

Einfluß von kurzkettigen Fettsäuren auf den Ammoniaktransport durch die Colonschleimhaut von Pferden

D. Bödeker

Physiologisches Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Key words: ammonia absorption, colon mucosa, short-chain fatty acids

Einführung

Im Bereich des Caecums sowie im weiteren Verlauf des Colons von Pflanzenfressern findet eine hauptsächlich mikrobielle Verdauung der bis zu dieser Lokalisation nicht umgesetzten Nahrungsbestandteile statt. Wie in den Vormägen von Wiederkäuern entstehen durch die mikrobielle Tätigkeit kurzkettige Fettsäuren und Ammoniak. Ammoniak entsteht im Dickdarm außerdem aus Harnstoff, der aus dem Blut in den Verdauungstrakt diffundiert ist. Die Hydrolyse von Harnstoff wird durch bakterielle Urease ermöglicht. Die Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren erreichen im Dickdarm Werte bis zu 120 mM, die durchaus mit den Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren im Pansen von Wiederkäuern zu vergleichen sind (Argenzio et al., 1974; Schwabenbauer et al., 1982). Die Konzentrationen von Ammoniak im Dickdarm von Pferden sind ebenfalls mit Konzentrationen im Pansen (nach Erhaltungsbedarf ernährte Wiederkäuer) vergleichbar (3 - 10 mM, Hecker, 1971; Wootton und Argenzio, 1975; Tisserand et al., 1977; Schmidt et al., 1982). Sowohl kurzkettige Fettsäuren als auch Ammoniak werden aus dem Dickdarm resorbiert. Aus dem Darm resorbierter Ammoniak wird, zusammen mit aus dem endogenen Aminosäurenabbau stammendem Ammoniak, in der Leber unter Energieverbrauch zu Harnstoff synthetisiert oder zum Aufbau von nicht essentiellen Aminosäuren herangezogen. Während ein Teil des gebildeten Harnstoffs per Diffusion wieder in den Verdauungstrakt gelangt, wird der andere Teil mit dem Harn ausgeschieden.

In Untersuchungen an Wiederkäuervormägen konnte gezeigt werden, daß die Passage von Ammoniak durch die Pansenmucosa nicht nur eine einfache Diffusion von NH_3 ist, sondern durch die Konzentration der vorliegenden kurzkettigen Fettsäuren und durch die Konzentration von $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ beeinflusst werden kann (Sandoz-Vanhoef, 1991; Bödeker et al., 1992). Ziel der vorliegenden Arbeit

Zusammenfassung

Der transepitheliale Ammoniaktransport durch die Colonschleimhaut von Pferden wurde in einem In-vitro-System untersucht. Es wurden Transportraten von Ammoniak ermittelt, die denen von Ammoniak durch die Mucosa des Pansens von Wiederkäuern entsprechen. Der transepitheliale Ammoniaktransport war zu ca. 20 Prozent von der Anwesenheit kurzkettiger Fettsäuren abhängig. Eine Entgiftungskapazität des Epithels für Ammoniak wird vermutet.

Influence of Short-Chain Fatty Acids on Transport of Ammonia through Equine Colon Mucosa

The transport of ammonia through the equine colon mucosa was investigated using an in vitro-system. Rates of ammonia transport were in the same order of magnitude as they were observed in epithelia received from rumen of sheep. 20 % of the transepithelial transport was dependent on the presence of short-chain fatty acids. It is assumed that the equine colon epithelium has a capability to detoxify part of the absorbed ammonia.

war es, den Umfang des transepithelialen Ammoniaktransports am Dickdarm von Pferden in vitro zu untersuchen und einen möglichen Einfluß der kurzkettigen Fettsäuren auf diesen Transport näher zu charakterisieren.

Material und Methoden

Die in den Untersuchungen verwendeten Schleimhäute wurden von acht Kleinpferden (147 - 311 kg, Alter 6 - 18 Jahre) gewonnen. Die Tiere wurden im Rahmen eines Fütterungsversuchs (Projekt „Hippoplex“) im Institut für Tierernährung der Tierärztlichen Hochschule Hannover gehalten. Vier Tiere erhielten eine überwiegend aus pelletiertem Kraftfutter (Mais, Weizenkleie; 16,9 MJ DE/100 kg LM/d) bestehende Ration, während die anderen vier Tiere ausschließlich mit Wiesenheu (12,3 MJ DE/100 kg LM/d) versorgt wurden. Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Unmittelbar nach der Tötung der Tiere wurde das gesamte Darmkonvolut entnommen. Aus dem proximalen Teil des Colons wurden 2 - 3 handtellergröße Stücke für die weitere Präparation herausgeschnitten und in eine kalte Nährlösung (0 °C, serosale Lösung; Tab. 1) gelegt. Anschließend wurde im Labor die Mucosa manuell vorsichtig von den anderen Schichten der Darmwand abpräpariert und in ca. 15 cm² große Scheiben unterteilt. Die so gewonnenen Schleimhautscheiben wurden zwischen die zwei Hälften von Plexiglasinkubationskammern eingespannt.

