

F. Summary

Anne-Katrin Genz:

Maintenance and regulation of the proton activity at the surface of the apical membrane of guinea pig colonocytes

The existence of a *constant pH microclimate* at the luminal surface of the large intestine of guinea pig and of other species was postulated by various research groups in recent years. All measurements of the microclimate pH hitherto were performed by means of pH-sensitive microelectrodes.

The first aim of the present study was to *establish a new method* for measuring the microclimate pH (pH_i) using the pH-sensitive fluorescent dye *5-N-hexadecanoyl-aminofluorescein (HAF)*. HAF can be used for measurements of the proton concentration at the luminal surface. The fatty-acyl chain connected with the fluorescing moiety inserts into the apical membrane of the colonocytes because of its lipophilic character. The actual fluorescein molecule is thus fixed at the epithelial surface and allows a continuous measurement of the surface pH for several hours. The localization of the dye molecule at the apical membrane of the colonocytes was proved by means of a confocal laser scanning microscope. The external position of the HAF molecules bound to the apical membrane was pictured by quenching the fluorescence intensity of a dye-labeled epithelium of the distal colon of guinea pig with monoclonal antibodies. The insertion of HAF into the apical membrane did not disturb the transepithelial conductance nor the short circuit current of the colonic epithelium. As for calibrations, the high K⁺/nigericin technique was used. Nigericin reliably abolishes all proton gradients across the colonic epithelium. Surface pH and intracellular pH are thus identical to the pH of the calibration buffers.

In subsequent investigations of the microclimate pH and the ion transport mechanisms involved in its regulation, the effect of solutions of different composition and the effect of inhibiting drugs on the basic surface pH in the distal colon of guinea pig was shown. The *basic surface pH* was 7.54 ± 0.40 (n=82). Bicarbonate plays an important role in the maintenance of a constant surface pH. Removal of *bicarbonate* from the mucosal superfusate caused a significant decrease of the pH_i, the removal of bicarbonate from the

serosal side increased the surface pH significantly. These observed changes of the pH_i seem to rely on bicarbonate equilibrium reactions across the epithelium and on an enhanced or reduced transport rate of an apical HCO_3^-/Cl^- -exchanger. In the presence of bicarbonate, a low luminal pH changed the pH_i only moderately, whereas, in the absence of bicarbonate, the pH_i followed the pH of the luminal superfusate. The participation of the apical HCO_3^-/Cl^- -exchanger in the regulation of the pH_i was shown by removing chloride from the mucosal or serosal perfusion solution, although this exchanger was not inhibited by adding $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l of H₂-DIDS. The inhibition of the carbonic anhydrase with ethoxzolamide did not significantly change the basic surface pH nor the surface pH in the presence of proton gradients across the epithelium.

In the large intestine of mammals considerable amounts of *short chain fatty acids (SCFA)* are produced by anaerobic microbial fermentation of non-digested carbohydrates. The effect of mucosal or serosal addition of SCFA on the pH_i was investigated in the presence and absence of bicarbonate. The addition of 113.6 mmol/l of butyrate to the mucosal side of the epithelium of the distal colon caused a significant alkalization of the pH_i only in the presence of bicarbonate, whereas serosal addition of the same butyrate concentration slightly acidified the pH_i both in the presence and absence of bicarbonate. The alkalization was ascribed to a consumption of luminal protons in the course of protonated diffusion of the SCFA molecules, because, at physiological pH in the gut lumen, more than 99 % of the SCFA molecules exist in the form of anions. The acidification of the pH_i after serosal addition of butyrate might be caused by an enhanced extrusion of protons from the intracellular space across the apical membrane, because Busche et al. (1995) observed a drastical decrease in the intracellular pH due to the presence of SCFA on the serosal side of the epithelium of the distal colon of guinea pig. The alkalization of the pH_i caused by butyrate in the presence of bicarbonate gradients across the epithelium was reduced to 50 % by mucosal application of $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l of H₂-DIDS.

In Ussing chamber experiments, *mucosal to serosal SCFA fluxes* in the presence and absence of bicarbonate were compared. The observed SCFA fluxes were significantly reduced by removing bicarbonate from the perfusion solutions. Lowering the pH of the mucosal solution from pH 7.4 to pH 6.4 significantly increased the mucosal to serosal SCFA fluxes in the presence or absence of bicarbonate to the same extent.

