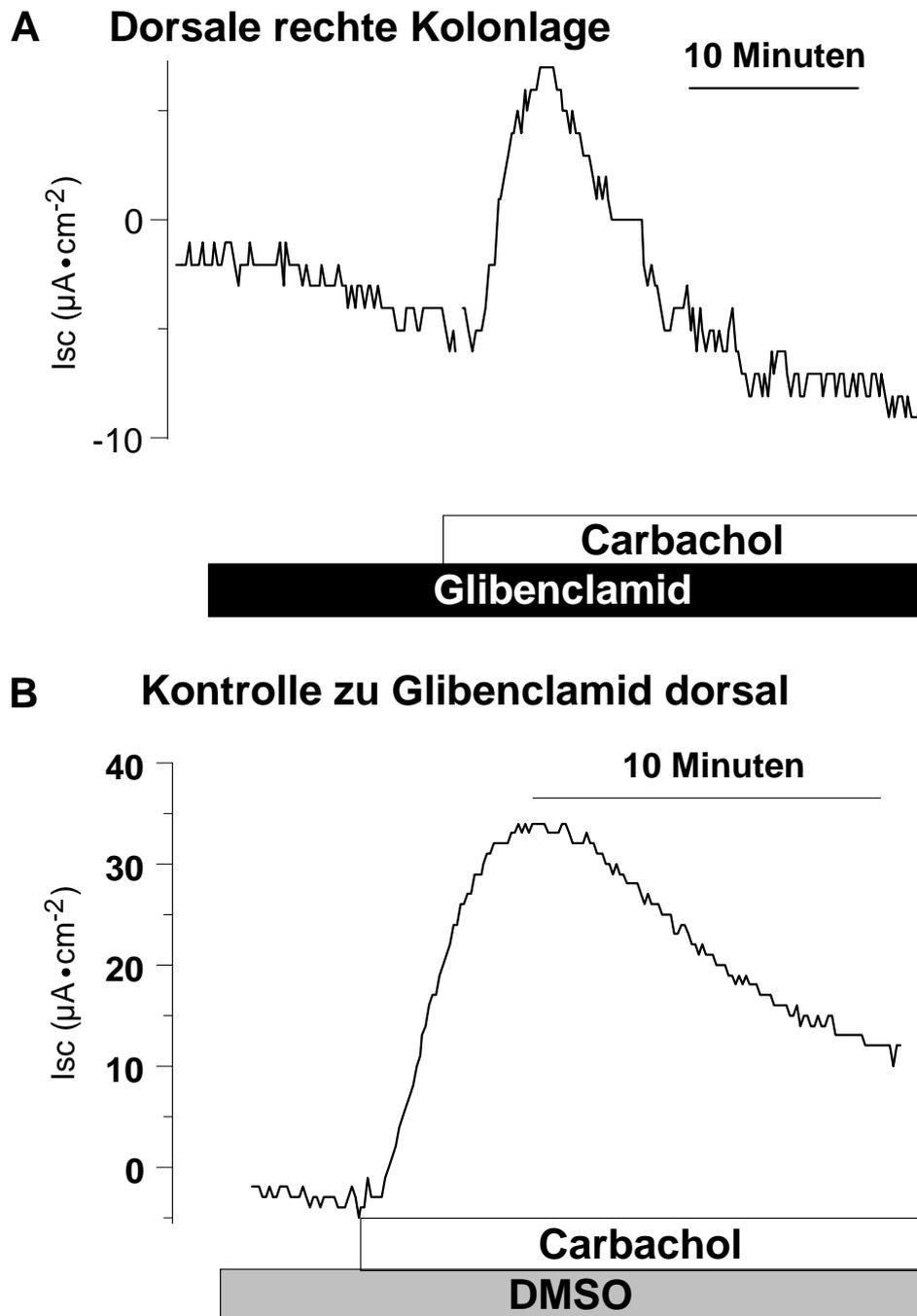
### A Ventrale rechte Kolonlage



### B Kontrolle zu Glibenclamid ventral



**Abbildung 11 A und B:** Die Wirkung von Carbachol auf das ventrale Kolon in An- und Abwesenheit des CFTR Cl<sup>-</sup> Kanal Blockers Glibenclamid in DMSO gelöst ( $5 \cdot 10^{-4}$  M auf der mucosalen Seite). **A:** Hemmung des basalen I<sub>SC</sub> durch Glibenclamid und nachfolgende I<sub>SC</sub> -Stimulierung durch Carbachol. Der I<sub>SC</sub> fällt beschleunigt ab (Beispielkurve für ein Gewebe; n = 5). **B:** Carbachol Effekt auf den I<sub>SC</sub> ohne Vorbehandlung mit Glibenclamid. Der I<sub>SC</sub> Abfall durch Zugabe des Lösungsmittels DMSO ist eine zeitlich bedingte I<sub>SC</sub> -Änderung. (Beispielkurve für ein Gewebe; n = 5, Statistik siehe Text).



**Abbildung 12 A und B:** Die Wirkung von Carbachol auf das dorsale Kolon in An- und Abwesenheit des CFTR  $\text{Cl}^-$  Kanal Blockers Glibenclamid ( $5\cdot 10^{-4}$  M auf der mucosalen Seite). **A:** Hemmung des basalen  $\text{I}_{\text{SC}}$  durch Glibenclamid und nachfolgende  $\text{I}_{\text{SC}}$  - Stimulierung durch Carbachol. (Beispielkurve für ein Gewebe;  $n = 7$ ). **B:** Carbachol Effekt auf den  $\text{I}_{\text{SC}}$  ohne Vorbehandlung mit Glibenclamid. (Beispielkurve für ein Gewebe;  $n = 7$ , Statistik siehe Text).

Anhand dieser Versuche kann man auf eine Beteiligung der CFTR Cl<sup>-</sup> Kanäle bei der Cl<sup>-</sup> Sekretion schließen, allerdings scheinen neben diesen noch andere Cl<sup>-</sup> Kanäle beteiligt zu sein.

### 3.4 Der Ca<sup>2+</sup> abhängige Cl<sup>-</sup> Kanal

An Epithelien existieren noch andere Typen von Cl<sup>-</sup> Kanälen, beispielsweise der Ca<sup>2+</sup> abhängige Cl<sup>-</sup> Kanal (ClCa). Im Gegensatz zum CFTR Cl<sup>-</sup> Kanal gibt es für diesen Kanaltyp noch keine spezifischen Blocker, es ist aber bekannt, dass sowohl DIDS als auch SITS diesen Kanal blockieren können.

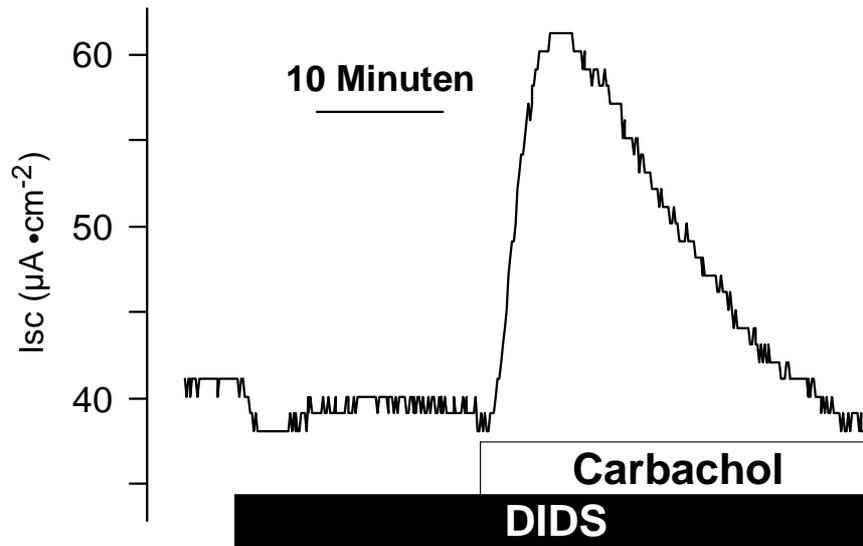
DIDS blockiert nicht nur den ClCa, sondern hemmt auch den Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Austausch (GRUBER et al., 1998). Da aber der Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Austauscher elektroneutral arbeitet, kann eine Wirkung von DIDS auf diesen Austauscher in den Ussing-Kammer Versuchen nicht gesehen werden. DIDS (10<sup>-3</sup> M auf der mucosalen Seite) wurde ebenso wie Glibenclamid in DMSO gelöst zugegeben. Daher wurde bei den Kontrollgeweben eine entsprechende DMSO Menge zugesetzt.

Bei diesen Versuchen kam es unter basalen Bedingungen zu keiner signifikanten Veränderung des I<sub>SC</sub>. Dies gilt sowohl für die Zugabe von DIDS als auch für die Zugabe von DMSO in beiden Kolonsegmenten (ventral DIDS: 2 ± 1 μA·cm<sup>-2</sup>; DMSO: -1 ± 1 μA·cm<sup>-2</sup>; dorsal DIDS 0 ± 2 μA·cm<sup>-2</sup>; DMSO: 0 ± 1 μA·cm<sup>-2</sup>, siehe Abbildung 13 A und B).

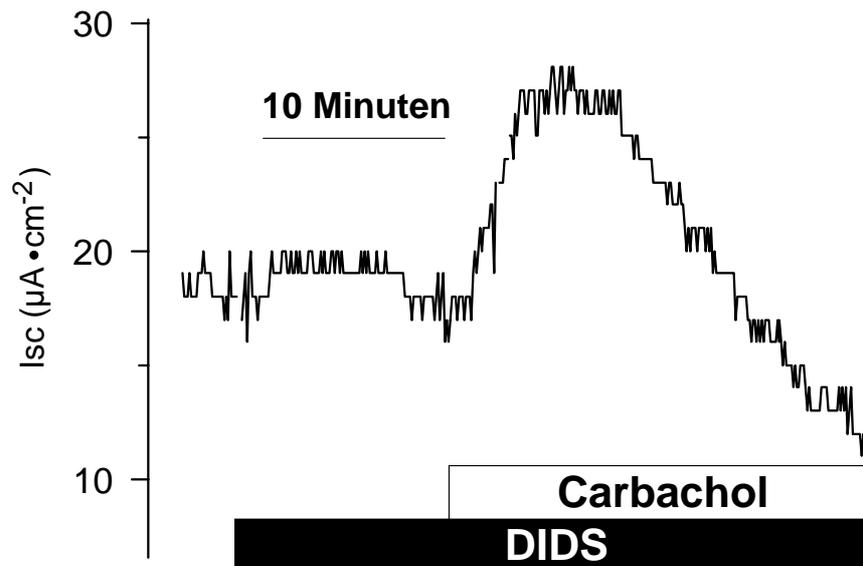
Bei den Versuchen ließ sich sowohl ventral als auch dorsal ein signifikanter Anstieg des I<sub>SC</sub> durch Zugabe von Carbachol beobachten. Im ventralen Kolon stieg der I<sub>SC</sub> maximal um 16 ± 2 μA·cm<sup>-2</sup> und sank innerhalb von 10 Minuten auf 11 ± 2 μA·cm<sup>-2</sup>; (p < 0,05 gegenüber Ausgangssituation; n = 6; siehe Abbildung 13 A). Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle mit DMSO. Hier stieg der I<sub>SC</sub> maximal um 18 ± 2 μA·cm<sup>-2</sup> und sank innerhalb von 10 Minuten auf 13 ± 2 μA·cm<sup>-2</sup>; (p < 0,05 gegenüber Ausgangssituation; n = 9).

Im dorsalen Kolonsegment stieg der I<sub>SC</sub> nach Zugabe von Carbachol auf Maximalwerte von 12 ± 4 μA·cm<sup>-2</sup>, nach 10 Minuten waren noch folgende I<sub>SC</sub> Werte messbar: 9 ± 4 μA·cm<sup>-2</sup>, (p < 0,05 gegenüber Ausgangssituation, n = 10; siehe Abbildung 15 B). Bei der Kontrolle mit dem Lösungsmittel im dorsalen Segment konnten maximale I<sub>SC</sub> Werte von 13 ± 5 μA·cm<sup>-2</sup> beobachtet werden sowie 10 Minuten Werte von 9 ± 4 μA·cm<sup>-2</sup> (p < 0,05 gegenüber Ausgangssituation, n = 11).

### A Ventrale rechte Kolonlage



### B Dorsale rechte Kolonlage



**Abbildung 13 A und B:** Die Wirkung von Carbachol in Anwesenheit von DIDS in DMSO gelöst ( $10^{-3}$  M) auf den  $I_{SC}$  im ventralen (A) und dorsalen (B) Kolon. Man sieht in Abbildung A und B den deutlichen Anstieg des  $I_{SC}$  nach basolateraler Zugabe von Carbachol (Beispielkurve für jeweils ein Gewebe;  $n = 6$  ventrales und  $n = 10$  dorsales Kolon, Statistik siehe Text).

Ein weiterer Blocker der  $ClCa$  ist SITS (NILIUS und DROOGMANS, 2001). Durch die Zugabe von SITS konnte am Kolon der Ratte eine inhibitorische Wirkung auf die  $Cl$

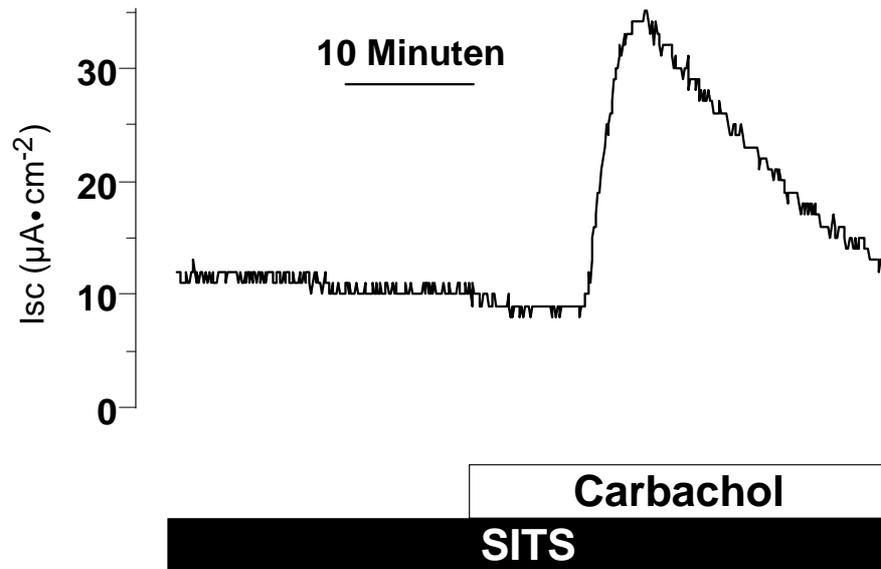
Leitfähigkeit beobachtet werden, welche durch die Zugabe von DIDS nicht vorhanden war (SCHULTHEISS, persönliche Mitteilung). Bei den beiden Substanzen DIDS und SITS handelt es sich um unspezifische Blocker der ClCa, deren Wirkpotenz unterschiedlich und gewebeabhängig ist. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse beider Substanzen am Kolon der Ratte wurden anschließend an die Versuchsreihe mit DIDS die folgenden Versuche durchgeführt.

