

Exkretion

Verfasser: Hayriye Alan, Daniela Brenner,
Michaela Kühl, Lucia Floßbach

Inhaltsverzeichnis

<u>I. Einleitung</u>	3
<u>1. Formen der Exkretion</u>	3
<u>1.1 Ammoniotelische Tiere</u>	3
<u>1.2 Uricotelische Tiere</u>	3
<u>1.3 Ureotelische Tiere</u>	3
<u>2. Der Ornithinzyklus</u>	4
<u>3. Exkretionsorgane</u>	5
<u>3.1 Pulsierende Vakuole</u>	5
<u>3.2 Protonephridien</u>	5
<u>3.3 Metanephridien</u>	6
<u>3.4 Molluskenniere</u>	6
<u>3.5 Arthropodenniere</u>	7
<u>3.6 Malpighische Gefäße</u>	7
<u>3.8 Säugerniere</u>	8
<u>3.8.1 Anatomie</u>	8
<u>3.8.2 Funktionsweise</u>	9
<u>4. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</u>	9
<u>5. Clearance und glomeruläre Filtratmenge</u>	10
<u>6. Spektralphotometer</u>	10
<u>7. Lambert-Beersches Gesetz</u>	10
<u>8. Enzymatischer Test</u>	11
<u>II. Material und Methoden</u>	11
<u>Versuch 1: Bestimmung des Harnsäuregehaltes verschiedener Proben</u>	11
<u>Versuch 2: Bestimmung des Harnstoffgehaltes verschiedener Proben</u>	12
<u>III. Ergebnisse</u>	13
<u>Versuch 1: Bestimmung des Harnsäuregehaltes verschiedener Proben</u>	13
<u>Versuch 2: Bestimmung des Harnstoffgehaltes verschiedener Proben</u>	15
<u>IV. Diskussion</u>	15
<u>zu Versuch 1: Bestimmung des Harnsäuregehaltes verschiedener Proben</u>	15
<u>zu Versuch 2: Bestimmung des Harnstoffgehaltes verschiedener Proben</u>	16
<u>V. Zusammenfassung</u>	16
<u>Literaturverzeichnis</u>	16

I. Einleitung

1. Formen der Exkretion

1.1 Ammoniotelische Tiere

Die ammoniotelischen Tiere scheiden den Ammoniak direkt, als Ammonium (NH_4^+), in Verbindung mit verschiedenen Anionen aus. Ammoniotelische Tiere sind meistens aquatische Tiere, weil das Ammoniak sehr gut wasserlöslich ist. Bei marinen Fischen diffundiert das Ammoniak über ihre Körperoberfläche und über ihre Kiemen nach außen, da sie für Meerwasser sehr gut „durchlässig“ sind. Bei Süßwasserfischen, die eine Netto-Aufnahme von Wasser vermeiden, diffundiert das Ammoniak über ihre Kiemen nach außen. Dagegen diffundiert Na^+ aus der Umgebung über die Kiemen in ihren Körper. Protozoen oder Poriferen sind Tiere, die einen „weichen“ Körper besitzen, bei diesen Tieren diffundiert das Ammoniak über die gesamte Körperoberfläche in die Umgebung. Bei ammoniotelischen Tieren haben die Nieren bei der Ammoniakausscheidung keine große Bedeutung. Zu den ammoniotelischen Tieren zählen neben den Protozoen und Poriferen, auch die Coelenteranten, die nicht parasitischen Scoleciden, sowie die Anneliden, Crustaceen, Echinodermen und einige Teleosteer.

1.2 Uricotelische Tiere

Die uricotelischen Tiere scheiden das Ammoniak in Form von Harnsäure (siehe Abbildung 1) aus. Da die Harnsäure nicht toxisch und nur schwer wasserlöslich ist, bringt dies z.B. für die Vögel mehrere Vorteile. Aus dem Urin kann viel Wasser zurückgewonnen werden. Dadurch müssen die Vögel auch bei längeren Flügen wenig anhalten, um frisches Wasser zu trinken. Ein Teil des benötigten Wassers gewinnen sie aus den metabolischen Stoffwechselprozessen.

Außerdem ist die „Unlöslichkeit“ von Harnsäure vorteilhaft, weil sie eine enorme Gewichtsersparnis für die Tieren ist.

Bei Vögel, die beschalte Eier legen und diese keine Möglichkeit besitzen das anfallende Ammoniak abzutransportieren, würde sich das Ammoniak zu toxischen Mengen anreichern und das Leben des Embryos gefährden. Dieses Problem wird somit auch durch die Harnsäure gelöst. Diese Vorteile der Harnsäure gelten z.T. auch für andere Tiere, wie z.B. für die Reptilien. Vergleicht man die Struktur von Harnsäure mit der von Ammoniak und Harnstoff, so fällt auf, dass bei der Harnsäure am meisten Stickstoff (4N) ausgeschieden wird.