The distal colon of guinea pig does not have a Na^+/H^+ -exchanger in the apical membrane of the colonocytes as described for the proximal colon and the caecum. Therefore, mucosa pieces of the caecum were used for investigations of the apical Na^+/H^+ -exchanger and its

importance for the maintenance of a constant pH_s . Neither the removal of sodium from the mucosal superfusate nor the inhibition of the apical Na^+/H^+ -exchanger with MIA affected the surface pH. A slight acidification of the pH_s was observed after sodium had been removed from the serosal side of the epithelium, although, in former studies, Busche et al. (1995) found out that the intracellular pH decreased drastically due to the serosal removal of sodium. The described acidification of the surface pH was not inhibited by mucosal addition of MIA.

Experiments performed with poorly buffered, bicarbonate-free solutions (5 mmol/l HEPES) elucidated the importance of the *luminal buffering capacity* for maintaining a constant pH_s . The reduction of the luminal buffer concentration from 21 mmol/l HEPES buffer to 5 mmol/l HEPES buffer significantly acidified the surface pH in the distal colon. Inhibition of the apical K^+/H^+ -ATPase in the distal colon with ouabain made the surface pH rise. Butyrate effects on the surface pH were by far more pronounced in the presence of low luminal buffer concentrations as compared to buffer concentrations of 21 mmol/l. Potent luminal buffer systems obviously mask movements of acid or base equivalents across the apical membrane, thus stabilizing the surface pH.

Preliminary studies were performed with epithelia labeled with HAF at the serosal side. The pH of the basolateral juxta-epithelial area (pH_b) was not significantly different from the mucosal surface pH. Changes of the serosal surface pH were, in most cases, right opposite of those of the mucosal surface pH.

Summing up the results obtained in this study it can be postulated that:

1. As for measurements of the microclimate-pH at the luminal surface of intestinal epithelia, the pH-sensitive fluorescent dye HAF is an appropriate alternative to conventional pH-microelectrodes.
2. The basic microclimate-pH measured by means of HAF at the surface of the epithelium of the distal colon of guinea pig is more alkaline and less constant as compared with the results obtained by means of pH-microelectrodes.
3. In the large intestine, the presence of bicarbonate at the mucosal and serosal side of the epithelium is indispensable for maintaining a constant surface pH.

4. On the basis of my results, the existence of a $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -exchanger in the apical membrane of the epithelial cells of the distal colon can be postulated. The exchanger is involved in the regulation of the surface pH, but it is insensitive even to high concentrations of $\text{H}_2\text{-DIDS}$.
5. The existence of a ouabain-sensitive proton secreting mechanism in the apical membrane of the colonocytes of guinea pig can be shown by a reduction of the luminal buffering capacity. Under physiological conditions, secreted protons do not acidify the surface pH significantly, because they are immediately neutralized by luminal buffer systems (e. g. bicarbonate/ CO_2).
6. No direct correlation was observed between intracellular pH and surface pH. Drastical changes in the intracellular pH are reflected by only slight changes in the surface pH.
7. Mucosal to serosal SCFA fluxes, measured in Ussing chambers, increase significantly with decreasing luminal pH. This indicates an importance of unstirred layers on maintaining a constant surface pH and, hence, a constant absorption rate of SCFA.

G. Zusammenfassung

Anne-Katrin Genz:

Aufrechterhaltung und Beeinflussung der Protonenaktivität an der apikalen Membranoberfläche der Enterozyten des Meerschweinencolons

Bereits 1959 stellten Hogben und Schanker bei Untersuchungen zur Resorption von im Darminhalt vorhandenen Bestandteilen (z. B. schwach dissoziierende Säuren und Basen) sowie verschiedenen Medikamenten aus dem Gastrointestinaltrakt fest, daß die gemessenen Resorptionsraten nicht mit den anhand der "pH-partition-hypothese" berechneten Raten übereinstimmten. Zur Erklärung dieses Sachverhaltes postulierten sie das Vorhandensein eines konstant sauren, von pH-Änderungen der luminalen Lösung unabhängigen, pH-Mikroklimas an der intestinalen Schleimhautoberfläche. Durch ein solches pH-Mikroklima sollte das Dissoziationsgleichgewicht und somit der resorbierbare Anteil der protonierten, lipidlöslichen Molekülform der untersuchten Substanzen beeinflusst werden. Die an Aufbau und Aufrechterhaltung des Mikroklima-pH beteiligten Mechanismen konnten nicht genau definiert werden.