SITS ist, ebenso wie DIDS, ein Inhibitor  $\text{Ca}^{2+}$  abhängiger  $\text{Cl}^-$  Kanäle sowie Hemmer des  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  Austauschers. Im Gegensatz zur Ratte und wie bei DIDS, zeigte sich am Pferdekolon keine signifikante Hemmung des zu messenden Kurzschlussstroms (Siehe Abbildung 14 A und B). Basal führte die Zugabe von SITS ( $10^{-3}$  M auf der mucosalen Seite) in beiden Segmenten zu keiner signifikanten Änderung im  $I_{\text{SC}}$  (ventral:  $-4 \pm 2 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ , dorsal  $-4 \pm 3 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Nach der Zugabe von Carbachol konnten trotz Anwesenheit von SITS im ventralen Kolon maximale  $I_{\text{SC}}$  Werte von  $23 \pm 3 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  gemessen werden. Nach 10 Minuten sanken die Werte auf  $14 \pm 2 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ , blieben aber im Vergleich zum Basalstrom immer noch signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ). Bei der nicht mit SITS vorbehandelten Kontrollgruppe induzierte Carbachol einen Peak  $I_{\text{SC}}$  von  $17 \pm 4 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ , der 10 Minuten nach der Zugabe noch um  $11 \pm 3 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $p < 0,05$  gegenüber Ausgangssituation;  $n = 5$ ) erhöht war.

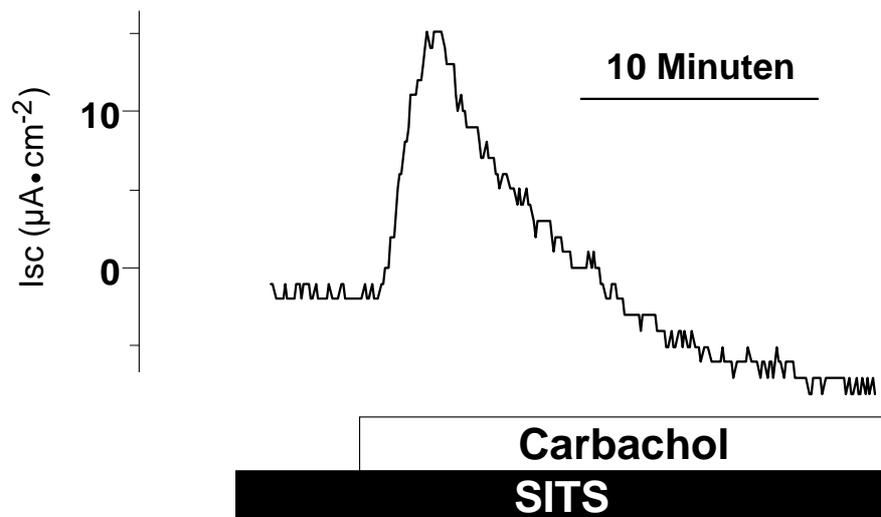
Im dorsalen Segment stieg der Carbachol induzierte  $I_{\text{SC}}$  in Anwesenheit von SITS auf maximal  $8 \pm 3 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $p < 0,05$  gegenüber Ausgangssituation;  $n = 7$ ) und sank nach 10 Minuten auf  $2 \pm 1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Auch hier konnten bei der Kontrollgruppe signifikante maximale  $I_{\text{SC}}$  Werte beobachtet werden  $15 \pm 3 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $p < 0,05$  gegenüber Ausgangssituation,  $n = 7$ ), welche nach 10 Minuten auf  $2 \pm 1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  sanken.

Sowohl durch die Zugabe von DIDS als auch von SITS liessen sich keine signifikanten Änderungen des Carbachol induzierten  $I_{\text{SC}}$  beobachten.

### A Ventrale rechte Kolonlage



### B Dorsale rechte Kolonlage



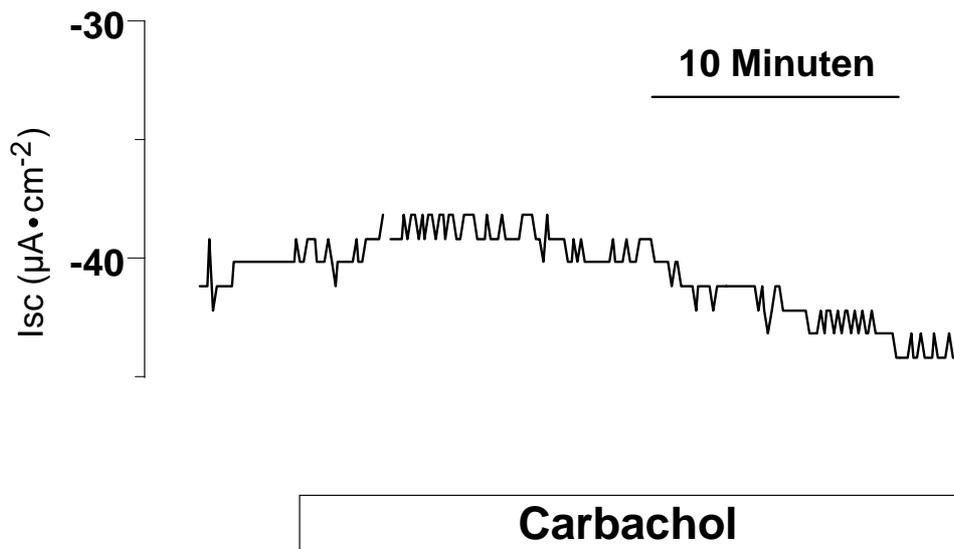
**Abbildung 14 A und B:** Die Wirkung von Carbachol in Anwesenheit von SITS ( $10^{-3}$  M auf der mucosalen Seite) auf den  $I_{sc}$  im ventralen (A) und dorsalen (B) Kolon. Man sieht sowohl in Abbildung A als auch in Abbildung B den signifikant steilen Anstieg des  $I_{sc}$  unmittelbar nach Zugabe von Carbachol, der jedoch im Vergleich zur Kontrolle ohne SITS Vorbehandlung nicht signifikant unterschiedlich war (Beispielkurve für jeweils ein Gewebe;  $n = 6$  ventrales und  $n = 7$  dorsales Kolon; Statistik siehe Text).

### 3.5 Apikale Cl<sup>-</sup> Kanäle

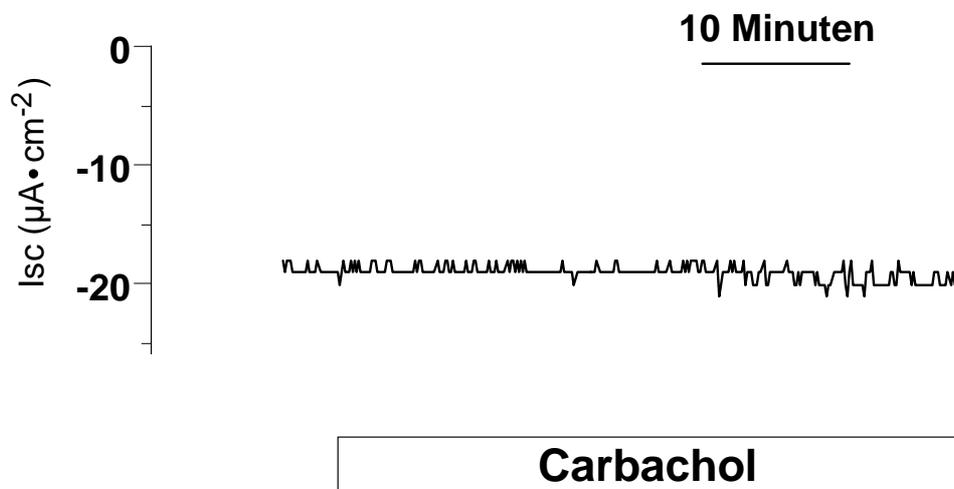
Auch hier wurden Versuche nach vorangegangener basolateraler Depolarisation durchgeführt, um die apikale Seite isoliert untersuchen zu können. Zusätzlich zu dem im Vorfeld beschriebenen K<sup>+</sup> Gradienten (siehe Kapitel 3.3, Seite 30) wurde ein von serosal nach mucosal gerichteter Cl<sup>-</sup> Gradient angelegt (111,5 mM KCl serosal, 107 mM Na Gluconat 4,5 mM KCl mucosal). Hiermit bestand die Möglichkeit, apikale Cl<sup>-</sup> Kanäle untersuchen zu können, denn an Epithelien existieren auch ClCa in der apikalen Membran (SCHULTHEISS et al., 2003). Wie auch bei der Untersuchung der K<sup>+</sup> Leitfähigkeit nach vorangegangener basolateraler Depolarisation kam es auch hier unmittelbar nach dem Puffertausch zu einem massiven Abfall des I<sub>SC</sub> in den negativen Bereich.

Im ventralen Kolon sahen wir einen deutlichen Abfall des Kurzschlussstromes nach der Zugabe von Carbachol, so dass 10 Minuten nach Zugabe der I<sub>SC</sub> bei  $-9 \pm 1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  lag ( $p < 0,05$  gegenüber Ausgangssituation,  $n = 6$ ), siehe Abbildung 15 A. Im Gegensatz zum ventralen Kolon änderte sich der I<sub>SC</sub> in Folge der Carbachol Applikation im dorsalen Kolon nicht ( $-1 \pm 0 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,  $n = 7$ , siehe Abbildung 15 B).

### A Ventrale rechte Kolonlage



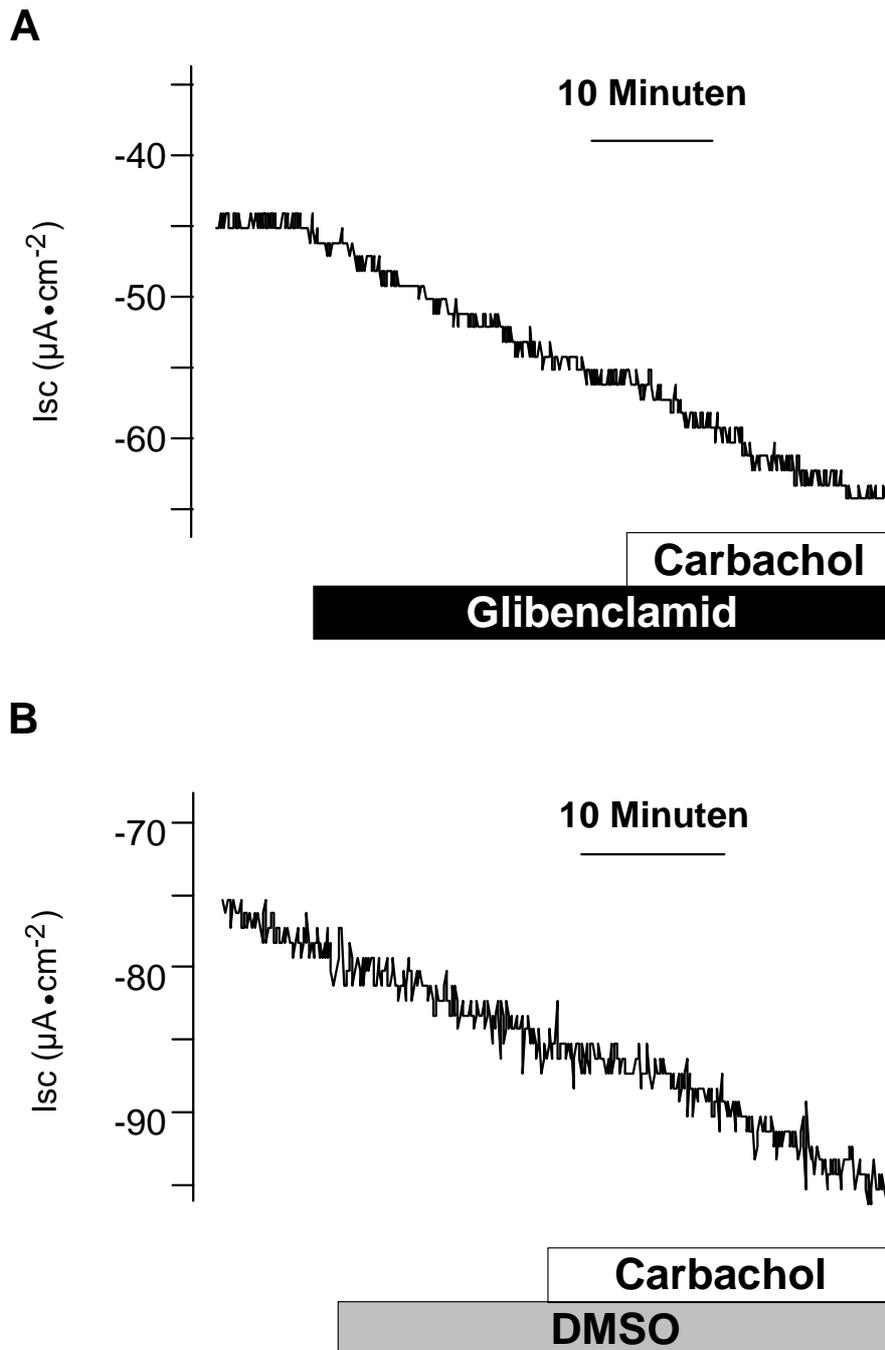
### B Dorsale rechte Kolonlage



**Abbildung 15 A und B:** Beispielkurve für die Wirkung von Carbachol auf ventrale (A) und dorsale (B) rechte Kolonlage unter basolateral depolarisierten Bedingungen und in Anwesenheit eines von serosal nach mucosal gerichteten  $\text{Cl}^-$  Gradienten. Eine signifikante  $I_{\text{SC}}$  Änderung ist nur ventral vorhanden (Beispielkurve für jeweils ein Gewebe;  $n = 6$  ventrales und  $n = 7$  dorsales Kolon; Statistik siehe Text).