Die der luminalen Schleimhautoberfläche zugewandte Kammerhälfte (mucosale Seite) wurde mit 24 ml einer Pufferlösung (mucosale Lösung; Tab. 1), die der serosalen Oberfläche zugewandte Kammerhälfte mit 19 ml Pufferlösung (serosale Lösung; Tab. 1) gefüllt.

Unterschiedliche hydrostatische Druckverhältnisse traten dabei nicht auf, da die Kammerhälften unterschiedliche Größen aufwiesen. Die mit den Epithelien versehenen Versuchskammern wurden in ein Wasserbad (40 °C) gehängt. Beide Kammerhälften wurden kontinuierlich mit Carbo-

Tab. 1: Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen (mM)

	serosal	mucosal ohne kurzkettige Fettsäuren	mucosal kurzkettige Fettsäuren (70 mM)
NaCl	100	–	–
KCl	2	10	10
CaCl ₂	2	–	–
MgCl ₂	2	–	–
Na ₂ SO ₄	1	14	14
CaSO ₄	–	1	1
MgSO ₄	–	1	1
NaH ₂ PO ₄	2	5	5
NaHCO ₃	25	–	–
KHCO ₃	–	25	25
Na-D-gluconat	–	25	25
Glucose	10	–	–
Glycolsäure	–	75	5
Essigsäure	–	–	49
Propionsäure	–	–	14
Buttersäure	–	–	7
HEPES-Puffer	–	20	20
NaOH	–	57	57
Mannit	23	10	10
Indomethacin	0,001	0,001	0,001
Begasung	Carbogen	Carbogen	Carbogen
pH	7,4	6,5	6,5
Osmolarität (mosmol/l)	290	290	290

gen (95 Prozent O₂ + 5 Prozent CO₂) begast, um eine Sauerstoffversorgung des Gewebes, einen konstanten pH-Wert der Lösungen sowie eine permanente Durchmischung der Pufferlösungen zu gewährleisten. Es wurden pro Versuch jeweils 18 Kammern bestückt. Die auf der mucosalen Seite eingesetzten Pufferlösungen waren der Zusammensetzung des Colonchymus angeglichen, jedoch enthielten jeweils einige Kammern statt kurzkettiger Fettsäuren eine isomolare Menge an Glycolsäure. Der pH-Wert der mucosal eingesetzten Lösungen betrug in beiden Gruppen stets 6,5 und zeigte während der gesamten Versuchszeit keine signifikanten Veränderungen. Die auf der serosalen Seite eingesetzten Lösungen waren der Zusammensetzung des Blutplasmas angeglichen (pH 7,4). Während einer Adaptationszeit wurden die transepithelialen Potentialdifferenzen mit Hilfe eines Millivoltmeters und von Kalomel-Elektroden, die durch Agar-KCl-Brücken mit den Kammerhälften verbunden waren, ermittelt. Nach ca. 30 – 40 Minuten hatte sich eine stabile Potentialdifferenz ausgebildet. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Pufferlösungen durch neue Lösungen gleicher Zusammensetzung ersetzt. Die eingesetzten Pufferlösungen enthielten nun zusätzlich einen Flüssigkeitsmarker (Cr-EDTA, 0,8 mM), um eventuelle transepitheliale Flüssigkeitsverschiebungen erfassen zu können. Nach einer kurzen Durchmischungszeit von 1 – 2 Minuten wurden jeweils aus der mucosalen sowie aus der serosalen Kammerhälfte Proben (3 ml) entnommen. Eine zweite Probenahme erfolgte am Ende einer 90minütigen Inkubationsperiode. In der Zwischenzeit wurden sowohl die transepithelialen Potentialdifferenzen als auch die pH-Werte der

mucosalen und serosalen Inkubationslösungen in 10minütigen Intervallen gemessen. Die Osmolarität der Pufferlösungen wurde mit einem Mikroosmometer (Fa. Roebeling, Berlin) gemessen. Die Chromkonzentrationen der Pufferlösungen wurden mit einem Atomabsorptionsspektrometer (Fa. Perkin Elmer, Überlingen) bestimmt. Die Ammoniakkonzentrationen wurden nach dem Prinzip der Berthelot-Reaktion mit anschließender photometrischer Bestimmung des entstandenen Farbkomplexes ermittelt (Digitalphotometer 6114 S, Eppendorf, Hamburg). Aus den Ammoniakkonzentrationen und aus den errechneten Flüssigkeitsvolumina am Beginn und am Ende der Inkubationsperiode wurden die Ammoniakmengen in den einzelnen Kammerhälften errechnet. Eine Abnahme der Ammoniakmenge in der mucosalen Pufferlösung wird als Disappearance, eine Zunahme der Ammoniakmenge in der serosalen Lösung wird als Appearance von Ammoniak bezeichnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; n bezeichnet die Anzahl der eingesetzten Epithelproben. Unterschiede zwischen den Mittelwerten der beiden Versuchsgruppen wurden mit dem ungepaarten t-Test nach Student nach vorhergehendem F-Test geprüft; p-Werte $< 0,05$ werden als signifikant bezeichnet.