Seitdem haben sich zahlreiche Arbeitsgruppen im In- und Ausland mit der Untersuchung des gastrointestinalen pH-Mikroklimas befaßt, die wichtigsten Erkenntnisse sollen im folgenden Abschnitt kurz zusammengefaßt werden:

Lucas et al. (1975) und Shiao et al. (1985) benutzten modifizierte pH-sensitive Mikroelektroden zur Messung des schleimhautnahen Oberflächen-pH im Dünndarm der Ratte und bestätigten das Vorhandensein eines sauren pH-Mikroklimas. Während Holtug et al. (1992) im Colon von Hennen mit Hilfe von pH-sensitiven Mikroelektroden ebenfalls ein saures wandnahes pH-Mikroklima nachweisen konnten, zeigten Rechkemmer et al. (1988) in Studien am proximalen und distalen Colon des Meerschweinens das Vorhandensein eines zwar ebenfalls vom luminalen pH unabhängigen, aber praktisch neutralen Oberflächen-pH. *In situ* und *in vitro* gemessene pH-Werte unterschieden sich geringradig.

In Frage gestellt wurde das Vorhandensein eines konstant sauren Oberflächen-pH durch Jackson et al. (1974) und Winne (1977). Jackson et al. (1974) erklärten die abweichenden Resorptionsraten der schwach dissoziierenden Säuren mit Hilfe des sogenannten "Three compartment model", Winne (1977) postulierten, daß an der Darmoberfläche vorhandene

"unstirred layers" einen entscheidenden Einfluß auf die Resorptionsvorgänge im Gastrointestinaltrakt besitzen. Es wurden zahlreiche Hypothesen hinsichtlich Aufbau und Erhalt des konstanten Oberflächen-pH aufgestellt.

Da die Messung des Mikroklima-pH mittels Mikroelektrode einige Fehlerquellen und Unsicherheitsfaktoren birgt, wurde für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen des an der luminalen Oberfläche des distalen Colons des Meerschweinchens vorhandenen pH-Mikroklimas eine spektrofluorometrische Methode entwickelt. Der erste Teil der vorgestellten Arbeit diente der Etablierung und Evaluierung der neuen Methode. Im zweiten Teil der Arbeit wurde diese neue Methode für die Messungen verwendet. Ziel der Arbeit war es, Aufschluß über die Substanzen und Ionentransportmechanismen zu erhalten, die an Aufbau und Aufrechterhaltung des konstanten Mikroklima-pH beteiligt sind.

5-N-Hexadecanoyl-aminofluorescein (HAF, molecular probes, Eugene, Oregon) ist ein pH-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff (pK 7.2), der aufgrund seiner speziellen Molekülstruktur für die Messung des Oberflächen-pH geeignet ist.

Der fluoreszierende Anteil des Farbstoffmoleküls, dessen pH-Sensitivität auf dem Vorhandensein dissozierbarer Säuregruppen beruht, ist an einen Palmitin-Fettsäurerest gekoppelt. Dieser verankert sich bei mucosaler Superfusion des isolierten Colonepithels aufgrund seiner Lipophilie in der apikalen Membran der Colonozyten. Der fluoreszierende Molekülanteil wird auf diese Weise in unmittelbarer Nähe der intestinalen Schleimhautoberfläche fixiert und ermöglicht eine kontinuierliche Messung des Oberflächen-pH über die gesamte Dauer der Versuche, ohne daß nennenswerte Anteile des Farbstoffs durch die Perfusionsflüssigkeit weggeschwemmt werden.

Um die Zuverlässigkeit der Methode zu überprüfen und Fehlerquellen auszuschließen, wurde eine Reihe von Kontrollexperimenten durchgeführt. Nach erfolgreicher Optimierung der Beladungsbedingungen konnte in Einklang mit den Ergebnissen von Dragsten et al. (1981) mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Fluoreszenzmikroskops sowie mit Hilfe von monoklonalen IgG Antikörpern gegen freies und gebundenes Fluorescein gezeigt werden, daß der fluoreszierende Anteil des Farbstoffmoleküls praktisch ausschließlich an der Außenseite der apikalen Membran der Colonozyten positioniert ist, ohne in die apikale Membran einzutauchen oder durch einen sogenannten "flip-flop" zur basolateralen Seite überzuwechseln. Messungen von Gewebeleitfähigkeit und Kurzschlußstrom in Ussingkammern vor, während und nach Beladung von Epithelien mit HAF bestätigten, daß die untersuchten Parameter durch Integration des Fettsäureanteils des Farbstoffmoleküls in die

apikale Membran nicht nachteilig beeinträchtigt werden.