Die Ergebnisse der vorherigen Versuchsreihe (siehe Kapitel 3.5, Seite 48) unter basolateral depolarisierten Bedingungen könnten auf der gleichzeitigen Aktivierung von  $K^+$  und  $Cl^-$  Kanälen beruhen. Da sich eine Sekretion von  $K^+$  Ionen in einer Erniedrigung des  $I_{SC}$  und eine Sekretion von  $Cl^-$  Ionen in einer Erhöhung des  $I_{SC}$  widerspiegelt, könnte es bei gleichzeitiger Aktivität beider Kanäle zu einer Aufhebung des zu messenden  $I_{SC}$  kommen. Daher wurde eine folgende Versuchsreihe mit Glibenclamid durchgeführt, um den CFTR  $Cl^-$  Kanal auszuschalten.

Während im dorsalen Kolon nach der Zugabe der Substanzen keine  $I_{SC}$  Änderungen zu beobachten waren, konnte im ventralen Segment sowohl nach der Zugabe von Glibenclamid als auch nach Carbachol jeweils ein signifikanter Abfall des  $I_{SC}$  beobachtet werden. 10 Minuten nach Zugabe von Glibenclamid ( $5 \cdot 10^{-4}$  M mucosal,  $n = 7$ ,  $p < 0,05$  gegenüber Ausgangssituation) sank der  $I_{SC}$  um  $-4 \pm 1 \mu A \cdot cm^{-2}$ . Die nachfolgende Zugabe von Carbachol führte zu einem weiteren  $I_{SC}$  Abfall um  $-8 \pm 4 \mu A \cdot cm^{-2}$  ( $p < 0,05$  gegenüber Ausgangssituation;  $n = 7$ ). Auch bei diesem Versuch wurden Kontrollversuche mit DMSO durchgeführt. Hier kam es zu einem Abfall des  $I_{SC}$  nach Zugabe von DMSO, Carbachol konnte hingegen im Gegensatz zur Vorbehandlung mit Glibenclamid keine signifikanten  $I_{SC}$  Änderungen hervorrufen (DMSO:  $-3 \pm 1 \mu A \cdot cm^{-2}$ , Carbachol  $2 \pm 2 \mu A \cdot cm^{-2}$ ;  $p < 0,05$  gegenüber Ausgangssituation;  $n = 5$ , siehe Abbildung 16 A und B).



**Abbildung 16 A und B:** Carbachol-induzierte Änderung des  $I_{sc}$  an der rechten ventralen Kolonlage unter basolateral depolarisierten Bedingungen (111,5 mM KC-Puffer serosal; 107 mM Na Gluconat Puffer 4,5 mM KCl mucosal) **A:** Nach Vorbehandlung mit Glibenclamid ( $5 \cdot 10^{-4}$  M, Beispielkurve für ein Gewebe;  $n = 7$ ) und **B:** in Anwesenheit von DMSO als Lösungsmittelkontrolle (Beispielkurve für ein Gewebe;  $n = 6$ ); (Statistik siehe Text)

## 4. Diskussion

### 4.1 Methodik

Über Ionenkanäle bzw. Möglichkeiten des Ionenaustausches ist am Kolon des Pferdes bislang wenig bekannt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben erstmals gezeigt, dass es unterschiedliche Sekretionsleistungen zwischen der rechten dorsalen und rechten ventralen Kolonlage gibt.

Mit Hilfe der hier verwendeten Technik der Ussing-Kammer ist es möglich, den Nettoionenstrom bzw. die transepitheliale Potentialdifferenz ( $P_D$ ) zu messen. Bei den Sekretionsvorgängen am Dickdarm des Pferdes findet ein elektrogener Ionentransport statt, dem Wasser aus osmotischen Gründen folgt. Die Technik der Ussing-Kammer bietet eine Möglichkeit Ionensekretionsvorgänge zu erfassen, und somit einen genaueren Einblick in die Entstehung von Diarrhoen beim Pferd zu erhalten.

Auffällig bei den durchgeführten Versuchen war der deutlich niedrigere zu messende Kurzschlussstrom ( $I_{SC}$ ) am proximalen Kolon des Pferdes im Vergleich zu ähnlichen Versuchen am proximalen Kolon der Ratte. Beim Nager induziert Carbachol bei gleicher Konzentration  $I_{SC}$  Änderungen von  $144 \pm 14 \mu A \cdot cm^{-2}$  (NOBLES et al., 1991), beim Pferd konnten lediglich  $I_{SC}$  Änderungen von  $33 \pm 7 \mu A \cdot cm^{-2}$  beobachtet werden. Über die Ursachen kann nur spekuliert werden. Eine mögliche Erklärung könnte die im Vergleich zum Kolon der Ratte kleinere Oberfläche des Darmes, und die damit verbundenen geringeren messbaren Ionenbewegungen, liefern. Eine weitere in Betracht zu ziehende Erklärung für die geringere Stromsensitivität des Pferdekolons läge in einer geringeren Dichte der Kanäle. Mit Hilfe der Patch Clamp Technik wäre es in nachfolgenden Arbeiten möglich, eine genaue Bestimmung der Kanaldichte vorzunehmen.

Des weiteren könnte beim Pferd der Anteil an elektrisch neutralem Ionentransport höher sein als bei anderen Spezies. Mit Hilfe von radioisotopen Fluxen ließe sich auch diese Möglichkeit in folgenden Versuchen klären. Hierbei werden Ionen durch Radioisotope ersetzt, welche über gleiche Mechanismen wie die Ionen transportiert werden. Durch Messung der radioaktiven Strahlung in der jeweils nicht mit Radioisotopen behandelten Kammerhälfte kann eine genaue Aussage über die Ionenbewegung gemacht werden.

Ein weiterer zu beobachtender Unterschied zwischen dem Kolon der Ratte und dem hier untersuchten Kolon des Pferdes liegt in der Funktionsfähigkeit des Kolongewebes nach der Tötung. Erfolgt am Rattenkolon nicht unmittelbar nach der Tötung die Darmentnahme und

der Versuchsbeginn, so sind sehr hohe Leitfähigkeiten zu messen, welche auf einen Gewebeschaden hinweisen. Durch zu lange Verweildauer bis zum Versuchsbeginn oder fehlerhaftes Präparieren des Darmes erniedrigt sich der parazelluläre Widerstand, d.h. die zu messenden Leitfähigkeiten steigen an. Am Pferdedarm konnte das Gewebe teilweise erst 40 Minuten nach der Tötung der Pferde entnommen und in die eisgekühlte Lösung 2 verbracht werden. Bis das Gewebe präpariert und in die Ussing-Kammern eingespannt war, damit der Versuch beginnen konnte, vergingen im Schnitt weitere 20 Minuten. Dennoch waren die Leitfähigkeiten am proximalen Kolon des Pferdes vergleichbar mit denen am proximalen Kolon der Ratte. Am Rattendarm wurden von NOBLES et al. 1991 Leitfähigkeiten von  $43,6 \pm 4,4 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$  gemessen, bei den hier beschriebenen Versuchen am Pferdekolon konnten wir Leitfähigkeiten zwischen  $15 - 25 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$  am dorsalen Kolon und zwischen  $20 - 40 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$  am ventralen Kolon beobachten. Bei drei Tieren, die aus diversen Gründen euthanasiert werden mussten, konnte das Kolongewebe unmittelbar nach der Tötung entnommen werden. Bei den Versuchen mit diesem Gewebe konnten wir vergleichbare Leitfähigkeiten feststellen, so dass auch bei Verwendung des Probenmaterials vom Schlachthof von einem funktionsfähigen Gewebe auszugehen ist. Zudem zeigte auch die Histologie keine Änderung der Zellmorphologie. Hierbei konnte lichtmikroskopisch kein Hinweis auf einen Zelluntergang gefunden werden (siehe Abbildung 5, Kapitel 3, Seite 29). Beim nekrotischen Zelltod sieht man zytologisch vor allem Zellkernveränderungen wie Pyknose, Karyorrhexis oder Karyolyse. In der HE Färbung wäre dann eine Eosinophilie des Zytoplasmas, eine histologische Gewebeinfiltration mit Leukozyten sowie eine Demarkation des nekrotischen Gewebes mit Randsaumbildung und Bildung von Granulationsgewebe zu erwarten. All dies konnte in den hier angefertigten Schnitten nicht gefunden werden.

Deutlich niedrigere Leitfähigkeiten ( $4,9 \pm 0,6 \text{ ms} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) als bei unseren Versuchen wurden am proximalen Kolon von Ponies gemessen (CLARK und ARGENZIO, 1990). Bei diesen Autoren fanden keine zeitlichen Verzögerungen durch einen Transport statt, da die Ponies für die Versuche getötet werden mussten. Da jedoch auch bei rascher Entnahme des Gewebes bei Großpferden vergleichbare Leitfähigkeiten wie unter Standardversuchsbedingungen gemessen wurden, kann der schnellere Versuchsbeginn nicht die Ursache für die unterschiedlichen Leitfähigkeiten zwischen Warmblutpferd und Pony sein. In der Arbeit von CLARK und ARGENZIO (1990) wurde des weiteren nicht zwischen ventraler und dorsaler Kolonlage differenziert. Die Leitfähigkeiten waren beim Warmblutpferd in der dorsalen Kolonlage deutlich geringer im Vergleich zur ventralen Kolonlage, so dass die Unterschiede zwischen

der Literaturangabe und den hier ermittelten Werten auf speziebedingten Unterschieden zwischen Ponies und Warmblutpferden beruhen dürften.

Ein Grund für die unterschiedlichen  $I_{SC}$  Werte zwischen dem Kolon des Pferdes und der Ratte könnte in der längeren Verweildauer der Nahrung im Magen-Darm-Trakt beim Pferd liegen.

Daher soll im folgenden ein Einblick in die unterschiedliche Verweildauer der Nahrung im Verdauungstrakt der unterschiedlichen Spezies gegeben werden.

Beim Pferd ist, im Vergleich zur Ratte, die Zeit für die Magen-Darm Passage wesentlich länger. Nach der Nahrungsaufnahme kommt es beim Pferd zu einer Schichtung der zerkauten Futterbestandteile im Magen. Die Entleerung des Mageninhaltes setzt bereits während der Futteraufnahme ein und dauert zwischen 1 und 5 Stunden. Der ca. 20 m lange Dünndarm des Pferdes ist aufgrund seiner starken und frequenten Peristaltik fast immer leer oder nur mit wenig flüssigem Inhalt gefüllt. Die Transportgeschwindigkeit der Ingesta liegt bei ca. 20 cm pro Minute, d.h. der Inhalt passiert den Dünndarm in nur 1,5 Stunden. Der Dickdarm des Pferdes ist das Hauptverdauungsorgan und um ein Vielfaches voluminöser als bei anderen Tierarten. Sowohl der Blinddarm als auch der größte Teil des Grimmdarmes sind Gärkammern und dienen vorwiegend dem Aufschluss der Rohfaser. Weiterhin erfolgt im Grimmdarm und im Mastdarm die Eindickung des Darminhaltes durch Wasserresorption. Die Dauer der Nahrungspassage durch den gesamten Magen-Darm-Trakt des Pferdes von ca. 35-50 Stunden hängt von zahlreichen Faktoren ab und entfällt zu 85% auf den Dickdarm (MEYER, 1992). Hier spielen Faktoren wie Individualität, Belastung des Pferdes sowie Art, Zerkleinerungsgrad und Verdaulichkeit der Nahrung eine Rolle.

Kleine Nagetiere, einschließlich Ratten, haben einen sehr hohen Energiebedarf auf Grund dessen die Verweildauer von Futter im Magen-Darm-Trakt möglichst kurz sein muss. Es wurden Untersuchungen durchgeführt an Lemmings (SPERBER 1968, SPERBER et al. 1983), an Kaninchen (BJÖRNHAG 1972, 1981), an pflanzenfressenden Vogelarten (BJÖRNHAG und SPERBER, 1977) und an Ratten (SPERBER et al. 1983) mit dem Ergebnis, dass es für die jeweiligen Tierarten unterschiedliche Magen-Darm Passagezeiten gibt. Es wurde herausgefunden, dass kleine Futterbestandteile und Mikroorganismen bei Kaninchen und Vögeln bzw. nur Mikroorganismen bei Lemmings und Ratten länger im Darm behalten wurden als große Futterpartikel. Dieser Mechanismus ist bedeutend, um lebensnotwendige Nährstoffe, welche für die mikrobielle Verdauung wichtig sind, nicht zu schnell auszuscheiden.

BJÖRNHAG et al. 1984 stellten sich die Frage, ob bei Pferden ein ähnlicher Mechanismus existiert, auch wenn dies nicht zwingend lebensnotwendig ist wie beim kleinen Nagetier. Die Autoren untersuchten den Separationsmechanismus von Futterbestandteilen im großen Kolon von Pferden. Sie fanden anhand des Flüssigkeitsmarkers PEG (Polyethylenglycol MW 4000) sowie der durchschnittlichen Verteilung von Stickstoff und Partikeln, die weniger als 100 µm in der Trockenmasse betragen, einen Separationsmechanismus zwischen der rechten dorsalen Kolonlage und dem distalen Kolon.

Dieser Mechanismus dient dazu, dem Pferd Stickstoff, speziell in Form von Mikroorganismen, zu bewahren (BJÖRNHAG, 1989). Diese längere Verweildauer könnte somit auch ein Grund für eine geringere Nettosekretion von Ionen sein.

Ein weiterer Unterschied zum Kolon der Ratte besteht in der Tatsache, dass es beim Pferdekolon Phasen der Nettosekretion und Phasen der Nettoresorption in den nach ARGENZIO et al., 1974 beschriebenen vier funktionelle voneinander zu trennenden Darmabschnitten gibt. Hiernach müssen Zäkum, dorsale und ventrale Kolonlage sowie das Kolon descendens als vier verschiedene aber homogene Kompartimente angesehen werden.

