

## 6. Zusammenfassung

Der Einfluß der präepithelialen Mucusschicht in verschiedenen Dicken auf die Diffusion von Molekülen unterschiedlicher Größe und Ladung sollte untersucht werden.

Es wurden Versuche am distalen Colon des Meerschweinchens durchgeführt. Epithelien wurden horizontal in eine neu konstruierte Kammer eingespannt. Mucosal waren verschiedene Perfusionsgeschwindigkeiten - zwischen 0 und 10 ml/min - bei laminarer Strömung der Lösung möglich. Die Ergebnisse bei dieser Art der Perfusion wurden mit denen aus einer etablierten Kammer mit vertikaler Stellung des Epithels und turbulenter Strömung der Lösung verglichen. Die transepithelialen, elektrischen Parameter Kurzschlußstrom und Leitfähigkeit wurden kontinuierlich erfaßt.

Die Mucusschichtdicke wurde histologisch ermittelt. Die Epithelien wurden nach der durchschnittlichen Dicke der präepithelialen Mucusschicht in die Gruppen 0-20, 20, 40 und 100  $\mu\text{m}$  eingeteilt. Bei Perfusion wurde der Mucus z.T. aufgelöst und weggewaschen. Die Mucusschichtdicke sank mit steigender Perfusionsgeschwindigkeit.

Amilorid blockiert die Natrium-Kanäle und Amphotericin B baut zusätzliche Poren in die apikale Membran ein. Beide wurden als Substanzen, die den Kurzschlußstrom über das Epithel verändern, eingesetzt. Die Änderung des Kurzschlußstroms mit der Zeit oder der Wirkstoffkonzentration der eingesetzten Substanz diente als Parameter dafür, wie schnell die Substanz durch die verschiedenen dicken Mucusschichten diffundieren konnte. Außerdem haben Amilorid und Amphotericin B verschiedene Molekulargewichte, Amilorid ist positiv geladen, Amphotericin ungeladen. Damit konnte überprüft werden, ob Amilorid von den negativen Festladungen im Mucus gebunden oder Amphotericin B durch die Poren im Mucusnetz aufgehalten wurde. Kenngrößen der Diffusion waren die Zeit bis zur ersten Reaktion nach Zugabe der Substanzen, die Invasions-

konstante und der  $t_{50}$ -Wert für die Zeit-Wirkungskurven und die halbmaximale Hemmkonzentration und der  $t_{50}$ -Wert für die Dosis-Wirkungskurven. Alle diese Werte waren im Vergleich der Mucusschichtdicken in der Varianzanalyse nicht signifikant verschieden. Die Diffusion erfolgte für Amilorid und Amphotericin B unabhängig von der Mucusschichtdicke gleich schnell.

Zusätzlich wurden mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Latexkügelchen mit negativer Festladung verwendet. Der Aufenthaltsort im histologischen Schnitt wurde beurteilt. Die Latexkügelchen verteilten sich schon nach 5 Minuten vollständig im Mucus.

Durch Untersuchungen an isoliertem Mucus wurde dem Mucus die Eigenschaft einer Diffusionsbarriere besonders für Moleküle höheren Molekulargewichts zugesprochen. Durch die Messung an präepitheliale Mucus konnte das nicht bestätigt werden. An dem Aufbau des Kalium- und Protonen-Mikroklimas im Colon des Meerschweinchens ist der Mucus nach den vorliegenden Untersuchungen zumindestens nicht als Diffusionsbarriere beteiligt. Eine Abhängigkeit des Diffusionsverhaltens von der Ladung der untersuchten Substanzen konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Möglich Ursachen für die Diskrepanz der Ergebnisse werden in der Arbeit diskutiert.

Ein durchgehend signifikanter Unterschied der Ergebnisse zwischen etablierter Kammer mit vertikaler Stellung des Epithels und neuer mit horizontaler Epithelstellung, bei denen die Durchmischung der Lösung am Epithel sehr verschieden war, weist auf den Einfluß der "Unstirred Water Layer" hin. Mittels einer Modellrechnung wurde die ungefähre Dicke der Unstirred Water Layer bestimmt. Sie zeigt eine Abhängigkeit von der Perfusionsgeschwindigkeit. Die Unstirred Water Layer kann einen Konzentrationsgradienten zwischen Lumen und apicaler Membran bewirken, eine echte Diffusionsbarriere stellt sie nicht dar. Auch der Mucus stellt nach den Untersuchungen keine spezifische Diffusionsbarriere dar, er könnte aber eine Funktion als Teil der Unstirred Water Layer haben.

## 7. Summary

**BLEIS, KATJA (1993):**

**Is the pre-epithelial mucus layer in the distal colon of guinea pigs a diffusion barrier for molecules of different size and charge?**

The influence of the pre-epithelial mucus layer in different thicknesses on the diffusion of molecules of different size and charge on the epithelium was to be investigated.

Experiments with the distal colon of guinea pig were carried out. The epithelia were mounted horizontally in a new chamber type. Different speed of perfusion - between 0 and 10 ml/min - with laminar flow of solution were possible. Results out of this chamber were compared to results of a chamber with vertically mounted epithelia and turbulent flow of solution. The trans-epithelial, electrical parameters short circuit current and conductance were measured continually.

The thickness of the mucus layer was investigated. From the results of histology, the epithels were classified in groups of 0-20, 20, 40 and 100  $\mu\text{m}$  according to the average thickness of the pre-epithelial mucus layer. With perfusion mucus was partially dissolved and washed away. The thickness of the mucus layer decreased with increasing speed of perfusion.

Amiloride inhibits the sodium channels, Amphotericin B inserts additional pores in the apical membrane. Both are substances that are known to alter the short circuit current ( $I_{sc}$ ). The change in the  $I_{sc}$  with the time or the quantity of the substance employed was a parameter for the speed of diffusion through different thicknesses of the mucus layer. Furthermore Amiloride and Amphotericin B had different molecular weights, Amiloride has a positive charge, Amphotericin B is uncharged. It was tested whether Amiloride was bound from the negative charges in the mucus net or whether Amphotericin B was stopped within the

pores of the mucus net. Criteria for diffusion were the time up to the first reaction, the invasion-constant, the half-maximal inhibition-concentration and the  $t_{50}$ -value. All these values were compared for the thickness of the pre-epithelial mucus layer - not significantly different. The diffusion of Amiloride and Amphotericin B was - independent of the mucus thickness - similar fast.

In addition, latex with negative charge and marked with a fluorescent dye were employed. The location of these substances within the histological section was of interest. Within 5 minutes latex was scattered all over the pre-epithelial mucus layer.

Earlier experiments with isolated mucus indicated that mucus is a diffusion barrier especially for molecules of higher molecular weight. This result could not be confirmed here. Taking the results into account, mucus can not participate as a diffusion barrier in the set up of the potassium- and proton-microclimate in the colon of guinea pig. No dependence from the charge of substances was found for diffusion through the mucus layer. Possibilities for the discrepancy of results are discussed.

A significant difference in the results between chambers with vertical and horizontal epithelial mounting, which had very different speed of perfusion, showed an influence of the "unstirred water layer" (UWL). The mean thickness of the UWL was calculated. It depends on the speed of perfusion. The UWL is able to build a gradient of concentration between lumen and apical membrane, but it is not a real diffusion barrier. Mucus is not a specific diffusion barrier as well. It is possible that mucus has a function as a part of the UWL.