

Samenvatting

Eén van de belangrijkste eigenschappen van darmepitheel is, dat het in staat is aanzienlijke hoeveelheden zouten en voedingsstoffen tegen een concentratiegradiënt in van het darmlumen (mucosa) naar het bloed (serosa) te transporteren. Dit gaat gepaard met watertransport, zodanig dat de toniciteit van de getransporteerde vloeistof min of meer konstant blijft. Over de mechanismen die hiervoor verantwoordelijk zijn, is, althans kwalitatief, al veel bekend. Essentieel in alle, meer recente, verklaringen van 'actief' epitheliaal transport is de werking van de zgn. Na/K-pomp in het basolaterale membraan, die een ongelijke verdeling onderhoudt voor Na^+ - en K^+ -concentraties binnen en buiten de cel. Gespecialiseerde koppelingsmechanismen maken gebruik van de energie opgeslagen in deze concentratieverschillen (de chemische potentiaal van de betrokken ionen) om suikers, aminozuren en ionen de cel in of juist uit te drijven. Door het polaire karakter van deze mechanismen ontstaat transcellulair stoftransport. Hierbij speelt ook de relatief hoge kalium-permeabiliteit van de celmembranen een belangrijke rol, die immers het chemisch potentiaalverschil van K^+ over de membranen via de membraanpotentiaal beschikbaar maakt als drijvende kracht voor rheogeen transport d.w.z. deeltjestransport waarbij netto lading wordt verplaatst. De lokale verschillen in osmolariteit, binnen en buiten de cel, die het gevolg zijn van stoftransport, leveren tenslotte de osmotische drukverschillen die drijvende kracht zijn voor watertransport.

In dit proefschrift wordt verslag gedaan van elektrofysiologische experimenten en modelberekeningen die erop gericht zijn een aantal van de bovenstaande mechanismen voor energieoverdracht in de goudvisdarm verder te karakteriseren en te kwantificeren. Daarbij is, wat de experimentele kant betreft, gebruik gemaakt van ion-selektieve mikroelektroden. Het onderzoek vormt een onderdeel van het onderzoeksprogramma van de groep membraanfysiologie van de vakgroep Algemene Dierkunde waarvan reeds eerder publikaties verschenen van H. Albus [1-5], R. Bakker [6-9], J.A. Groot [10-16] en J. Siegenbeek van Heukelom [17-22]. Voor verwijzingen: zie Engelstalige samenvatting.

In Hoofdstuk 1 wordt na een korte bespreking van het door ons gebruikte preparaat, een overzicht gegeven van de historische achtergronden van ons onderzoek, waarbij drie hoofdlijnen worden onderscheiden: de ontwikkeling van modellen voor watertransport,

voor suiker- en aminozuurtransport en, het meest recent, voor chloridetransport. Binnen deze historische kontekst wordt vervolgens besproken waar de aangrijpingspunten liggen voor elektrofysiologisch werk met behulp van gewone en ion-gevoelige mikroelektroden en worden de doelstellingen van het onderhavige onderzoek samengevat:

- de bepaling van de permeabiliteitseigenschappen van de plasmamembranen door meting en analyse van membraan-potentialen en intracellulaire activiteiten, zowel onder controle-kondities als tijdens unilaterale en bilaterale ionsubstituties.
- de identifikatie van ionbewegingen die het gevolg zijn van actief rheoëen transport van Na^+ en glucose en van de koppelingsmechanismen tussen mucosale cotransportsystemen en de basolaterale Na/K-pomp; dit alles door meting en analyse van membraanpotentialen, intracellulaire en interstitiële activiteiten, voor, tijdens en na het begin van glucose-absorptie, onder diverse experimentele kondities.
- daarnaast bleek in de praktijk een theoretisch en experimenteel onderzoek noodzakelijk naar wat de door ons gekonstrueerde ion-gevoelige mikroelektrode feitelijk meet, zowel in de cel als in biologische oplossingen, om artefacten en dubbelzinnige interpretaties zoveel mogelijk te elimineren.

Het hoofdstuk wordt afgesloten met enige paragrafen over gebruikte methoden en technieken en een lijst van veelvuldig gebruikte symbolen.