Zu den uricotelischen Tieren zählen neben den Vögeln und Reptilien (Schlangen, Eidechsen, Geckos) auch die Insekten sowie die Pulmonaten und einige Süßwasserbewohner (Planorbis, Lymnaea).

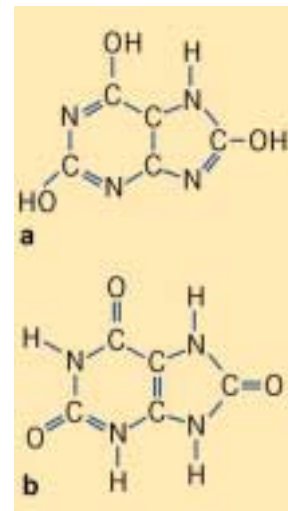


Abb. 1: Harnsäure (b ist die häufigere Form)
Quelle: <http://www.naturwissenschaft-und-technik.de>

1.3 Ureotelische Tiere

Bei den ureotelischen Tieren wird das Ammoniak in Form von Harnstoff (siehe Abbildung 2) ausgeschieden. Der Harnstoff ist der wichtigste Exkretstoff vieler Wirbeltiere. Sie ist in größeren Konzentrationen ungiftig, leicht wasserlöslich und muss deshalb immer mit einer gewissen Menge an Wasser ausgeschieden werden.

Er wird in der Leber über den Ornithinzyklus hergestellt, dies erfolgt unter hohem Energieverbrauch (3 Mol ATP pro Mol gebildeten Harnstoffs). Auf den Ornithinzyklus wird im

nachfolgenden Text eingegangen. Urotelische Tiere sind die terrestrischen Amphibien, einige Schildkröten und alle Säugetiere.

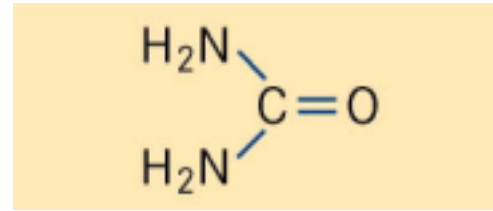


Abb.2: Harnstoff

Quelle: <http://www.naturwissenschaft-und-technik.de>

2. Der Ornithinzyklus

Der Ornithinzyklus (siehe Abbildung 3) findet in der Leber von Säugetieren statt. Er ist ein an den Eiweißstoffwechsel anschließender, biochemischer Reaktionszyklus, bei dem Ammoniak mit Kohlendioxid kombiniert. Dieser Zyklus erfolgt unter einem großen Energieaufwand, denn es wird dabei pro Mol gebildeten Harnstoff, 3 Mol ATP benötigt. Die Einleitung des Harnstoffzyklus erfolgt dadurch, dass aus Ammoniumionen und Kohlendioxid unter Verbrauch von 2 ATP durch N-Acetylglutaminsäure reagieren und Carbamylphosphat gebildet wird. Dieses reagiert mit der Delta-Aminogruppe, des im Harnstoffzyklus gebildeten Ornithins, unter Abspaltung organischen Phosphats zu Citrullin. Diese Schritte laufen zunächst in den Mitochondrien der Leberzellen ab. Alle weiteren Reaktionen finden im Cytosol der Leberzellen statt. Citrullin tritt zunächst mit der Asparaginsäure, welches die benötigte Aminogruppe zu Verfügung stellt, unter Verbrauch eines weiteren ATP's und dem Einfluss eines Kondensationsenzym zu Argininobernsteinsäure zusammen. Die Argininobernsteinsäure zersetzt sich jedoch gleich in Fumarsäure und Arginin. Letzteres wird durch das Enzym Arginase zu Isoharnstoff umgewandelt, der sich zu Harnstoff spontan umlagert und somit wird gleichzeitig wieder Ornithin produziert. Dieses wird in die Mitochondrien zurücktransportiert und wieder in den Ornithinzyklus zugeführt. Insgesamt sind jeweils 2 Mol Ammoniak (aus Glutaminsäure und Asparaginsäure) mit 1 Mol Kohlendioxid zu 1 Mol Harnstoff zusammengetreten, wofür 3 Mol ATP benötigt wurden.