Die folgende Tabelle soll eine Übersicht über die verwendeten Substanzen sowie der Wirkung geben:

**Tabelle 9:** Eingesetzte Substanzen und deren Wirkung:

<b>Substanz</b>	<b>Wirkung</b>
Carbachol	Stabiles Analogon des Acetylcholins (Neurotransmitter, der durch den schnellen Abbau durch Esterasen für die Versuche ungeeignet ist)
Tetrodotoxin	Gift des japanischen Kugelfisches, blockiert spannungsabhängige $\text{Na}^+$ Kanäle auf Nervenzellen
Indomethacin	Inhibitor der Cyclooxygenase
Tetrapentylammonium	Inhibitor $\text{Ca}^{2+}$ abhängiger $\text{K}^+$ Kanäle
Glibenclamid	Sulfonylharnstoffderivat, blockiert den CFTR $\text{Cl}^-$ Kanal sowie ATP abhängige $\text{K}^+$ Kanäle
DIDS	Unspezifischer Blocker $\text{Ca}^{2+}$ abhängiger $\text{Cl}^-$ Kanäle
SITS	Unspezifischer Blocker $\text{Ca}^{2+}$ abhängiger $\text{Cl}^-$ Kanäle

## 4.2 Wirkungsweise von Carbachol am Pferdedarm

### 4.2.1 *Basale Bedingungen*

Den Untersuchungen am Pferdekolon mittels der Technik der Ussing-Kammer lag die Klärung der Frage zugrunde, ob es einen Unterschied zwischen den an der  $\text{Cl}^-$  Sekretion beteiligten Kanaltypen der rechten dorsalen und ventralen Kolonlage gibt. Eine unterschiedliche Regulation der  $\text{Cl}^-$  Sekretion in diesen Darmabschnitten könnte beispielsweise die begrenzte Lokalisation der Colitis X induzierten Veränderungen am proximalen Kolon des Pferdes erklären helfen. Für die Versuche wurde Carbachol verwendet, ein stabiles Analogon des Acetylcholins. Acetylcholin selbst ist ein wichtiger Neurotransmitter am Darm, jedoch durch den raschen Abbau durch Esterasen als Substanz bei den Untersuchungen nicht geeignet.

Carbachol führt unter basalen Bedingungen in Parsons Standard Lösung zu einer signifikanten  $I_{\text{SC}}$ -Änderung in beiden Kolonsegmenten (siehe Abbildung 6 A und B).

### 4.2.2 *Chloridfreie Bedingungen*

Um sicher zu gehen, dass durch die Zugabe von Carbachol eine  $\text{Cl}^-$  Sekretion ausgelöst wird, wurden vorweg Versuche unter  $\text{Cl}^-$  freien Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurden keine signifikanten  $I_{\text{SC}}$  Änderungen durch die Zugabe von Carbachol an beiden Kolonlagen des Pferdes induziert. Aufgrund des fehlenden Anstiegs des Kurzschlussstromes unter  $\text{Cl}^-$  freien Bedingungen handelt es sich bei den Carbachol induzierten  $I_{\text{SC}}$ -Änderungen unter normalen Versuchsbedingungen in Parsons Standard Lösung um eine  $\text{Cl}^-$  Sekretion.

Da unter  $\text{Cl}^-$  freien Bedingungen keine  $I_{\text{SC}}$ -Änderungen durch Carbachol zu beobachten waren, induziert Carbachol auch keine elektrogene Bicarbonat Ionen Sekretion wie beispielsweise am Rattenkolon, denn wie auch  $\text{Cl}^-$  kann  $\text{HCO}_3^-$  elektrogen über das Darmgewebe transportiert werden. So führt ein Anstieg des zytoplasmatischen cAMP-Gehaltes, z.B. induziert durch den Adenylatzyklase Aktivator Forskolin zu einem  $I_{\text{SC}}$  Anstieg, der erst unter  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$  freien Bedingungen nicht mehr vorhanden war (SCHULTHEISS et al., 1998).

### 4.3 Die subepithelial vermittelte Wirkung von Carbachol:

Subepithelial vermittelte Wirkungen können einerseits nerval, andererseits durch Prostaglandine vermittelt sein.

#### 4.3.1 *Beteiligung des enteralen Nervensystems an der Carbachol induzierten Cl<sup>-</sup> Sekretion:*

Nicotin Agonisten, wie beispielsweise 1,2-dimethyl 1-4-phenylpiperazinium (DMPP) oder das stabile Acetylcholin-Analogon Carbachol, stimulieren die Cl<sup>-</sup> Sekretion durch Aktivierung der Neuronen des Plexus submucosus im Kolon von Ratte und Meerschweinchen (KUWAHARA et al., 1987; DIENER et al., 1989). Als Plexus submucosus wird ein Bestandteil des enteralen Nervensystems, der hauptsächlich den epithelialen Ionentransport beeinflusst, bezeichnet (COOK und REDDIX, 1994).

Über eine Beteiligung von enteralen Neuronen induzieren auch bakterielle Erreger eine Sekretion am Gastrointestinaltrakt. Dies geschieht beispielsweise durch Transmitter wie Neurensin, Substanz P oder Galanin indem diese aus Neuronen freigesetzt werden (POTHOULAKIS 2000).

Die Beteiligung des enteralen Nervensystems an der basalen und Carbachol induzierten Cl<sup>-</sup> Sekretion wurde mit Hilfe des Kugelfischgiftes Tetrodotoxin (TTX) untersucht. Es verhindert die Weiterleitung von Aktionspotentialen durch Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle an Nervenzellen. Dies verhindert eine Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt, so dass keine Reizweiterleitung mehr stattfinden kann (CATTERALL, 1995).

Die basolaterale Zugabe von Tetrodotoxin führte in beiden Kolonsegmenten zu keiner signifikanten Änderung des basalen I<sub>SC</sub>. Daher muss von einer fehlenden basalen neuronalen Wirkung auf die Cl<sup>-</sup> Sekretion ausgegangen werden kann. Ähnliche Ergebnisse werden am proximalen Kolon der Ratte gemessen. Auch hier, im Gegensatz zum distalen Kolon, hat die basolaterale TTX Zugabe keinen signifikanten Einfluss auf die basale Cl<sup>-</sup> Sekretion (SCHULTHEISS und DIENER, 2000).

Sowohl im dorsalen als auch im ventralen Segment induziert Carbachol nach Vorbehandlung mit Tetrodotoxin eine nur geringgradige Änderung des I<sub>SC</sub> (siehe Abbildung 7 A und B). Die Antwort des I<sub>SC</sub> nach Zugabe von Carbachol ist wesentlich kleiner als unter basalen

Bedingungen ohne Vorbehandlung mit Tetrodotoxin. Sollte eine Schädigung des neuronalen Gewebes vorliegen, welche durch die lichtmikroskopische Untersuchung nicht ausgeschlossen werden kann, würde es nach der Vorbehandlung mit dem Kugelfischgift nicht zu einer deutlichen Hemmung der Carbachol induzierten  $I_{SC}$  -Antwort in beiden Segmenten kommen. Carbachol induziert hier einen wesentlich geringeren  $I_{SC}$  Unterschied als bei der nicht vorbehandelten Kontrollgruppe. Man kann aufgrund dieser Versuchsergebnisse von einer erstmals nachgewiesenen Beteiligung des enteralen Nervensystems an der Carbachol induzierten  $Cl^-$  Sekretion in der rechten dorsalen und ventralen Kolonlage des Pferdes ausgehen.

Wie bereits erwähnt, führte die basolaterale Zugabe von Carbachol sowohl im dorsalen als auch im ventralen Kolonsegment zu der auch vom Labornager her bekannten Änderung des  $I_{SC}$ . Unmittelbar nach der Zugabe erfolgte ein rascher Anstieg, gefolgt von einem langsamen Abfall des  $I_{SC}$ . Durch die massive Hemmung des Peak  $I_{SC}$  in beiden Segmenten unterscheidet sich das Kolon des Pferdes nach Vorbehandlung mit Tetrodotoxin in seiner Reaktion auf Carbachol allerdings von dem Kolon der Ratte. Bei dieser Spezies kommt es zu einem kurzen, massiven Anstieg des  $I_{SC}$  mit einer ausschließlich signifikanten Hemmung des 10 Minuten Wertes (STRABEL und DIENER, 1995).

#### 4. 3.2 *Bedeutung der Prostaglandine für die Carbachol Wirkung:*

Prostaglandine haben die Eigenschaft, über Neurone des Plexus submucosus die  $Cl^-$  Sekretion der Mucosa zu stimulieren. Desweiteren beeinflussen sie die Durchblutung der Schleimhaut, indem sie eine Dilatation der Arteriolen induzieren (SURPRENANT et al., 1992). Wie bereits in der Einleitung erwähnt (siehe Kapitel 1.5.2, Seite 14), wird der Hauptanteil der mucosal wirksamen Prostaglandine von subepithelialen Zellen gebildet (CRAVEN und DE RUBERTIS, 1984), insbesondere von den in die Lamina propria eingelagerten Mastzellen und Phagozyten (BINDER und SANDLE, 1994).

Carbachol kann über die Bindung an muscarinerge Rezeptoren am Zellepithel eine Aktivierung der Phospholipase  $A_2$  induzieren, was die Freisetzung der Arachidonsäure bewirkt und hieraus über die Cyclooxygenase die Synthese der Prostaglandine. Außerdem wurde am Rattendarm eine durch Carbachol induzierte subepitheliale Prostaglandin Freisetzung nachgewiesen (CRAVEN und DE RUBERTIS, 1981). Alternativ zu der neuronal vermittelten Wirkung können Prostaglandine die sekretorische Funktion auch durch direkte Aktivierung der Enterozyten steigern (DIENER et al., 1988 b), indem sie das Öffnen apikaler

CFTR  $\text{Cl}^-$  Kanäle induzieren. Ein Anstieg der Prostaglandin Konzentration könnte schon durch die Präparation und damit verbundene mechanische Stimulation des Gewebes zur Gewinnung des Mucosa-Submucosa Präparates ausgelöst worden sein (BEUBLER und JUAN, 1978). Um die Bedeutung der Prostaglandin-Anwesenheit für die Carbachol induzierte  $\text{Cl}^-$  Sekretion am Pferdedarm zu untersuchen, wurde die Synthese der Prostaglandine mittels dem Cyclooxygenase-Hemmer Indomethacin gehemmt.

Im ventralen Kolonsegment kam es zu einem Abfall des  $I_{\text{SC}}$  nach der Zugabe von Indomethacin. Das ventrale Kolon ließ sich in der Regel wesentlich schlechter präparieren als das dorsale Segment. Sollte es nun bereits durch die mechanische Stimulation zu einer vermehrten Ausschüttung der Prostaglandine gekommen sein (BEUBLER und JUAN, 1978) und wirken Prostaglandine prosekretorisch am Pferdekolon, ist genau mit diesem Abfall des  $I_{\text{SC}}$  nach der Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Indomethacin zu rechnen. Diese Ergebnisse am ventralen Kolon entsprechen denen, die auch an Ponies gemessen wurden (CLARK und ARGENZIO, 1990). Im dorsalen Segment passiert genau das Gegenteil. Hier kommt es zu einem Anstieg des  $I_{\text{SC}}$  bei Hemmung der Prostaglandinsynthese. Eine Erklärung hierfür würde eine mögliche antisekretorische Wirkung der Prostaglandine am dorsalen Kolon des Pferdes liefern, wie sie insbesondere durch  $\text{PGE}_2$  hervorgerufen sein könnte. Hierzu wurden erste Versuche am Kolon des Pferdes durchgeführt (SCHULTHEISS, persönliche Mitteilung). Die antisekretorische Wirkung der Prostaglandine wiesen DIENER et al. (1992) am Kolon der Ratte nach. Im Gegensatz zum Pferd ist hier  $\text{PGD}_2$  antisekretorisch wirksam.

Auch am Rattenkolon kommt es, je nach Zustand des Gewebes, im proximalen Anteil bei einer hohen basalen Prostaglandinproduktion zu einem Abfall des  $I_{\text{SC}}$  nach der Zugabe von Indomethacin.

In den eigenen Untersuchungen am Pferdekolon ließ sich in beiden Segmenten, trotz Anwesenheit von Indomethacin, eine signifikante Erhöhung des Carbachol induzierten Kurzschlussstroms (sowohl des Peaks als auch des 10 Minuten Wertes) feststellen. Diese sind allerdings im Vergleich zu basalen Bedingungen ohne Vorbehandlung mit Indomethacin deutlich niedriger (siehe Abbildung 6 A und B sowie 8 A und B). Dies deutet auf eine unterschiedliche Wirkung von Carbachol nach Vorbehandlung mit Indomethacin am Kolon der Ratte und des Pferdes hin. Am distalen Rattenkolon konnte nach basolateraler Vorbehandlung des Gewebes mit dem Cyclooxygenasehemmer Indomethacin ein rascher Anstieg des Carbachol induzierten  $I_{\text{SC}}$  (Peak) beobachtet werden, während der 10 Minuten Wert signifikant gehemmt wurde (STRABEL und DIENER, 1995). SCHULTHEISS et al. (2000 a) untersuchten zudem die Wirkung von Flufenamat, ebenfalls einem Blocker der

Cyclooxygenase (INSEL, 1990), am Kolon der Ratte. Flufenamat hat neben seiner hemmenden Wirkung auf die Cyclooxygenase zusätzlich die Eigenschaft, nicht selektive Kationenkanäle (GÖGELEIN und GREGER, 1986; GÖGELEIN et al., 1990; WEISER und WIENRICH, 1996), sowie Cl<sup>-</sup> Kanäle zu blockieren (GÖGELEIN et al., 1987; MARTIN und SHUTTLEWORTH, 1994; SCHUMACHER et al., 1995; WEBER et al., 1995). Des weiteren hemmt Flufenamat K<sup>+</sup> Leitfähigkeiten (HU et al., 1993; WIESER und WIENRICH, 1996). In der Arbeit wurde die Wirkung von Flufenamat mit der von Indomethacin ebenfalls an einem Mucosa-Submucosa Präparat verglichen. Flufenamat reduzierte die Carbachol induzierte Cl<sup>-</sup> Sekretion signifikant.

Durch Carbachol wird nicht nur Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern freigesetzt, sondern es folgt auch ein Einstrom von Ca<sup>2+</sup> über nicht selektive Kationenkanäle (FRINGS et al., 1999). Aufgrund der Versuchsergebnisse am Rattenkolon muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass durch Indomethacin am Pferdedarm nicht nur die Cyclooxygenase, sondern auch ein nicht selektiver Kationenkanal blockiert wird, worüber in der Literatur bislang nichts bekannt ist. Vergleicht man nun die Wirkung von Flufenamat mit der von Indomethacin, kann man am Kolon des Pferdes nach Vorbehandlung mit Indomethacin einen ähnlichen Effekt beobachten wie durch Flufenamat am Kolon der Ratte.