Für die Eichung des Systems wurden Eichpuffer mit hohen Kaliumkonzentrationen verwendet, denen das Ionophor Nigericin ("K⁺/Nigericin-Methode") zugefügt wurde. Durch vergleichende Eichungen mit anderen Ionophoren, z.B. FCCP, und anderen Methoden, z. B. "Minimal-Maximal-Punkt Eichung", konnte gezeigt werden, daß Nigericin über den Zellmembranen bestehende Protonengradienten zuverlässig beseitigt und somit für die Bestimmung des Mikroklima-pH geeignet ist. Unterstrichen wurde diese positive Bewertung durch die in 65 Experimenten erstellten, sehr gut übereinstimmenden Eichkurven. Zum weiteren Ausschluß eventueller Fehlerquellen wurde trotz der Zuverlässigkeit der Eichmethode nach jedem Versuch mit mindestens 2 unterschiedlichen pH-Stufen am farbstoffbeladenen Epithel geeicht.

Nachdem die Etablierung der spektrofluorometrischen Methode zur Bestimmung des Oberflächen-pH an gastrointestinalen Epithelien abgeschlossen war, konnte mit den eigentlichen Messungen begonnen werden.

Der Oberflächen-pH, gemessen in 82 Experimenten am distalen Colon des Meerschweinchens, beträgt 7.54 ± 0.14 und ist somit deutlich alkalischer als die in der Literatur zu findenden Werte, die mit Hilfe von Mikroelektroden bestimmt wurden. Bei schrittweiser Ansäuerung der luminalen Perfusionslösung (bis pH 6.1) in Anwesenheit von Bicarbonat blieb der gemessene Oberflächen-pH trotz Azidifizierung deutlich alkalischer als der pH der luminalen Lösung. Im Gegensatz dazu näherte sich der Oberflächen-pH in Abwesenheit von Bicarbonat dem luminalen pH an. Da in den Bicarbonat-freien Lösungen der Bicarbonat-Puffer (21 mmol/l) durch die gleiche Konzentration an HEPES-Puffer ausgetauscht wurde, spielt die Anwesenheit von Bicarbonat in den Perfusionslösungen offensichtlich eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des konstanten Mikroklima-pH. Substitution von Bicarbonat durch HEPES in der mukosalen Perfusionslösung bei konstantem pH der Lösung führte zur signifikanten Ansäuerung des Oberflächen-pH, Bicarbonat-freie Perfusionslösungen auf der serosalen Seite bewirkten ein Ansteigen des Oberflächen-pH. Diese Änderungen des Oberflächen-pH können durch transzelluläre CO₂ Diffusion zwischen mukosaler und serosaler Seite mit entsprechender Verlagerung des HCO₃⁻ + H⁺/CO₂ + H₂O Gleichgewichtes erklärt werden. Zusätzlich wird offensichtlich die Transportrate und die Transportrichtung des in der apikalen Zellmembran der Colonozyten lokalisierten Cl⁻/HCO₃⁻-Austauschers durch die bestehenden Bicarbonat Gradienten beeinflusst. Dies zieht ebenfalls eine Änderung des Oberflächen pH nach sich, da entsprechend mehr oder weniger freie Protonen an der

Epitheloberfläche durch Bicarbonat abgepuffert werden. Die Beteiligung des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers an der Regulation des Oberflächen-pH konnte durch Verwendung Chlorid-freier Lösungen bestätigt werden. Eine Hemmung der austauscherbedingten Änderungen des Oberflächen-pH durch mukosale Applikation von $500 \mu\text{mol/l H}_2\text{-DIDS}$ konnte nicht erzielt werden.

Durch Zugabe von Ethoxazolamid zur mukosalen und serosalen Perfusionslösung sollte die Bedeutung der Carboanhydrase (CA) für den Oberflächen-pH untersucht werden. Ethoxazolamid bewirkte keine signifikante Änderung des basalen Oberflächen-pH (beiderseitige Perfusion des Epithels mit Krebs-Henseleit Lösung, pH 7.4). Auch in Anwesenheit von Protonengradienten (Ansäuerung der mukosalen oder serosalen Lösung) konnte durch Hemmung der Carboanhydrase mit Ethoxazolamid kein Effekt auf den Oberflächen-pH erzielt werden.