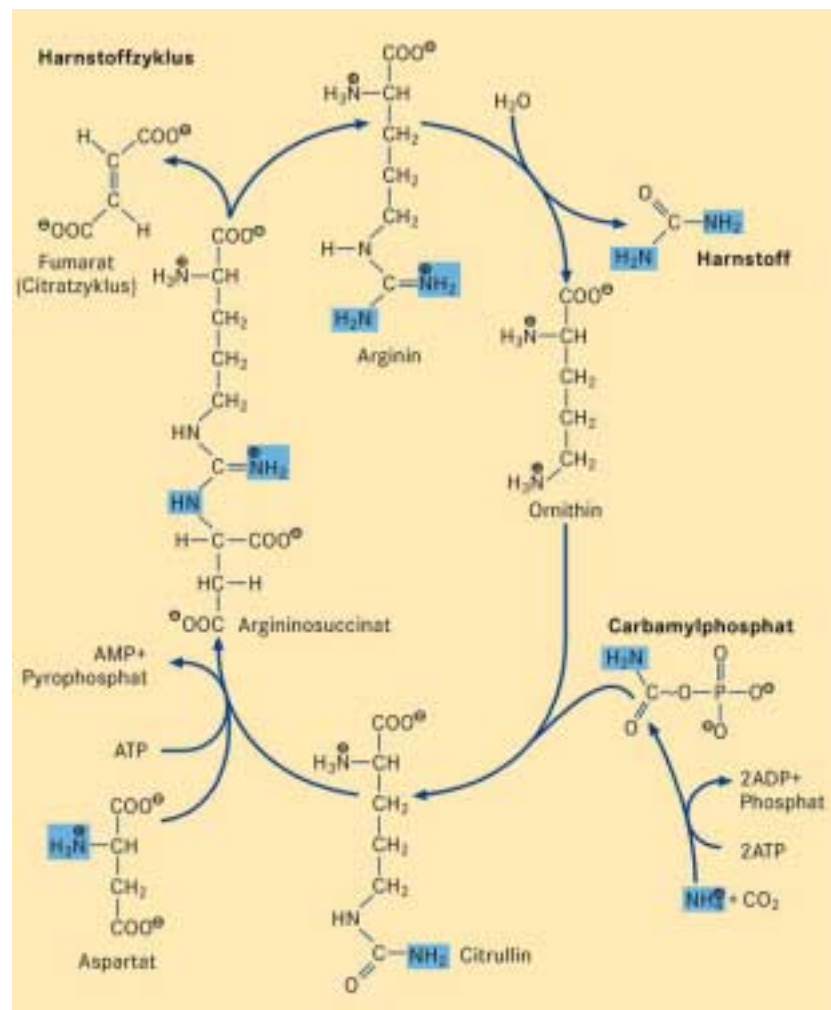


Abb.3: Ornithinzyklus

Quelle: <http://www.naturwissenschaft-und-technik.de>

3. Exkretionsorgane

3.1 Pulsierende Vakuole

Die Exkretion in Form einer pulsierenden Vakuole finden wir bei manchen Protozoen, z.B. bei *Paramecium* (Ciliat). Bei Endoparasiten oder marinen Protozoen kommen hingegen keine pulsierenden Vakuolen vor.

Exkretionsstoffe aus dem Zellkörper werden von den Nephridialtubuli ausgefiltert und gelangen in den Nephridialkanal, der sich zu diesem Zeitpunkt in der Diastole befindet. Während der Systole unterbricht der Nephridialkanal die Verbindung zu den Tubuli und leert die Flüssigkeit in die Ampulle, von wo sie in die kontraktile Vakuole gelangt, die sich in der Diastole befindet. Die Vakuole kontrahiert und befördert den Inhalt über einen kurzen Ausführungskanal aus der Zelle. Zwar können Protozoen auch über ihre Zelloberfläche Flüssigkeit an die Umgebung abgeben, doch bietet die pulsierende Vakuole, neben der Ausscheidung von Exkretstoffen, die Möglichkeit Osmoregulation zu betreiben. *Paramecium* verfügt über ein hyperosmotisches Inneres im Vergleich zu seiner Umgebung. Demnach zieht es ständig Wasser in das Zellinnere und die Zelle würde platzen, würde nicht über die Vakuole ständig Wasser wieder hinausgepumpt.