Da sowohl Indomethacin als auch Tetrodotoxin massiv die Carbachol induzierte Cl<sup>-</sup> Sekretion beeinflussen, muss man von einem epithelialen und einem subepithelialen Effekt der Carbachol Wirkung ausgehen.

## 4.4 Die epithelial vermittelte Wirkung von Carbachol

Auf epithelialer Ebene muss man zwischen einer direkten und einer indirekten Stimulierung der  $\text{Cl}^-$  Sekretion unterscheiden. Da die indirekte Stimulierung häufiger ist, wird diese Möglichkeit als erstes diskutiert.

### 4.4.1 Indirekte Stimulierung der $\text{Cl}^-$ Sekretion :

An anderen Spezies konnte gezeigt werden, dass Carbachol, durch  $\text{IP}_3$  vermittelt, zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration (DIENER et al., 1991) führt. Durch die Bindung von Carbachol an den  $\text{M}_3$  Rezeptoren der Zellmembran, z.B. am Rattenkolon, wird eine  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige  $\text{Cl}^-$  Sekretion durch Aktivierung der Phospholipase C initiiert.  $\text{IP}_3$ , welches bei der Phospholipase C Reaktion frei wird, bindet an spezifische Rezeptoren der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Speicher und führt darüber zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration (LINDQUIST et al., 1998). Dies ist mit einem Öffnen von basolateralen  $\text{K}^+$  Kanälen verbunden. Der Einstrom von  $\text{K}^+$  Ionen führt schließlich zu einer Hyperpolarisation der Zelle. Dies wiederum hat zur Folge, dass die Triebkraft für negativ geladene  $\text{Cl}^-$  Ionen, aus der Zelle herauszugelangen steigt (BÖHME et al., 1991, STRABEL und DIENER, 1995, BLEICH et al., 1996). Damit unter diesen Umständen eine  $\text{Cl}^-$  Sekretion stattfinden kann, müssen folglich spontan offene  $\text{Cl}^-$  Kanäle in der apikalen Membran vorhanden sein.

Die Beteiligung der von Carbachol induzierten  $\text{K}^+$  Kanalaktivierung wurde in den eigenen Untersuchungen mittels Tetrapentylammonium überprüft. Hierbei handelt es sich um eine Substanz, die  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige  $\text{K}^+$  Kanäle blockiert (QUAST und COOK, 1990).

Unter basalen Bedingungen zeigte die mucosale und serosale Zugabe von Tetrapentylammonium in beiden Kolonsegmenten keine signifikante Änderung des  $I_{\text{SC}}$ . Dies bedeutet, dass Tetrapentylammonium basal keinen Einfluss auf die  $\text{Cl}^-$  Leitfähigkeit hat. Wurde nun Carbachol auf das vorbehandelte Gewebe zugegeben, so konnte man eine ähnliche Wirkung wie bei den Versuchen mit dem Kugelfischgift TTX beobachten: im ventralen Segment konnte Carbachol nur noch einen maximalen  $I_{\text{SC}}$  von  $4 \pm 1 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  induzieren, 10 Minuten nach der Zugabe war der  $I_{\text{SC}}$  mit  $0 \pm 1 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  gegenüber basalen Bedingungen nicht mehr signifikant erhöht. Im dorsalen Kolonsegment war Carbachol gar nicht mehr in der Lage, eine Änderung des  $I_{\text{SC}}$  zu bewirken (siehe Abbildung 9 A und B). Dies bedeutet, dass

die indirekte Möglichkeit der  $\text{Cl}^-$  Sekretion mittels Carbachol über die Aktivierung von  $\text{K}^+$  Kanälen eine große Bedeutung am Pferdekolon hat.

Eine in Betracht zu ziehende Möglichkeit warum es im ventralen Kolon zu einem Anstieg des  $I_{\text{SC}}$  kam, könnte eine in diesem Segment vorhandene Resistenz gegenüber Tetrapentylammonium sein. Möglicherweise sind Typen von  $\text{K}^+$  Kanäle vorhanden, die sich nicht durch die Zugabe von Tetrapentylammonium blockieren lassen.

Durch die beidseitige Zugabe von Tetrapentylammonium ist es nicht möglich, den  $\text{K}^+$  Kanal einer Membranseite zuzuordnen. Am Kolon der Ratte ist bekannt, dass  $\text{K}^+$  Kanäle sowohl auf der basolateralen als auch auf der apikalen Seite vorhanden sind. Aufgrund dessen wurde in der folgenden hier diskutierten Versuchsreihe mit der Technik der basolateralen Depolarisation (FUCHS et al., 1977) die basolaterale Membran ausgeschaltet. Dies geschieht, indem man die extrazelluläre  $\text{K}^+$  Konzentration soweit erhöht, bis sie etwa der intrazellulären  $\text{K}^+$  Konzentration entspricht. Somit schaltet man den chemischen Gradienten dieser Membranseite aus. Die Zelle depolarisiert und es kommt zum Öffnen aller  $\text{K}^+$  Kanäle dieser Membranseite, wodurch der basolaterale Widerstand aufgehoben wird. Daraus resultiert, dass neben dem chemischen auch der elektrische Gradient auf dieser Seite der Zelle ausgeschaltet wird. Durch Anlegen eines chemischen Gradienten von serosal nach mucosal, beispielsweise für  $\text{Cl}^-$  oder  $\text{K}^+$  Ionen, kann nun die Regulation aller apikaler  $\text{Cl}^-$  oder  $\text{K}^+$  Kanäle durch Sekretagoga untersucht werden.

Im den eigenen Untersuchungen wurde mit Hilfe der basolateralen Depolarisation (111,5 mM KCl serosal / 107 mM NaCl mucosal) zunächst ein von serosal nach mucosal gerichteter  $\text{K}^+$  Gradient angelegt. Der hierauf in allen Fällen zu messende  $I_{\text{SC}}$  Abfall beruht darauf, dass  $\text{K}^+$  parazellulär von serosal nach mucosal entlang des chemischen Gradienten transportiert wird. Die Zugabe von Carbachol führte unter diesen Voraussetzungen zu keiner signifikanten Änderung des zu messenden  $I_{\text{SC}}$  (siehe Abbildung 10 A und B). Die fehlende Wirkung von Carbachol auf den  $I_{\text{SC}}$  könnte möglicherweise durch die Aktivität von  $\text{Cl}^-$  Ionen über den CFTR  $\text{Cl}^-$  Kanal kommen, wodurch eine Sekretion von  $\text{K}^+$  Ionen gehemmt werden könnte. Da sich eine Sekretion von  $\text{Cl}^-$  Ionen in einer Erhöhung des  $I_{\text{SC}}$  und eine Sekretion von  $\text{K}^+$  Ionen in einer Erniedrigung des  $I_{\text{SC}}$  widerspiegeln würde, könnte eine fehlende  $I_{\text{SC}}$  Antwort wie in dem hier diskutierten Versuch, das Ergebnis einer gleichzeitigen Aktivierung beider Kanäle sein.

Deshalb wurde im nächsten Versuch ebenfalls mittels der Technik der basolateralen Depolarisation ein Gradient sowohl für  $\text{K}^+$  als auch für  $\text{Cl}^-$  Ionen angelegt. Hierbei zeigte sich

die Existenz von apikalen  $K^+$  Kanälen allerdings nur im ventralen Segment. In diesem Versuch wurde zusätzlich durch die Zugabe von Glibenclamid auf der mucosalen Seite der CFTR  $Cl^-$  Kanal blockiert, um eine mögliche inhibitorische Wirkung des CFTR  $Cl^-$  Kanals auf  $K^+$  Kanäle aufzuheben (SCHULTZ et al., 1999), sowie die Möglichkeit einer Überlagerung von  $K^+$  und  $Cl^-$  Ionenaktivität auszuschließen. Anschließend wurde Carbachol auf der serosalen Seite zugegeben. Es kam sowohl nach der Zugabe von Glibenclamid als auch nach der Zugabe von Carbachol zu einem Abfall des  $I_{SC}$  im ventralen Kolonsegment (siehe Abbildung 14 A und B). Dies ist das Ergebnis einer Kationensekretion da unter diesen Versuchsbedingungen keine Anionenresorption, die zu den gleichen  $I_{SC}$  Veränderungen führen würde, erfolgen kann. Da der CFTR  $Cl^-$  Kanal durch Glibenclamid geblockt ist, müssen die hier zu beobachtenden, durch Carbachol induzierten,  $I_{SC}$  Änderungen auf eine  $K^+$  Sekretion zurückzuführen sein. Man kann also von einer Anwesenheit von apikalen  $K^+$  Kanälen im ventralen Segment mit Sicherheit ausgehen. Diese letzte Versuchsreihe zeigt, dass erst nach Ausschalten des CFTR  $Cl^-$  Kanals durch Glibenclamid (1. Abfall des  $I_{SC}$ ) eine  $K^+$  Sekretion durch Carbachol (2. Abfall des  $I_{SC}$ ) stimuliert werden kann. Das deutet auf eine inhibitorische Wirkung des CFTR  $Cl^-$  Kanals auf den  $K^+$  Kanal, vergleichbar der Hemmung des ENaC, hin.

#### 4. 4.2 Direkte Stimulierung:

Neben dieser indirekten Art der  $Cl^-$  Sekretionsinduktion besteht die Möglichkeit, dass Carbachol durch Änderung der intrazellulären  $Ca^{2+}$  Konzentration auch direkt die  $Cl^-$  Leitfähigkeiten aktivieren kann. Es handelt sich hierbei um einen  $Ca^{2+}$  abhängigen  $Cl^-$  Kanal (ClCa), der an sekretorischen Epithelien z.B. der Lunge (ANDERSON und WELSH, 1991) beschrieben ist. EVANS et al. übertrugen und exprimierten 2004 aus Mäusedärmen die mRNA in HEK 293 Zelllinien und wiesen auch hier den ClCa nach. Am distalen Kolon der Ratte ist dieser zwischenzeitlich funktionell und immunhistochemisch ebenfalls nachgewiesen worden (SCHULTHEISS et al., in Vorbereitung).

Neben dem ClCa spielt der CFTR  $Cl^-$  Kanal, welcher u.a. durch Prostaglandine aktiviert wird, bei der  $Cl^-$  Sekretion am Kolon der Ratte eine bedeutende Rolle. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl die  $Ca^{2+}$  abhängige Möglichkeit eine  $Cl^-$  Sekretion zu induzieren, als auch eine mögliche Existenz des CFTR  $Cl^-$  Kanals untersucht.

#### 4. 4.2.1 Der CFTR Cl<sup>-</sup> Kanal

Bei der indirekten Möglichkeit für Carbachol eine Cl<sup>-</sup> Sekretion zu induzieren, wurde bereits die Zugabe von Glibenclamid nach Ausschalten der basolateralen Membran diskutiert. Hier kam es im ventralen Segment nach Zugabe von Carbachol zu einem Abfall des I<sub>SC</sub>, welcher im dorsalen Segment nicht zu beobachten war.

Basal führt die Zugabe des Sulfonylharnstoffderivates Glibenclamid unter Versuchsbedingungen in Parsons Standard Lösung zu einem Abfall des I<sub>SC</sub> im ventralen Kolon, während es im dorsalen Kolon zu keiner signifikanten Änderung des I<sub>SC</sub> nach der Zugabe von Glibenclamid kam (siehe Abbildungen 11 A und B sowie 12 A und B). Dies legt die Vermutung nahe, dass ventral und dorsal unterschiedliche Typen von Cl<sup>-</sup> Kanälen vorhanden sind, die unter basalen Bedingungen eine Cl<sup>-</sup> Sekretion ermöglichen. Die beobachtete „signifikante“ I<sub>SC</sub> -Hemmung durch das Lösungsmittel DMSO ist ein zeitlich bedingter I<sub>SC</sub> Abfall und keine Wirkung des Lösungsmittels. Man konnte hier keine schnellen I<sub>SC</sub> Antworten, sondern lediglich einen langsamen Abfall des Kurzschlussstromes beobachten. Carbachol ist trotz Anwesenheit des CFTR Cl<sup>-</sup> Kanal Blockers Glibenclamid in der Lage, im ventralen und dorsalen Kolonsegment einen signifikanten Anstieg des maximalen I<sub>SC</sub> zu induzieren. Der 10 Minuten Wert hingegen war außer bei der Kontrolle mit DMSO im ventralen Kolon deutlich gehemmt.

Sowohl die durchgeführten Versuche nach Vorbehandlung mit Indomethacin als auch mit Glibenclamid konnten einen im Vergleich zu basalen Bedingungen niedrigeren Anstieg des Carbachol induzierten Kurzschlussstroms in beiden Kolonsegmenten bewirken, welcher aber immer noch im Vergleich zur Ausgangssituation signifikant erhöht ist. Durch die Zugabe von Glibenclamid wurde der CFTR Cl<sup>-</sup> Kanal blockiert, welcher durch Prostaglandine aktiviert wird. Trotz der Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Indomethacin und trotz der Blockade dieses Kanals kam es zu einem Anstieg des I<sub>SC</sub>. Beide Versuche lassen eine alternative Cl<sup>-</sup> Leitfähigkeit, beispielsweise eine Ca<sup>2+</sup> abhängige, vermuten.

Eine unzureichende Blockade der Cyclooxygenase durch Indomethacin oder des CFTR Cl<sup>-</sup> Kanals durch Glibenclamid ist als eher unwahrscheinlich anzusehen, da sich Unterschiede im dorsalen und ventralen Kolon unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen nachweisen ließen. Schlussfolgern kann man daraus eine Beteiligung der CFTR Cl<sup>-</sup> Kanäle an der Carbachol induzierten Cl<sup>-</sup> Sekretion, allerdings scheinen noch andere Cl<sup>-</sup> Kanäle an der Cl<sup>-</sup> Sekretion beteiligt zu sein. Im Gegensatz zur dorsalen Kolonlage scheint dabei der CFTR Cl<sup>-</sup>

Kanal im ventralen Kolon des Pferdes basal aktiv zu sein, da es hier zu einem Abfall des  $I_{SC}$  nach der Zugabe von Glibenclamid kam.