In **Hoofdstuk 2** wordt de oorzaak onderzocht van een verandering in circuitpotentiaal van ongeveer -4 mV bij controle-metingen met kation-gevoelige mikroelektroden in chloride-vrije oplossingen (chloride gesubstitueerd door grote organische anionen zoals glucuronaat of gluconaat). Dit impliceert een daling van ca. 15% in de schijnbare kationactiviteit in zulke oplossingen, hoewel de totale kationconcentratie gelijk is gehouden. Uit osmolariteitsmetingen wordt gekonkludeerd dat er geen reden is om aan te nemen dat sprake is van sterke ion-associatie. Ook kunnen elektrode-artefacten van de iongevoelige elektrode redelijkerwijs worden uitgesloten zodat het effect is terug te brengen tot een elektrode-artefact aan het kontaktoppervlak van de referentie-elektrode en/of tot een afname van de kation-activiteiten in de betrokken oplossingen. Op theoretische gronden kan daartussen niet worden gekozen, zodat de meting van bijv. de K^+ -activiteit in een chloride-vrije oplossing altijd een element van onzekerheid bevat. Het betekent wel dat bij meting

van de membraanpotentiaal gedurende chloridesubstituties een referentie-elektrode verbonden door een zoutbrug aanzienlijke artefacten veroorzaakt die slechts kunnen worden voorkomen door direkt een kation-gevoelige referentie-elektrode te gebruiken, of althans achteraf daarnaar te korrigeren.

Hoofdstuk 3 beschrijft een uitgebreid onderzoek naar de permeabiliteitseigenschappen van de beide celmembranen. Metingen worden gepresenteerd van membraanpotentialen, transepitheliale potentialen, intracellulaire ionaktiviteiten van Na^+ , K^+ en Cl^- alsmede van transepitheliale weerstand en weerstandsratio R_m/R_s onder kontrolekondities. Dezelfde metingen zijn gedaan bij dubbelzijdige chloridevervangingen, terwijl de elektrische metingen bovendien zijn uitgevoerd bij eenzijdige chloridevervangingen. Celvolume, intracellulaire pH en ionenkoncentraties van Na^+ , K^+ en Cl^- zijn bepaald onder kontrolekondities en bij tweezijdige chloridevervanging. Tenslotte zijn intracellulaire chloride-aktiviteit en -koncentratie ook nog gemeten bij enkelzijdige chloridevervanging.

Uit de analyse van deze resultaten met behulp van een elektrisch equivalent circuit en evaluatie van de permeabiliteitsverhoudingen met een aangepaste vorm van de Goldman-Hodgkin-Katz-vergelijking kan worden gekonkludeerd tot een elektroneutraal chloride influxmechanisme in het mucosaal membraan. Van de berekende permeabiliteiten is het meest opvallend de hoge permeabiliteit voor chloride in het basolaterale membraan. Bovendien wordt een niet te verwaarlozen permeabiliteit voor bicarbonaat gevonden in het basolaterale membraan.

De membraanpotentiaal van goudvisdarmepitheel vertoont een zeer karakteristieke responsie op mucosale aanbieding van glucose. Deze responsie bestaat uit een snelle depolarizatie die wordt gevolgd door een langzamere repolarizatie. Tijdens deze responsie treedt een blijvende verhoging op in de Na^+ -aktiviteit in de cel en een transiente verhoging in de K^+ -aktiviteit in de submucosale (interstitiële) ruimte, juist achter de cel, welke trouwens ook in kontrolesituatie al enigszins is verhoogd t.o.v. de badmedia. Deze metingen, alsmede die van de intracellulaire K^+ - en Cl^- -aktiviteit worden gepresenteerd in **Hoofdstuk 4**.

Weglating van chloride uit de badmedia heeft een aanzienlijk hyperpolarizatie tot gevolg met een gelijktijdige verlaging van de submucosale K^+ -aktiviteit. Bij aanbieding van glucose blijft nu de repolarizatie achterwege. Wel vertonen de intracellulaire Na^+ -

aktiviteit en de interstitiële K^+ -aktiviteit de normale verhoging.

Zowel serosaal aangeboden barium (5 mM), als eenzijdige K^+ -verhoging depolarizeert het membraan en onderdrukt de eerder genoemde repolarizatie.

De discussie in dit hoofdstuk richt zich op de mogelijke verklaringen van deze effecten en kan als volgt worden samengevat:

De in de literatuur vrij algemeen aanvaarde verklaring voor de repolarizatie, n.l. een toename van de relatieve K^+ -geleidbaarheid van het basolaterale membraan, is ook hier toepasbaar. Vooral het feit dat deze Ba^{2+} -gevoelig is, bevestigt deze opvatting. Het is niet onmogelijk dat de K^+ -geleidbaarheid op enigerlei wijze is gekoppeld aan de aktiviteit van de Na/K-pomp, welke immers ook toeneemt. De permanente verhoging van de submucosale K^+ -aktiviteit onder kontrolekondities roept vragen op over het bestaan van concentratiegradiënten niet alleen buiten, maar ook binnen de cel.