Ergebnisse

Die unterschiedliche Fütterung der Tiere wirkte sich nicht meßbar auf die in dieser Arbeit erfaßten Parameter aus. Daher sind im folgenden die Ergebnisse nicht nach Fütterungsgruppen getrennt aufgeführt. Die transepithelialen Potentialdifferenzen betragen zu Beginn der Inkubationsperiode $13,1 \pm 0,6$ mV (serosale Seite positiv) und veränderten sich während des gesamten Versuchs nicht signifikant. Die transepithelialen Transportraten von Ammoniak sind in Tab. 2 dargestellt. Enthielten die mucosalen Pufferlösungen statt kurzkettiger Fettsäuren Glycolsäure, war sowohl die mucosale Disappearance als auch die serosale Appearance von Ammoniak signifikant vermindert.

Diskussion

Obwohl die Konzentrationen von Ammoniak im Dickdarm in der Literatur mit 3 – 10 mM angegeben sind, wurde für die vorliegenden Untersuchungen eine mucosale

Tab. 2: Mucosale Disappearance und serosale Appearance von Ammoniak ($\mu\text{mol} \cdot 90 \text{ min}^{-1} \cdot 15 \text{ cm}^{-2}$) in An- oder Abwesenheit von kurzkettigen Fettsäuren

	mit kurzkettigen Fettsäuren (70 mM) n = 69	ohne kurzkettige Fettsäuren n = 66	p
mucosale Disappearance	$63,0 \pm 1,6$	$49,0 \pm 1,8$	$< 0,0001$
serosale Appearance	$39,8 \pm 1,6$	$34,6 \pm 1,4$	$< 0,05$

Ammoniakkonzentration von 20 mM gewählt, da in eigenen vorangegangenen Untersuchungen am Pansenepithel ebenfalls diese Konzentration eingesetzt worden war. Dadurch ist ein direkter Vergleich der Transportraten für Ammoniak am Colon von Pferden mit Ammoniaktransportraten des Pansens möglich. Zu bedenken ist, daß die Ammoniakkonzentration im Colon sowohl von der Produktionsrate als auch von der Resorptionsrate abhängig ist. Da durch den ständigen Einstrom von Harnstoff in den gesamten Verdauungstrakt und durch den mikrobiellen Abbau N-haltiger Substanzen im Caecum und Colon von einer ständigen Ammoniakproduktion auszugehen ist, müßte auch im Dickdarm von Pferden eine deutliche Resorption von Ammoniak stattfinden. Unter gleichen In-vitro-Bedingungen lagen die Ammoniaktransportraten des Pferdecolons über denen des Pansens. Während in der vorliegenden Arbeit eine mucosale Disappearance von $63 \pm 1,6$ und eine serosale Appearance von $47,6 \pm 1,8 \mu\text{mol} \cdot 90 \text{ min}^{-1} \cdot 15 \text{ cm}^2$ in Anwesenheit von kurzkettigen Fettsäuren gemessen wurde, betrug bei Untersuchungen am Pansen (Sandoz-Vanhoefer, 1991) die mucosale Disappearance $42,7 \pm 3,5$ und die serosale Appearance $19,4 \pm 1,4 \mu\text{mol} \cdot 90 \text{ min}^{-1} \cdot 15 \text{ cm}^2$. Auffällig ist, daß bei beiden Tierarten nicht die gesamte Menge des aus der mucosalen Lösung verschwundenen Ammoniaks in der serosalen Pufferlösung wiedergefunden werden konnte. Der Grund dafür könnte darin liegen, daß Ammoniak in diesen Epithelien metabolisiert wird. Ein solcher Stoffwechselweg wäre z. B. die Glutamin- und/oder Glutaminsäuresynthese. Am Pansen sind die dafür benötigten Enzymaktivitäten beschrieben worden (McLaren, 1961, Armstrong und Weekes, 1983). Ein solcher intraepithelialer Stoffwechsel, mit einhergehendem Ammoniakverbrauch, würde eine zusätzliche Entgiftung von Ammoniak bedeuten und würde damit die Belastung der Leber mit Ammoniak reduzieren.