#### 4. 4.2.2 Der $Ca^{2+}$ abhängige $Cl^-$ Kanal

Bei einigen Spezies, aber bislang nicht beim Pferd, ist die Existenz von  $Ca^{2+}$  abhängigen  $Cl^-$  Kanälen (ClCa) bekannt (RAN et al., 1992). Eine mögliche Beteiligung dieser Kanäle an der Carbachol induzierten  $Cl^-$  Sekretion wurde in den eigenen Untersuchungen durch die Zugabe von DIDS und SITS untersucht. Bei beiden Substanzen handelt es sich um potente Blocker von ClCa Kanälen, welche aber nicht selektiv sind. Die eigenen Ergebnisse zeigen allerdings in beiden Segmenten keine signifikanten Änderungen des Carbachol induzierten  $I_{SC}$  (siehe Abbildungen 13 A und B sowie 14 A und B) weder in der Peak noch in der 10 Minuten Phase.

Zu Beginn der Diskussion wurde bereits darauf eingegangen, dass Carbachol am Kolon des Pferdes wesentlich geringere Änderung des  $I_{SC}$  hervorruft als dies bei ähnlichen Versuchen am Kolon der Ratte zu beobachten ist. Möglicherweise hängt die fehlende Wirkung von DIDS und SITS mit den wesentlich geringeren  $I_{SC}$  Änderungen am Pferdekolon zusammen. Dies könnte dazu führen, dass eine Blockade der ClCa unterhalb der Messgenauigkeit der Technik liegt. Um die eventuelle Existenz dieser Kanäle definitiv nachweisen, bzw. ausschließen zu können, müssten zur genaueren Abklärung Versuche mit der Patch Clamp Technik folgen.

Im Folgenden wurde mit Hilfe der Technik der basolateralen Depolarisation versucht, eine CFTR unabhängige  $Cl^-$  Sekretion durch Carbachol zu induzieren. Hierzu wurde zusätzlich zu einem  $K^+$  Gradienten ein  $Cl^-$  Gradient von serosal nach mucosal angelegt (111,5 mM KCl serosal und 107 mM Na Gluconat und 4,5 mM KCl mucosal). Auch bei diesem Versuch konnten nach der Zugabe von Carbachol in beiden Kolonsegmenten keine Änderungen des  $I_{SC}$  beobachtet werden (siehe Abbildung 15 A und B). Im darauf folgenden Versuch wurde nach oben genannter basolateraler Depolarisation zusätzlich Glibenclamid zugegeben. Es kam im ventralen Segment zu einem Abfall des  $I_{SC}$  sowohl nach der Blockade des CFTR  $Cl^-$  Kanals, als auch nach der Zugabe von Carbachol (siehe Abbildung 16 A und B). Man kann anhand dieser Versuche im ventralen Kolonsegment des Pferdes von der Anwesenheit des CFTR  $Cl^-$  Kanals ausgehen. Es kommt erst in Anwesenheit des Blockers zu einem  $I_{SC}$  Abfall und auch erst dann kann man nach Carbachol Zugabe eine  $I_{SC}$  Reaktion beobachten. Eine mögliche Erklärung wurde im Vorfeld bei der Anwesenheit von apikalen  $K^+$  Kanälen

diskutiert. Eine Sekretion von  $K^+$  Ionen spiegelt sich in einem Abfall des  $I_{SC}$  wieder. Die fehlende Reaktion der alleinigen Carbachol Zugabe ohne vorherige Blockade des CFTR  $Cl^-$  Kanals lässt eine gegenseitige Aufhebung sowohl von  $K^+$  als auch von  $Cl^-$  Ionen vermuten, bei der sich der zu messende  $I_{SC}$  nicht ändert. Aufschluss hierüber ist ebenfalls mittels der Patch Clamp Technik und der damit verbundenen größeren Auflösung möglich.

KUNZELMANN et al. (1997) untersuchten an *Xenopus laevis* (afrikanischer Krallenfrosch) Oocyten die Wirkung des CFTR  $Cl^-$  Kanals auf die  $Ca^{2+}$  abhängige  $Cl^-$  Leitfähigkeit. Er fand heraus, dass der CFTR  $Cl^-$  Kanal nach Aktivierung durch das Methylxanthin IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthin) welches die Phosphodiesterase hemmt und somit zu einem Anstieg der cAMP Konzentration führt, eine hemmende Wirkung auf die  $Ca^{2+}$  abhängige  $Cl^-$  Leitfähigkeit hat. Auch in den eigenen Versuchen wurde die Aktivität des CFTR  $Cl^-$  Kanals durch Glibenclamid gehemmt und somit dessen Hemmung auf den  $ClCa$  aufgehoben. Trotzdem ließ sich nach Carbacholzugabe keine zusätzliche  $Cl^-$  Sekretion beobachten. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre keine weitere  $Cl^-$  Leitfähigkeit (zusätzlich zum CFTR) oder eine Überlagerung der  $Cl^-$  Sekretion durch zeitgleiche  $K^+$  Sekretion.

Zusammenfassend kann man aus den eigenen Untersuchungen erhaltenen Ergebnissen folgern, dass die in beiden Kolonsegmenten des Pferdes zu beobachtende Resistenz gegenüber Indomethacin sowie die  $I_{SC}$  Hemmung im dorsalen rechten Kolon durch Tetrapentylammonium auf eine mögliche direkte und indirekte Aktivierung der  $Cl^-$  Sekretion hindeuten. Des weiteren kann man sowohl auf eine epithelial als auch subepithelial vermittelte Reaktion im ventralen Kolon des Pferdes schließen als auch auf die Existenz von apikalen  $K^+$  Kanälen.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt (Kapitel 1.3, Seite 5) resultiert eine sekretorische Diarrhoe häufig aus einer gesteigerten  $Cl^-$  Sekretion in das Darmlumen. Da sich bei dem Krankheitsbild der Colitis X die pathologisch-anatomischen Veränderungen häufig auf das Zäkum und die rechte ventrale Kolonlage beschränken, wäre eine unterschiedlich Aktivierung einer  $Cl^-$  Leitfähigkeit im ventralen Kolonsegment welche im dorsalen nicht vorhanden ist eine mögliche, wenn auch sehr spekulative Erklärung.

In der vorliegenden Arbeit wurden die rechte dorsale und ventrale Kolonlage von Warmblutpferden miteinander anhand der durchgeführten Versuche verglichen und einige hier diskutierte Unterschiede herausgefunden. Es empfiehlt sich in folgenden Studien mit der

Patch clamp Technik an diesem Gewebe weiter zu forschen, da mit dieser Technik eine wesentlich sensiblere Auflösung erzielt werden kann als mit der Technik der Ussing-Kammer.

## 5. Zusammenfassung

Akute Durchfallerkrankungen kommen weltweit bei Pferden vor. Ihre besondere Bedeutung liegt zum einen in ihrem häufig letalen Ausgang, zum anderen kann ihre Therapie sehr zeit- und kostenaufwendig sein. Eine beim adulten Pferd wichtige Erkrankung des Dickdarms ist die Colitis X. Hierbei handelt es sich um eine hämorrhagisch-nekrotisierende Typhlocolitis, welche auch bei intensiver Therapie durch die massiven Flüssigkeitsverluste in 75-95 % der Fälle zu einem letal endenden hypovolämischen Schockgeschehen führt.

Ursache der Hypersekretion ist eine gesteigerte  $\text{Cl}^-$  Sekretion, über deren Regulation beim Pferd bisher wenig bekannt ist.

Mittels der elektrophysiologischen Technik der Ussing-Kammer, bei der eine Nettoionensekretion in Form eines Stroms gemessen werden kann, wurde der Einfluss von Carbachol, einem stabilen Acetylcholinderivat, auf die  $\text{Cl}^-$  Sekretion an der rechten dorsalen und rechten ventralen Kolonlage untersucht. An anderen Spezies konnte gezeigt werden, dass Carbachol entweder direkt oder indirekt eine  $\text{Cl}^-$  Sekretion induzieren kann.

Unter basalen Bedingungen induziert Carbachol eine  $\text{Cl}^-$  Sekretion in beiden Kolonsegmenten. Eine Beteiligung von Neuronen bei dieser Sekretion ist vorhanden, denn die Blockade von neuronalen  $\text{Na}^+$  Kanälen mittels des Kugelfischgiftes Tetrodotoxin hemmt diese Sekretion signifikant. Ähnlich wie beim Labornager konnte gezeigt werden, dass die Carbachol induzierte  $\text{Cl}^-$  Sekretion auch durch die Aktivierung des CFTR  $\text{Cl}^-$  Kanals durch Prostaglandine reguliert wird, deren Synthese durch den Cyclooxygenasehemmer Indomethacin inhibiert wurde. Eine Blockade dieses Kanals durch Glibenclamid führte in der rechten ventralen Kolonlage zu einer Hemmung des Ionenstroms. Es zeigte sich nach der Blockade von  $\text{K}^+$  Kanälen durch Tetrapentylammonium eine vollständige Hemmung des Carbachol induzierten  $I_{\text{SC}}$  im dorsalen Segment, während ventral nur eine partielle Hemmung vorlag. Durch DIDS und SITS wurde versucht den  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen  $\text{Cl}^-$  Kanal zu inhibieren, aber es kam in beiden Kolonsegmenten zu keiner signifikanten Änderung des Carbachol induzierten  $I_{\text{SC}}$ . Das zeigt, dass der Glibenclamid resistente Carbachol induzierte  $\text{Cl}^-$  Strom nicht durch diesen Kanal geht.

Im ventralen Kolonsegment konnte, nach Ausschalten der basolateralen Membran mit Hilfe hoher  $\text{K}^+$  Konzentrationen in der serosalen Badlösung und nach Hemmung des CFTR  $\text{Cl}^-$  Kanals durch Glibenclamid ein  $\text{K}^+$  Strom über die apikale Membran induziert werden.

Zusammenfassend kann man aufgrund der eigenen Versuchsergebnisse von einer direkten sowie indirekten Aktivierung der  $\text{Cl}^-$  Sekretion ausgehen. Sowohl bei der direkten als auch bei

der indirekten Aktivierung konnten Differenzen zwischen dem rechten ventralen und dorsalen Kolon gezeigt werden. Aus den eigenen Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass die Regulation der Sekretion im ventralen Kolon des Pferdes sowohl epithelial als auch subepithelial vermittelt ist. Des Weiteren konnte die Existenz von apikalen  $K^+$  Kanälen im ventralen Segment nachgewiesen werden.

## 6. Summary

The acute diarrhea is an often occurring disease in the horse. One of the most important causes in adult horses is the colitis x, a hemorrhagic necrotizing typhlocolitis. Even with intensive therapy the loss of fluid leads in 75-95 % of cases to an lethal hypovolemic shock. Cause of this hypersecretion in the colon is an increase of chloride secretion. The regulatory mechanisms of this secretion are generally unknown in horses.

Mucosa and submucosa of the right ventral and dorsal colon was mounted in ussing chambers, where net ion secretion of chloride in the presence of carbachol is measured as short-circuit current ( $I_{SC}$ ).

As demonstrated by data obtained with rat colonic mucosae, chloride secretion can be induced directly and indirectly i.e. activator of chloride conductance and potassium conductance respectively.

In horses the cholinergic agonist carbachol induces under basal conduction a chloride secretion in both colonic compartment, i.e. the right ventral and dorsal part of the colon.

In the present study can be demonstrated that the chloride secretion is also influenced by enteric nerves system, cause inhibition of neuronal sodium channels with tetrodotoxin decreases the carbachol induced  $I_{SC}$ . Similar to studies with rats, prostaglandins were involved in the secretion by stimulating the CFTR chloride channel. Inhibition of prostaglandin synthesis with indomethacin therefore reduce the chloride secretion in both segments of the colon. In contrast to the dorsal part of the colon inhibition of the CFTR chloride channel with glibenclamide has only a significant effect in the ventral part of the right colon.

In this thesis the inhibition of the potassium channels with tetrapentylammonium results in a significant decrease of  $I_{SC}$  in both parts of the colon, but the carbachol induced  $I_{SC}$  in the dorsal colon was totally prevented.

In the presence of glibenclamide, carbachol induced a significant increase in  $I_{SC}$ . Therefore besides CFTR another chloride conductance could be activated by cholinergic agonist. Since stilbens known for their blocking capacity of calcium dependent chloride channels did not influence the carbachol induced chlorid secretion. This types of chlorid channels seems to be involved. After basolateral depolarisation and inhibition of the CFTR chloride channel with glibenclamide a potassium secretion could be induced by carbachol only in the ventral colon.

Taken together there are direct and indirect regulatory mechanism by which carbachol induces a chloride secretion in the equine colon.

In both ways the study demonstrated differences between dorsal and ventral right part of the colon. One conclusion of the present study is that the regulation of the chloride secretion is localized in the epithelial and subepithelial layer. Furthermore the presence of apical potassium channels in the ventral part of the colon was demonstrated.

## 7. Literaturverzeichnis

- Akabas, M.H.; Kaufmann, C.; Cook, T.A.; und Archdeacon, P. (1994)  
 Amino acid residues lining the chloride channel of the cystic fibrosis transmembrane  
 conductance regulator  
 J.Biol.Chem. 269 (21), 14865-14868
- Akabas, M.H.; Cheung, M.; und Guinamard, R. (1997)  
 Probing the structural and functional domains of the CFTR chloride channel  
 J.Bioenerg.Biomembr. 29 (5), 453-463
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; und Watson, J.D. (1995)  
 Membrantransport kleiner Moleküle und Ionen als Grundlage der Membranerregbarkeit  
 In: Molekularbiologie der Zelle. Hrsg.: Jaenicke, L., 3.Auflage, VCH Verlagsgesellschaft,  
 Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 599-650
- Amtsberg, G. (2004)  
 Clostridium difficile und Clostridium perfringens: Vorkommen im Darmkanal hospitalisierter  
 Pferde und ursächliche Bedeutung im Typhlocolitisgeschehen  
 BPT-Kongress, 4. – 7. November 2004, Nürnberg; S. 5-10
- Anderson, M.P.; Berger, H.A.; Rich, D.P.; Gregory, R.J.; Smith, A.E.; und Welsh, M.J.  
 (1991)  
 Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel  
 Cell. 67: 775-784
- Anderson, M.P. und Welsh, M.J. (1991)  
 Calcium and cAMP activate different chloride channels in the apical membrane of normal and  
 cystic fibrosis epithelia  
 Proc.Natl.Acad.Sci. USA 88 (14), 6003-6007
- Andres, H.; Rock, R.; Bridges, R.J.; Rummel, W.; und Schreiner, J. (1985)  
 Submucosal plexus and electrolyte transport across rat colonic mucosa  
 J.Physiol. 364, 301-312

Argenzio, R.A.; Lowe, J.E.; Pickard, D.W.; und Stevens, C.E. (1974)

Digesta passage and water exchange in the equine large intestine

Am.J.Physiol. 226 (5), 1035-1042

Beavo, J.A. und Reifsnyder, D.H. (1990)

Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors

Trends Pharmacol.Sci. 11 (4), 150-155

Beubler, E. und Juan, H. (1978)

PGE-release, blood flow and transmucosal water movement after mechanical stimulation of the rat jejunal mucosa

Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 305 (1), 91-95

Binder, H.J. und Sandle, G.I. (1994)

Electrolyte transport in the mammalian colon

In: Physiology of the gastrointestinal tract-Volume 2, third edition, Hrsg: Johnson, L.R.