Im Dickdarm der Monogastrier werden unverdaute Kohlenhydrate im Chymus durch anaerobe mikrobielle Fermentation zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) abgebaut. Die SCFA liegen durch ihren pK_a von 4,8 bei den im Darm vorherrschenden pH-Werten zu über 99 % als Anionen vor. Der Einfluß von SCFA auf den Oberflächen pH sowie der Einfluß des Oberflächen-pH auf die Resorptionsrate der SCFA wurden am Beispiel von Butyrat (113.6 mmol/l) untersucht. Die SCFA-Fluxstudien wurden in Ussingkammern durchgeführt. Butyrat in der mukosalen Perfusionslösung bewirkt bei konstantem Lösungs-pH (7.4) in Anwesenheit von Bicarbonat eine deutliche Alkalisierung des Oberflächen-pH. Geht man davon aus, daß ein entscheidender Anteil der resorbierten SCFA die Zellmembranen in der protonierten, lipidlöslichen Form passiert, läßt sich die Alkalisierung des Oberflächen-pH mit einem Verbrauch an freien Protonen durch Übergang der dissoziierten Fettsäuremoleküle in die undissoziierte Form erklären. Durch Zugabe von Butyrat zur serosalen Perfusionslösung kommt es zu einer signifikanten Ansäuerung des Oberflächen-pH. Hier spiegelt sich offensichtlich, wenn auch in stark abgeschwächter Form, die drastische Ansäuerung des intrazellulären pH wieder. Diese Ansäuerung konnte in Messungen des intrazellulären pH mit Hilfe von BCECF durch Busche et al. (1995) in Anwesenheit von Fettsäuren auf der serosalen Seite des Colonepithels gezeigt werden. Eine Möglichkeit der Zelle, den intrazellulären pH wieder zu stabilisieren, wäre die Beseitigung von Protonen über die apikale Membran mit Hilfe der apikalen K^+/H^+ -ATPase. Die Hemmung der K^+/H^+ -ATPase mit 10^{-4} mol/l Ouabain führte jedoch nicht zu einer Verkleinerung der butyratbedingten Ansäuerung des Oberflächen-pH. In Abwesenheit von Bicarbonat konnte bei mukosaler Applikation von Butyrat keine signifikante Änderung des Oberflächen-pH

festgestellt werden, während die Anwesenheit von Butyrat auf der serosal Seite des Epithels wieder zur Ansäuerung des mukosalen Oberflächen-pH führte.

Die Beteiligung eines apikalen SCFA/HCO₃⁻-Austauschers an den butyratbedingten Änderungen des Oberflächen-pH sollte durch Hemmung des Austauschers mit $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l H₂-DIDS untersucht werden. Zugabe von H₂-DIDS zur mukosalen Perfusionslösung reduzierte das Ausmaß der butyratbedingten Alkalisierung des Oberflächen-pH auf die Hälfte.

In Ussingkammer-Experimenten wurde der Einfluß des Mikroklima-pH auf die Resorptionsraten der SCFA im distalen Colon des Meerschweinchens untersucht. Durch die Existenz des konstanten pH-Mikroklimas dürfte eine Ansäuerung der luminalen Perfusionslösung kaum Einfluß auf die Resorptionsraten der SCFA besitzen. Tatsächlich war bei mukosaler Perfusion des Epithels mit sauren Lösungen (pH 6,4) jedoch sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Bicarbonat eine signifikante Erhöhung der Fluxraten zu verzeichnen. Erklärt werden könnte dieser Sachverhalt durch perfusionsbedingte starke Turbulenzen der Lösungen über dem in der Ussingkammer eingespannten Epithel, wodurch der Aufbau eines konstanten pH-Mikroklimas verhindert wird. Zu einer Verkleinerung der Resorptionsraten führte die Entfernung von Bicarbonat aus den Perfusionslösungen. Eine genaue Erklärung hierfür gibt es noch nicht, der apikale SCFA/HCO₃⁻-Austauscher ist wahrscheinlich für die Abnahme der Resorptionsraten mitverantwortlich.

Die Bedeutung des apikalen Na⁺/H⁺-Austauschers für die Regulation des Mikroklimas wurde am Caecum des Meerschweinchens untersucht, da in der apikalen Membran der Epithelzellen des distalen Colons vom Meerschweinchen kein Na⁺/H⁺-Austauscher vorhanden ist. Entfernung von Natrium aus der mukosalen Perfusionslösung hatte, genau wie die mukosale Applikation von MIA zur Hemmung des Austauschers, keinen Einfluß auf den Oberflächen-pH. Bei Perfusion der serosalen Seite des Epithels mit Natrium-freier Lösung zeigte sich ein leichter Abfall des Oberflächen-pH, der aber wegen der fehlenden Signifikanz nur als Tendenz gewertet werden kann. Durch Untersuchungen von Busche et al. (1995) ist bekannt, daß es bei serosaler Perfusion mit Natrium-freien Lösungen zu einem drastischen Abfall des intrazellulären pH kommt. Die durch Entfernung von Natrium bedingte Ansäuerung des Oberflächen-pH konnte durch Hemmung des apikalen Na⁺/H⁺-Austauschers mit MIA nicht reduziert oder verhindert werden. Der apikale Na⁺/H⁺-Austauscher scheint somit nicht an der natriumbedingten Ansäuerung des Oberflächen-pH

beteiligt zu sein.