De resultaten beschreven in **Hoofdstuk 5** sluiten direkt aan op de bevindingen in de voorgaande twee hoofdstukken.

Eerst worden de experimenten gepresenteerd, die de koppeling aantonen tussen Na^+ - en Cl^- -influx over het mucosale membraan. Bovendien wordt met deze resultaten de manier waarop deze koppeling plaats vindt verklaard: een uitwisseling van Na^+ en H^+ en een uitwisseling van HCO_3^- en Cl^- , die intracellulair met elkaar zijn verbonden door het dissociatie-evenwicht van H_2CO_3 .

Het bestaan van de al eerder genoemde bicarbonaatpermeabiliteit van het basolaterale membraan wordt experimenteel ondersteund, hoewel het precieze karakter hiervan niet kan worden vastgesteld.

Tenslotte worden de effecten bestudeerd van serosale Ba^{2+} -aanbieding op een aantal grootheden en karakteristieke responsies. Aange-toond wordt dat Ba^{2+} inderdaad de basolaterale K^+ -geleidbaarheid onderdrukt, welke, waarschijnlijk door zijn invloed op de intercellulaire K^+ -aktiviteit, in belangrijke mate de aktiviteit van de Na/K-pomp bepaalt.

Om een beter inzicht te krijgen in de konsekwenties van de resultaten van met name hoofdstuk 4 wordt in **Hoofdstuk 6** meer kwantitatief ingegaan op de ion-fluxen tussen de verschillende kompartimenten en wordt de eventuele relatie onderzocht met de structuur van de epitheelcellen in goudvisdarm.

Allereerst worden uit de gegevens over permeabiliteits-eigenschappen en potentialen de fluxen berekend over de verschillende membranen, in de aan- en in de afwezigheid van chloride, voor wel-

en voor niet-glucose-transporterend epitheel. Uit de balans blijkt dat netto transcellulair K^+ -transport van serosa naar mucosa moet worden verwacht, hetgeen niet direkt in overeenstemming is met waarnemingen dat aan de voet van de cellen de extracellulaire K^+ -aktiviteit is verhoogd (Hoofdstuk 4). Wel wijzen de resultaten op een toename van de basolaterale K^+ -geleidbaarheid in glucose-transporterend epitheel die mogelijk in verband kan worden gebracht met de al eerder genoemde sekundaire repolarizatie van de membraanpotentiaal na glucose-aanbieding.

Daartoe wordt vervolgens aan de hand van een eenvoudig pijldiagram de opeenvolging van processen besproken die begint met de rheogene influx van Na^+ en glucose. De processen worden verder geanalyseerd met een semi-kwantitatief model. Dit 'diffusiemodel' houdt rekening met eindige diffusiesnelheden in langgerekte kompartimenten, en met de mogelijkheid dat fluxen van het ene naar het andere kompartiment niet homogeen verdeeld zijn over het grensvlak tussen die kompartimenten. Epitheelcellen zijn immers zeer langgerekt en worden gescheiden door een zeer nauwe tussenruimte, de intercellulaire ruimte, die kontakt maakt met de mucosale vloeistof via de tight junctions en met de serosale vloeistof via het basale membraan. Door ons gemeten grootheden en redelijke schattingen uit de literatuur worden gebruikt om transepitheliale concentratieprofielen te berekenen van intracellulair Na en extracellulair K in steady state en als functie van de tijd na glucose-aanbieding.

De konklusie is dat de submucosale verhoging van de K^+ -aktiviteit en de responsie hiervan op glucoseaanbieding alleen kwantitatief verklaard kunnen worden met extra aannames over de basolaterale K^+ -geleidbaarheid. Deze zou bijvoorbeeld gemoduleerd kunnen worden door transcellulair watertransport. Dit watertransport wordt op zijn beurt weer gedreven door osmotische gradiënten die ontstaan door actief stoftransport. Deze aanname is des te aantrekkelijker omdat daarmee tevens de gevoeligheid van de repolarizatie voor diverse experimentele ingrepen kan worden verklaard.

In Hoofdstuk 7 worden, aangezien er in het algemeen weinig bekend is over ion-aktiviteiten in vissedarm, de door ons gevonden aktiviteiten in goudvisdarmepitheel vergeleken met literatuurwaarden voor andere lekkende epithelia. Tenslotte worden enige vrij essentiële aannames besproken uit eerdere hoofdstukken die nog toelichting behoeften, zoals bijv. de osmolariteit in de intercellulaire ruimte en de rheogeniciteit van de Na/K -pomp.