Raven Press, New York, 64: 2133-2171

Björnhag, G. (1972)

Seperation and delay of contents in the rabbit colon

Swed.J.Agric.Res. 2, 125-136

Björnhag, G. und Sperber, I. (1977)

Transport of various food components through the digestive tract of turkeys, geese and guinea fowl

Swed.J.Agric.Res. 7, 57-66

Björnhag, G. (1981)

The retrograde transport of fluid in the proximal colon of rabbits

Swed.J.Agric.Res. 11, 63-69

Björnhag, G.; Sperber, I.; und Holtenius, K. (1984)

A seperation mechanism in the large intestine of equines

Can.J.Anim.Sci 64, 89-90

Björnhag, G. (1989)

Sufficient fermentation and rapid passage of digesta. A problem of adaption in the hindgut  
*Acta vet.scand.*, 204-211

Bleich, M.; Riedemann, N.; Warth, R.; Kerstan, D.; Leipziger, J.; Hor, M.; Driessche, W.V.;  
und Greger, R. (1996)

Ca<sup>2+</sup> regulated K<sup>+</sup> and non-selective cation channels in the basolateral membrane of rat  
colonic crypt base cells

*Pflügers Arch.* 432 (6), 1011-1022

Bleich, M. und Warth, R. (2000)

The very small-conductance K<sup>+</sup> channel KvLQT1 and epithelial function

*Pflügers Arch.* 440 (2), 202-206

Bohme, M.; Diener, M.; und Rummel, W. (1991)

Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts

*Pflügers Arch.* 419 (2), 144-151

Campbell, N.B.; Jones, S.L.; und Blikslager, A.T. (2002)

The effects of cyclo-oxygenase inhibitors on bile-injured and normal equine colon

*Equine Vet.J.* 34 (5), 493-498

Catterall, W.A. (1995)

Structure and function of voltage-gated ion channels

*Annu.Rev.Biochem.* 64, 493-531

Clarke, L.L. und Argenzio, R.A. (1990)

NaCl transport across equine proximal colon and the effect of endogenous prostanoids

*Am.J.Physiol* 259 (1 Pt 1), G62-G69

Cooke, H.J. und Reddix, R.A. (1994)

Neuronal regulation of intestinal electrolyte transport

In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Hrsg.: Johnson, L.R., 3.Auflage, Raven Press,  
New York, 2083-2132

Craven, P.A. und De Rubertis, F.R. (1981)

Stimulation of rat colonic mucosal prostaglandin synthesis by calcium and carbamylcholine: relationship to alterations in cyclic nucleotide metabolism

Prostaglandins 21 (1), 65-81

Craven, P.A. und Derubertis, F.R. (1984)

Phospholipid methylation in the calcium-dependent release of arachidonate for prostaglandin synthesis in renal medulla

J.Lab Clin.Med. 104 (4), 480-493

Curtis-Prior, P.B. (1976)

Agents affecting prostaglandin metabolism

In: Prostaglandins.An Introduction to their Biochemistry, Physiology and Pharmacology.

Hrsg.: Curtis-Prior, P.B., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York,

Oxford, 41-54

Deegen, E. (2000)

Formen der Typhlocolitis beim Pferd

1. Internationale Fortbildungstagung für Pferdemediziner, 30. April 2000, Kärnten, 93-100

Deegen, E.; Ohnesorge, B.; Harps, O.; und Becker, J. (1994)

Typhlocolitis beim Pferd, Kasuistik des Jahres 1992

in: Symposium, Typhlokolitis beim Pferd, 11.März 1993, Huskamp, B., Kemper, P., 31-34

Deegen, E.; Radicke, S.; und Meyer, H. (1995)

Untersuchungen über den Einfluss eines Nahrungsentzuges auf Verhalten, Blutparameter und Füllung des Darmkanals beim Pferd

Pferdeheilkunde 11, 345-352

Diener, M.; Bridges, R.J.; Knobloch, S.F.; und Rummel, W. (1988a)

Indirect effects of bradykinin on ion transport in rat colon descendens: mediated by prostaglandins and enteric neurons

Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 337 (1), 69-73

Diener, M.; Bridges, R.J.; Knobloch, S.F.; und Rummel, W. (1988b)

Neuronally mediated and direct effects of prostaglandins on ion transport in rat colon descendens

Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 337 (1), 74-78

Diener, M.; Knobloch, S.F.; Bridges, R.J.; Keilmann, T.; und Rummel, W. (1989)

Cholinergic-mediated secretion in the rat colon: neuronal and epithelial muscarinic responses

Eur.J.Pharmacol. 168 (2), 219-229

Diener, M.; Egleme, C.; und Rummel, W. (1991)

Phospholipase C-induced anion secretion and its interaction with carbachol in the rat colonic mucosa

Eur.J.Pharmacol. 200, 267-276

Diener, M.; Nobles, M.; Schmitt, C.; und Rummel, W. (1992)

Characterization of the antisecretory action of prostaglandin D2 in the rat colon

Acta Physiol. Scand. 145, 19-24

Diener, M. und Scharrer, E. (1995)

Swelling-activated conductances for chloride, potassium and amino acids in the rat colon: a whole-cell study

Exp.Physiol. 80 (3), 411-428

Doige, C.A. und Ames, G.F. (1993)

ATP-dependent transport systems in bacteria and humans: relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance

Annu.Rev.Microbiol. 47, 291-319

Dudel, J. (1995)

Grundlagen der Zellphysiologie

In: Physiologie des Menschen Hrsg.: Schmidt, R.F., Thews, G., 26. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Mailand, Paris, Tokyo, 3-19

Ecke, D.; Bleich, M.; und Greger, R. (1996)

The amiloride inhibitable  $\text{Na}^+$  conductance of rat colonic crypt cells is suppressed by forskolin

Pflügers Arch. 431 (6), 984-986

Evans, S.R.; Thoreson, W.B.; und Beck, C.L. (2004)

Molecular and functional analyses of two new calcium-activated chloride channel family members from mouse eye and intestine

J.Biol.Chem. 279 (40), 41792-41800

Fischer, H.; Kreusel, K.M.; Illek, B.; Machen, T.E.; Hegel, U.; und Clauss, W. (1992)

The outwardly rectifying  $\text{Cl}^-$  channel is not involved in cAMP-mediated  $\text{Cl}^-$  secretion in HT-29 cells: evidence for a very-low-conductance  $\text{Cl}^-$  channel

Pflügers Arch. 422 (2), 159-167

Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; und Starke, K. (1996)

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker  
Spektrum, Akademischer Verlag, 6.Auflage

Foskett, J.K. (1998)

ClC and CFTR chloride channel gating

Annu.Rev.Physiol. 60, 689-717

Frings, M.; Schultheiss, G.; und Diener, M. (1999)

Electrogenic  $\text{Ca}^{2+}$  entry in the rat colonic epithelium

Pflügers Arch. 439 (1-2), 39-48

Frizzell, R.A.; Field, M.; und Schultz, S.G. (1979)

Sodium-coupled chloride transport by epithelial tissues

Am.J.Physiol. 236 (1), F1-F8

Fromm, M. und Hierholzer, K. (1995)

Stoffaufnahme- und Ausscheidung

In: Physiologie des Menschen. Hrsg.: Schmidt, R.F., Thews, G., 26. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Mailand, Paris, Tokyo, 719-736

Fuchs, W.; Larsen, E.H.; und Lindemann, B. (1977)

Current-voltage curve of sodium channels and concentration dependence of sodium permeability in frog skin

J.Physiol 267 (1), 137-166

Garmory, H.S.; Chanter, N.; French, N.P.; Bueschel, D.; Songer, J.G.; und Titball, R.W. (2000)

Occurrence of Clostridium perfringens beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays

Epidemiol.Infect. 124 (1), 61-67

Gawenis, L.R.; Franklin, C.L.; Simpson, J.E.; Palmer, B.A.; Walker, N.M.; Wiggins, T.M.; und Clarke, L.L. (2003)

cAMP inhibition of murine intestinal Na/H exchange requires CFTR-mediated cell shrinkage of villus epithelium

Gastroenterology 125 (4), 1148-1163

Gerber, V. und Straub, R. (2004)

Therapie der Typhlocolitis des adulten Pferdes

BPT-Kongress, 4. – 7. November 2004, Nürnberg; S. 19-24

Gogelein, H. und Greger, R. (1986)

A voltage-dependent ionic channel in the basolateral membrane of late proximal tubules of the rabbit kidney

Pflügers Arch. 407 Suppl 2, S142-S148

Gogelein, H.; Schlatter, E.; und Greger, R. (1987)

The "small" conductance chloride channel in the luminal membrane of the rectal gland of the dogfish (*Squalus acanthias*)

Pflügers Arch. 409 (1-2), 122-125

Gogelein, H.; Dahlem, D.; Englert, H.C.; und Lang, H.J. (1990)

Flufenamic acid, mefenamic acid and niflumic acid inhibit single nonselective cation channels in the rat exocrine pancreas

FEBS Lett. 268 (1), 79-82

Greger, R. (2000)

Role of CFTR in the colon

Annu.Rev.Physiol. 62, 467-491

Greiß, C.; Verspohl, J.; Kropp, S.; Rohde, J.; Pohlenz, J.; Scheidemann, W.; Deegen, E.; und Amtsberg, G. (1996)

Die Zusammensetzung der Caecalflora des Pferdes und ihre mögliche Bedeutung für die Entstehung der Typhlocolitis

Pferdeheilkunde 12, 725-736

Gruber, A.D.; Elble, R.C.; Ji, H.L.; Schreur, K.D.; Fuller, C.M.; und Pauli, B.U. (1998)

Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human CLCA1, the first human member of the family of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel proteins

Genomics 54 (2), 200-214

Gürtler, H. (1989)

Physiologie der Verdauung und Resorption

In: Lehrbuch der Physiologie der Haustiere. Hrsg.: Kolb, E., 5.Auflage, Teil I, VEB Gustav Fischer Verlag, 196-367

Hasselblatt, A. (1996)

Therapie des Diabetes mellitus

In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker Hrsg.: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K., 6. Auflage, Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 512-527

Henschler, D. (1996)

Wichtige Gifte und Vergiftungen

In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker Hrsg.: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K., 6. Auflage, Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 747-841

Herholz, C.; Miserez, R.; Nicolet, J.; Frey, J.; Popoff, M.; Gibert, M.; Gerber, H.; und Straub, R. (1999)

Prevalence of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders  
J.Clin.Microbiol. 37 (2), 358-361

Hermann, M. (1985)

Die Colitis X beim Pferd: 9 Fälle

Schweiz.Arch.Tierheilkd. 127 (6), 385-396

Higgins, G.L. (1992)

Trust: the matrix of the health care enterprise

Humane Med. 8 (4), 286-293

Howell, L.D.; Borchardt, R.; und Cohn, J.A. (2000)

ATP hydrolysis by a CFTR domain: pharmacology and effects of G551D mutation  
Biochem.Biophys.Res.Commun. 271 (2), 518-525

Hu, S.; Kim, H.S.; Lappe, R.W.; und Webb, R.L. (1993)

Coupling of endothelin receptors to ion channels in rat glomerular mesangial cells  
J.Cardiovasc.Pharmacol. 22 Suppl 8, S149-S153

Hudson, R.S. (1968)

Acute equine colitis

Auburn Vet. 24, 92-96

Huskamp, B.; Kopf, N.; und Scheidemann, W. (1999)

Magen-Darm-Trakt

In: Handbuch Pferdepraxis, Hrsg.: Dietz, O., Huskamp, B., 2. Auflage, Enke Verlag Stuttgart, 411-501

Hwang, O.; Kim, M.L.; und Lee, J.D. (1994)

Differential induction of gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes and preferential increase in norepinephrine by forskolin

Biochem.Pharmacol. 48 (10), 1927-1934

Insel, T.R. (1990)

New pharmacologic approaches to obsessive compulsive disorder

J.Clin.Psychiatry 51 Suppl, 47-51

Kenyon, J.L. und Gibbons, W.R. (1977)

Effects of low-chloride solutions on action potentials of sheep cardiac Purkinje fibers

J.Gen.Physiol 70 (5), 635-660

Klaerke, D.A.; Wiener, H.; Zeuthen, T.; und Jorgensen, P.L. (1993)

Ca<sup>2+</sup> activation and pH dependence of a maxi K<sup>+</sup> channel from rabbit distal colon epithelium

J.Membr.Biol. 136 (1), 9-21

Ko, Y.H.; Thomas, P.J.; Delannoy, M.R.; und Pedersen, P.L. (1993)

The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Overexpression, purification, and characterization of wild type and delta F508 mutant forms of the first nucleotide binding fold in fusion with the maltose-binding protein

J.Biol.Chem. 268 (32), 24330-24338

Ko, Y.H. und Pedersen, P.L. (2001)

Cystic fibrosis: a brief look at some highlights of a decade of research focused on elucidating and correcting the molecular basis of the disease

J.Bioenerg.Biomembr. 33 (6), 513-521

Kubitz, R.; Warth, R.; Allert, N.; Kunzelmann, K.; und Greger, R. (1992)

Small-conductance chloride channels induced by cAMP,  $Ca^{2+}$ , and hypotonicity in HT29 cells: ion selectivity, additivity and stilbene sensitivity

Pflügers Arch. 421 (5), 447-454

Kunzelmann, K.; Mall, M.; Briel, M.; Hipper, A.; Nitschke, R.; Ricken, S.; und Greger, R. (1997)

The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator attenuates the endogenous  $Ca^{2+}$  activated  $Cl^-$  conductance of *Xenopus* oocytes

Pflügers Arch. 435 (1), 178-181

Kuwahara, A.; Tien, X.Y.; Wallace, L.J.; und Cooke, H.J. (1987)

Cholinergic receptors mediating secretion in guinea pig colon

J.Pharmacol.Exp.Ther. 242 (2), 600-606

Lauk, H.D.; Plocki, K.A.; Jaenich, U.; und Neuhaus, F. (1987)