Der pH-Wert im Dickdarm des Pferdes beträgt ungefähr 6–7. Bei diesen pH-Werten liegt Ammoniak aufgrund seines pK-Wertes (9,2) zu mehr als 90 Prozent als NH_4^+ vor. Aufgrund der guten Lipidlöslichkeit von NH_3 ist eine erhebliche höhere Passagerate für diese Substanz als für NH_4^+ zu erwarten. In die Epithelzelle eingetretenes NH_3 müßte jedoch, wegen des intrazellulär vorliegenden pH-Werts (7,0–7,4), zum größten Teil zu NH_4^+ protoniert werden und würde deshalb den intrazellulären pH-Wert anheben. In den durchgeführten Untersuchungen wurde streng darauf geachtet, daß weder die Osmolarität noch die mucosalen und serosalen pH-Werte in den beiden Versuchsgruppen verschieden waren. Beobachtete Veränderungen müssen daher durch die Art der eingesetzten Säure bedingt gewesen sein. Eine Beeinflussung des Ammoniaktransports durch kurzkettige Fettsäuren und durch andere Faktoren ist bereits von Hogan (1961) vermutet worden. Da aufgrund des luminal vorliegenden pH-Werts die kurzkettigen Fettsäuren (pK 4,8) zu mehr als 90 Prozent als Anionen vorliegen, könnten diese vor der apikalen Membran der Epithelzellen als Protonenakzeptoren für Protonen aus NH_4^+ fungieren. Beide entstehende Produkte,

NH_3 und undissoziierte kurzkettige Fettsäuren, könnten nun die Zellmembran per Diffusion passieren. Intrazellulär könnten dann die undissoziiert eingetretenen kurzkettigen Fettsäuren die Protonen für NH_4^+ liefern. Höhere Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren im Bereich des Dickdarms würden eine stärkere Resorption von Ammoniak nach sich ziehen und könnten dadurch eine stärkere Leberbelastung bewirken. Dies könnte besonders bei einer Fütterung mit hohem Proteingehalt bei gleichzeitiger hoher Energiedichte der Ration von Bedeutung sein.

Literatur

- Argenzio, R. A., Southworth, M., und Stevens, C. E. (1974): Sites of Organic Acid Production and Absorption in the Equine Gastrointestinal Tract. *Am. J. Physiol.* 226, 1043–1050.
- Armstrong, D. G., und Weekes, T. E. C. (1983): Recent Advances in Ruminant Biochemistry: Nitrogen Digestion and Metabolism. *Internat. J. Biochem.* 15, 261–266.
- Bödeker, D., Shen, J., Kemkowski, J., und Höller, H. (1992): Influence of Short-Chain Fatty Acids on Ammonia Absorption across the Rumen Wall. *Exp. Physiol.* 77, 369–376.
- Hecker, J. F. (1971): Ammonia in the Large Intestine of Herbivores. *Br. J. Nutr.* 26, 135–145.
- McLaren, G. A., Anderson G. C., Martin, W. G., und Cooper, W. K. (1961): Fixation of Ammonia Nitrogen by Rumen Mucosa. *J. Anim. Sci.* 20, 942–943.
- Sandoz-Vanhoefer, H. (1991): Einfluß von Bicarbonat-Ionen und von kurzkettigen Fettsäuren auf die Ammoniakpassage durch die Pansenwand des Schafes. Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss.
- Schmidt, M., Lindemann, G., und Meyer, H. (1982): Intestinaler N-Umsatz beim Pferd. In: Fortschritte in der Tierphysiologie und Tierernährung. Ed. Meyer, H., Heft 13, S. 40–51, Paul Parey, Hamburg und Berlin.
- Schwabenbauer, K., Meyer, H., und Lindemann, G. (1982): Gehalt an flüchtigen Fettsäuren und Ammoniak im Caecuminhalt des Pferdes in Abhängigkeit von Futterart, Futterreihenfolge und Fütterungszeitpunkt. In: Fortschritte in der Tierphysiologie und Tierernährung. Ed. Meyer, H., Heft 13, S. 24–31, Paul Parey, Hamburg und Berlin.
- Tisserand, J. L., Candau, M., Houiste, A., und Masson, C. (1977): Evolution de quelques paramètres physico-chimiques du contenu caecal d'un poney au cours du nyctémère. *Ann. Zootech.* 26, 429–434.
- Wootton, J. F., und Argenzio, R. A. (1975): Nitrogen Utilization within Equine Large Intestine. *Am. J. Physiol.* 229, 1062–1067.

Dr. Dieter Bödeker
 Physiologisches Institut der
 Tierärztlichen Hochschule Hannover
 Bischofsholer Damm 15
 3000 Hannover 1