Durch die Verwendung schwach gepufferter Lösungen sollte die Bedeutung der Pufferkonzentration der mukosalen Perfusionslösung auf den Mikroklima-pH gezeigt werden. Die Versuche wurden mit Bicarbonat-freien Lösungen durchgeführt. Mit einem Gehalt von nur 5 mmol/l HEPES-Puffer (statt 21 mmol/l) in der apikalen Perfusionslösung war der Oberflächen-pH signifikant niedriger. Die Amplitude der butyratbedingten Alkalisierung des Oberflächen-pH bei Zugabe von Butyrat zur mukosalen Epithelseite war im Vergleich zu Versuchen mit 21 mmol/l HEPES-Puffer in den Perfusionslösungen signifikant größer. Während die Hemmung der apikalen K^+/H^+ -ATPase durch Ouabain in "normal" gepufferten Lösungen keinen meßbaren Einfluß auf den basalen Oberflächen-pH hatte, konnte durch Absenken der Pufferkonzentration die Aktivität der K^+/H^+ -ATPase sichtbar gemacht werden: Zugabe von Ouabain verhinderte die Ausschleusung von Protonen über die apikale Membran und führte zu einer fortschreitenden Alkalisierung des Oberflächen-pH.

Die Regulation des intrazellulären pH wurde mit Hilfe von BCECF durch Busche et al. (1993 und 1995) bereits ausführlich untersucht. Es wurde festgestellt, daß ein Großteil der Ionentransportvorgänge zur Regulation des intrazellulären pH an der basolateralen Membran erfolgte. Die Messung des basolateralen Oberflächen-pH zur Charakterisierung der an der Regulation beteiligten Transportmechanismen war in Ermangelung eines geeigneten Fluoreszenzfarbstoffs nicht möglich. Es wurde deshalb überprüft, ob HAF auch für die Messung des serosalen Oberflächen-pH herangezogen werden kann. Der serosale Oberflächen-pH, gemessen mit HAF, war vom mukosalen Oberflächen-pH nicht signifikant verschieden. Zugabe von Butyrat zur mukosalen Seite bewirkte eine Ansäuerung des serosalen Oberflächen-pH ($pH_{s,s}$). Zugabe von Butyrat zur serosalen Seite bewirkte eine Alkalisierung des serosalen Oberflächen-pH. Somit sind die gemessenen pH-Änderungen genau gegensätzlich zu denen des mukosalen Oberflächen-pH. Wurde Natrium aus der serosalen Perfusionslösung entfernt, führte dies zu einem signifikanten Anstieg des serosalen Oberflächen-pH. Diese Alkalisierung steht im Einklang zu der durch Busche et al. (1995) publizierten drastischen Ansäuerung des intrazellulären pH bei serosaler Perfusion des Epithels mit Natrium freier Lösung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoff 5-N-hexadecanoyl-aminofluorescein (HAF) für die Messung des Oberflächen-pH an der Mukosa

des distalen Colons vom Meerschweinchen geeignet ist. Die Anwesenheit von Bikarbonat, aber auch von luminalen Puffersystemen allgemein, ist für die Konstanthaltung des Oberflächen-pH notwendig, insbesondere bei Schwankungen des luminalen pH bzw. bei Transport von Säure/Basen-Äquivalenten über die apikale Membran der Colonozyten. Durch Superfusion des Epithels mit Chlorid-freien und Natrium-freien Lösungen konnte der Oberflächen-pH signifikant geändert werden. Entsprechende Ergebnisse wurden durch eine mukosale oder serosale Zugabe von kurzkettigen Fettsäuren erzielt. In Ussingkammer-Experimenten gemessene Fettsäurefluxe zeigten bei Absenken des luminalen Lösungs-pH einen deutlichen Anstieg, woraufhin gefolgert wurde, daß sich in Ussingkammern aufgrund der turbulenten Strömungsbedingungen über den Epithelien kein vergleichbares Mikroklima aufbauen kann.