Colitis "X" beim hospitalisierten Pferd

Pferdeheilkunde 3, 109-115

Lindqvist, S.M.; Sharp, P.; Johnson, I.T.; Satoh, Y.; und Williams, M.R. (1998)

Acetylcholine-induced calcium signaling along the rat colonic crypt axis

Gastroenterology 115 (5), 1131-1143

Löffler, G. (1998)

Grundlagen der endokrinen Regulation von Lebensvorgängen

In: Biochemie und Pathobiochemie Hrsg.: Löffler, G., Petrides, P.E., 6. Auflage, Springer Verlag, 761-787

- Mall, M.; Bleich, M.; Kuehr, J.; Brandis, M.; Greger, R.; und Kunzelmann, K. (1999)  
CFTR-mediated inhibition of epithelial Na<sup>+</sup> conductance in human colon is defective in cystic fibrosis  
Am.J.Physiol 277 (3 Pt 1), G709-G716
- Markert, T.; Vaandrager, A.B.; Gambaryan, S.; Pohler, D.; und Hauser, C. (1999)  
Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestinae. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator  
J.Clin.Invest. 96, 822-830
- Martin, S.C. und Shuttleworth, T.J. (1994)  
Vasoactive intestinal peptide stimulates a cAMP-mediated Cl<sup>-</sup> current in avian salt gland cells  
Regul.Pept. 52 (3), 205-214
- Merlin, D.; Jiang, L.; Strohmeier, G.R.; Nusrat, A.; Alper, S.L.; Lencer, W.I.; und Madara, J.L. (1998)  
Distinct Ca<sup>2+</sup>- and cAMP-dependent anion conductances in the apical membrane of polarized T84 cells  
Am.J.Physiol 275 (2 Pt 1), C484-C495
- Messer, N.T. (1975)  
Acute colitis syndrome: Clinical problems in private practice. 14. Proceedings-Workshop on acute colitis in horse.  
Am.Assoc.Equine Pract. Newsletter 2, (44)
- Meyer, H. (1992)  
Bau und Funktion der Verdauungsorgane  
In: Pferdefütterung Hrsg.: Meyer, H., 2. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg, 23-38
- Murray, K.T.; Fahrig, S.A.; Deal, K.K.; Po, S.S.; Hu, N.N.; Snyders, D.J.; Tamkun, M.M.; und Bennett, P.B. (1994)  
Modulation of an inactivating human cardiac K<sup>+</sup> channel by protein kinase C  
Circ.Res. 75 (6), 999-1005

Nickel, R.; Schummer, A.; Seiferle, E. (1987)

Verdauungsapparat

In: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Hrsg.: Paul Parey Verlag Berlin, Hamburg; Band II,  
6. Auflage; S. 203

Nicpon, J.; Czerw, P.; und Zowadzki, W. (2000)

Research of pathomechanisms and therapy of colitis x

Electronic journal of polish agriculture universities

Nielsen, M.S.; Warth, R.; Bleich, M.; Weyand, B.; und Greger, R. (1998)

The basolateral  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^{+}$  channel in rat colonic crypt cells

Pflügers Arch. 435 (2), 267-272

Nilius, B. und Droogmans, G. (2001)

Ion channels and their functional role in vascular endothelium

Physiol. Rev. 81 (4), 1415-1459

Nobles, M.; Diener, M.; Mestres, P.; und Rummel, W. (1991)

Segmental heterogeneity of the rat colon in the response to activators of secretion on the  
cAMP-, the cGMP- and the  $\text{Ca}^{2+}$ -pathway

Acta Physiol. Scand. 142 (3), 375-386

Owen, R. (1975)

Post stress diarrhoea in the horse

Vet.Rec. 96 (12), 267-270

Parsons, D.S. und Paterson, C.R. (1965)

Fluid and solute transport across rat colonic mucosa

Q.J.Exp.Physiol. Cogn. Med. Sci. 50, 220-231

Peskar, B.A. (2001)

Derivate des Arachidonsäurestoffwechsels

In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker Hrsg.: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U., Starke, K., 8. Auflage, Urban und Fischer Verlag München, Jena, 381-391

Pfeiffer, C.J. und Mac Pherson (1990)

Anatomy of the gastrointestinal tract and peritoneal cavity

In: The equine acute abdomen Hrsg.: White, N.A., Lea & Febiger, Philadelphia, 2-24

Pohlenz, J.; Stockhofe-Zurwieden, N.; und Rudat, R. (1992)

Pathology and potential pathogenesis of typhlocolitis in horses

1. Europäische Konferenz über die Ernährung des Pferdes, Pferdeheilkunde Sonderheft, 201-206

Pothoulakis, C. (2000)

Effects of Clostridium difficile toxins on epithelial cell barrier

Ann.N.Y.Acad.Sci. 915, 347-356

Prescott, J.F.; Staempfli, H.R.; Barker, I.K.; Bettoni, R.; und Delaney, K. (1988)

A method for reproducing fatal idiopathic colitis (colitis X) in ponies and isolation of a clostridium as a possible agent

Equine Vet.J. 20 (6), 417-420

Puotunen-Reinert, A. und Huskamp, B. (1986)

Acute postoperative diarrhoea in colic horses

J.S.Afr.Vet.Assoc. 57 (1), 5-11

Quast, U. und Cook, N.S. (1989)

Moving together: K<sup>+</sup> channel openers and ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels

Trends Pharmacol.Sci. 10 (11), 431-435

Ran, S.; Fuller, C.M.; Arrate, M.P.; Latorre, R.; und Benos, D.J. (1992)  
Functional reconstitution of a chloride channel protein from bovine trachea  
J.Biol.Chem. 267 (29), 20630-20637

Randak, C.; Neth, P.; Auerswald, E.A.; Eckerskorn, C.; Assfalg-Machleidt, I.; und Machleidt, W. (1997)  
A recombinant polypeptide model of the second nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator functions as an active ATPase, GTPase and adenylate kinase  
FEBS Lett. 410 (2-3), 180-186

Rooney, J.R.; Ryans, J.T.; und Doll, E.R. (1963)  
Colitis "X" of horses  
J.A.V.M.A 142 (5), 510-511

Rooney, J.R.; Bryans, J.T.; Prickett, M.E.; und Zent, W.W. (1966)  
Exhaustion shock in the horse  
Cornell Vet. 56 (2), 220-235

Rose, J.A. (1975)  
Acute diarrheal disease in the horse-clinical problems in private practice  
Proc. Workshop acute colitis, Am.Ass.Equine Pract. Newsletter 2, 42-51

Schiefer, H.B. (1981)  
Equine colitis "X", still an enigma?  
Can.Vet.J. 22 (5), 162-165

Schultheiss, G. und Diener, M. (1997)  
Regulation of apical and basolateral K<sup>+</sup> conductances in rat colon  
Br.J.Pharmacol. 122 (1), 87-94

Schultheiss, G.; Horger, S.; und Diener, M. (1998)  
The bumetanide-resistant part of forskolin-induced anion secretion in rat colon  
Acta Physiol. Scand. 164 (2), 219-228

- Schultheiss, G.; Frings, M.; Hollingshaus, G.; und Diener, M. (2000)  
Multiple action sites of flufenamate on ion transport across the rat distal colon  
Br.J.Pharmacol. 130 (4), 875-885
- Schultheiss, G.; Frings, M.; und Diener, M. (2000)  
Carbachol-induced  $\text{Ca}^{2+}$  entry into rat colonic epithelium  
Ann.N.Y.Acad.Sci. 915, 260-263
- Schultheiss, G.; Ribeiro, R.; Schafer, K.H.; und Diener, M. (2003)  
Activation of apical  $\text{K}^{+}$  conductances by muscarinic receptor stimulation in rat distal colon:  
fast and slow components  
J.Membr.Biol. 195 (3), 183-196
- Schultz, B.D.; Singh, A.K.; Devor, D.C.; und Bridges, R.J. (1999)  
Pharmacology of CFTR chloride channel activity  
Physiol. Rev. 79 (1 Suppl), S109-S144
- Schumacher, P.A.; Sakellaropoulos, G.; Phipps, D.J.; und Schlichter, L.C. (1995)  
Small-conductance chloride channels in human peripheral T lymphocytes  
J.Membr.Biol. 145 (3), 217-232
- Sokol, P.T.; Hu, W.; Yi, L.; Toral, J.; Chandra, M.; und Ziai, M.R. (1994)  
Cloning of an apamin binding protein of vascular smooth muscle  
J.Protein Chem. 13 (1), 117-128
- Sperber, I. (1968)  
Physiological mechanism in herbivores for retention and utilization of nitrogenous compounds  
In: Isotope studies on the nitrogen chain. Vienna: IAEA, 209-219
- Sperber, I.; Björnhag, G.; und Ridder-Strale, Y. (1983)  
Function of proximal colon in lemming and rat  
Swed.J.Agric.Res. 13, 243-256

Starke, K. und Palm, D. (1996)

Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems

In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker Hrsg.: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K., 6. Auflage, Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 96-124

Strabel, D. und Diener, M. (1995)

Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon  
Eur.J.Pharmacol. 274 (1-3), 181-191

Sullins, K.E. (1999)

Diseases of the large colon

In: Equine medicine and surgery. Hrsg.: Colahan, P.T., Merritt, A.M., Moore, J.N., Mayhew, J.G., 5. Auflage, Mosby Verlag St. Louis, Baltimore, Boston, Carlsbad, Chicago, Minneapolis, New York, Philadelphia, Portland, London, Milan, Sydney, Tokyo, Toronto, 741-833

Surprenant, A.; Horstman, D.A.; Akbarali, H.; und Limbird, L.E. (1992)

A point mutation of the alpha 2-adrenoceptor that blocks coupling to potassium but not calcium currents  
Science 257, 977-980

Surprenant, A.; Schneider, D.A.; Wilson, H.L.; Galligan, J.J.; und North, R.A. (2000)

Functional properties of heteromeric P2X(1/5) receptors expressed in HEK cells and excitatory junction potentials in guinea-pig submucosal arterioles  
J.Auton.Nerv.Syst. 81 (1-3), 249-263

Taylor, C.W. und Broad, L.M. (1998)

Pharmacological analysis of intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling: problems and pitfalls  
Trends Pharmacol.Sci. 19 (9), 370-375

- Thomas, P.J.; Shenbagamurthi, P.; Ysern, X.; und Pedersen, P.L. (1991)  
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: nucleotide binding to a synthetic peptide  
Science 251, 555-557
- Toescu, E.C. (1995)  
Temporal and spatial heterogeneities of Ca<sup>2+</sup> signaling: mechanisms and physiological roles  
Am.J.Physiol. 269 (2 Pt 1), G173-G185
- Toral, J.; Hu, W.; Yi, L.; Barrett, J.E.; Sokol, P.T.; und Ziai, M.R. (1994)  
Use of cultured human neuroblastoma cells in rapid discovery of the voltage-gated potassium-channel blockers  
J.Pharm.Pharmacol. 46 (9), 731-734
- Vaandrager, A.B.; Bot, A.G.; Ruth, P.; Pfeifer, A.; Hofmann, F.; und De Jonge, H.R. (2000)  
Differential role of cyclic GMP-dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon  
Gastroenterology 118 (1), 108-114
- Vaupel, P. und Ewe, K. (1995)  
Funktion des Magen-Darm-Kanals  
In: Physiologie des Menschen Hrsg.: Schmidt, R.F., Thews, G., 26. Auflage, Springer Verlag  
Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Mailand, Paris,  
Tokyo, 806-850
- Warth, R.; Hamm, K.; Bleich, M.; Kunzelmann, K.; von Hahn, T.; Schreiber, R.; Ullrich, E.; Mengel, M.; Trautmann, N.; Kindle, P.; Schwab, A.; und Greger, R. (1999)  
Molecular and functional characterization of the small Ca<sup>2+</sup>-regulated K<sup>+</sup> channel (rSK4) of colonic crypts  
Pflügers Arch. 438 (4), 437-444
- Weber, W.M.; Liebold, K.M.; Reifarth, F.W.; und Clauss, W. (1995)  
The Ca<sup>2+</sup>-induced leak current in *Xenopus* oocytes is indeed mediated through a Cl<sup>-</sup> channel  
J.Membr.Biol. 148 (3), 263-275

Wei, C.M.; Hu, S.; Miller, V.M.; und Burnett, J.C., Jr. (1994)

Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells

Biochem.Biophys.Res.Commun. 205 (1), 765-771

Weiser, T. und Wienrich, M. (1996)

Investigations on the mechanism of action of the antiproliferant and ion channel antagonist flufenamic acid

Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol. 353 (4), 452-460

Weiss, E. und Pospischil, A. (1999)

Darm

In: Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Hrsg.: Dahme, E. Weiss, E., 5. Auflage, Enke Verlag Stuttgart, 164-192

Wierup, M. (1977)

Equine intestinal clostridiosis. An acute disease in horses associated with high intestinal counts of clostridium perfringens type A

Acta Vet. Scand. 62, 1-182

Wollanke, B. (2004)

Typhlocolitis und Diarrhoe beim Pferd

BPT-Kongress, 4. – 7. November 2004, Nürnberg; S. 2-4

## 8. Danksagung

Herrn PD Dr. Gerhard Schultheiß möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung danken. Es war bestimmt nicht immer einfach mit mir.

Frau PD D. Kerstin Fey danke ich für die konstruktive Kritik beim Korrekturlesen dieser Arbeit und die schon lange bestehende gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. H.H.L. Sasse für alles was ich von ihm gelernt habe und seine stets väterlich, freundliche Art.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht nach Heuchelheim an Herrn Harald Simon, der immer wieder seine Schlachtermine mit uns abgesprochen hat und ohne den diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Danke auch an Marc für die vielen Wochenenden im Labor und die liebevolle moralische Unterstützung.

Ebenso möchte ich mich bei Katja und Horst für die Hilfe bei diversen Computerproblemen und der Übersetzung bedanken.

Den MTA`s im Institut für Veterinärphysiologie, besonders Alice Metternich, möchte ich für ihre Hilfe bei der Einführung in die Versuche danken.

Herrn Dr. Udo Hetzel möchte ich für die Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Präparate danken.

Last but not least ein Dankeschön an alle Freunde, Kollegen und meine Familie die immer wieder aufmunternde Worte während der Entstehung dieser Arbeit für mich fanden.



édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
GLEIBERGER WEG 4  
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-032-7



9 783896 870322