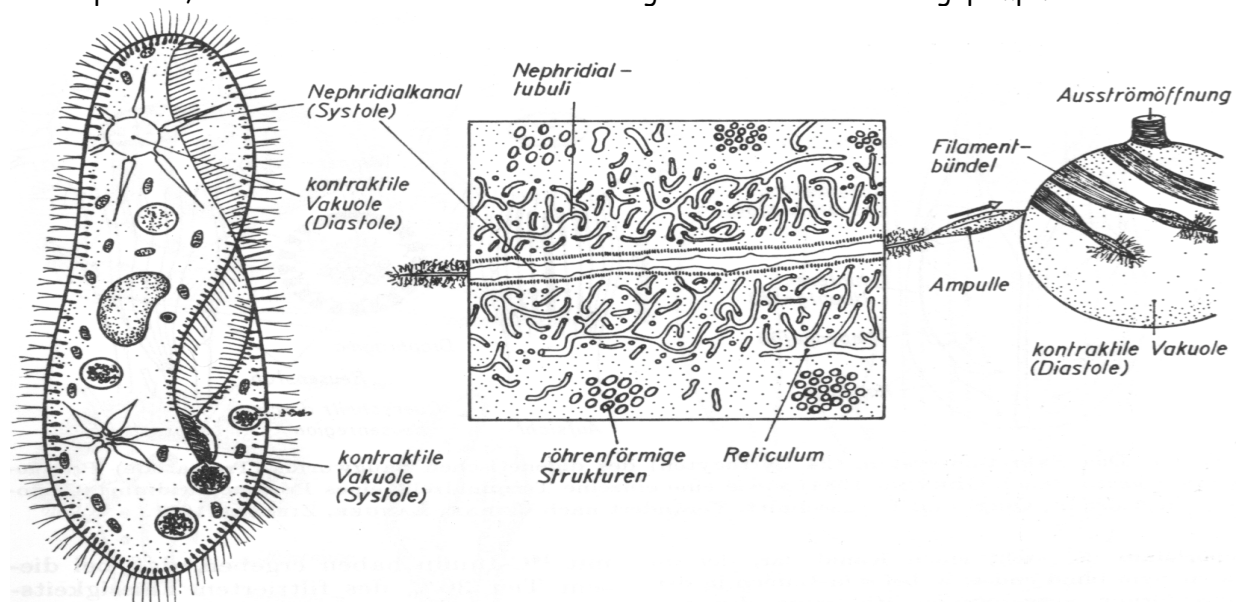


Abb. 4: Pulsierende Vakuole; Quelle: Penzlin, Lehrbuch der Tierphysiologie; S. 337

3.2 Protonephridien

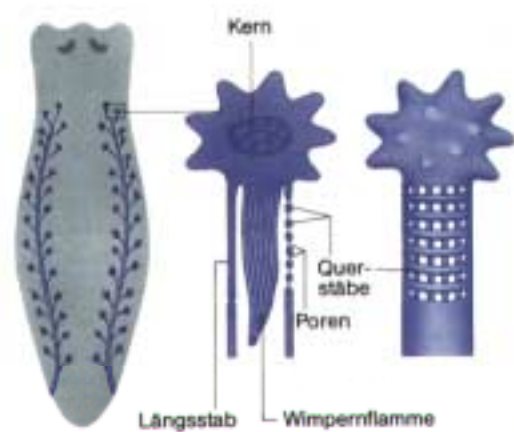
Die Exkretion bei Plathelminthen, Aschelminthen, Nemertinen, Tentaculata oder Echiuren findet mittels Protonephridien statt.

Das Exkretionsorgan besteht aus einem verzweigten Kanalsystem, das mit einem Ende direkt nach draußen führt. Die andere Seite endet blind im Parenchym. An diesem blinden Ende befindet sich ein röhrenförmiger Hohlraum, die sog. Terminalzelle (Cyrtozyte), in der sich eine Wimpernflamme (aus Cilien gebildet) lumenwärts erstreckt. Über eine Kanal- und eine Nephoruszelle gelangen wir in den Nephridialkanal. Viele solcher Nephridialkanäle sind miteinander verbunden. Ein Sammelrohr, in das sie münden, führt schließlich aus dem Körper nach außen.

Ultrafiltration findet über die perinephridiale extrazelluläre Matrix in den Raum der Terminalzelle statt. Die Wimpernflamme sorgt für den nötigen Unterdruck und saugt so Gewebsflüssigkeit ins Lumen. Sekretion hingegen geschieht über die Kanalwand in das Kanallumen. Auch die Reabsorption von Glucose, Aminosäuren, Na^+ , K^+ und Wasser ist über die Nephridialkanalwand möglich. So kann beispielsweise bei *Asplanchna* (Rädertierchen) rund 30% des Flüssigkeitsvolumens zurückgewonnen werden. Eine wichtige Rolle spielt das Exkretionsorgan

auch bei der Regulierung des Wasserhaushaltes, das bei Süßwassertieren meist besser entwickelt ist, als vergleichsweise bei marinen Lebewesen.

Abb.5: Protonephridien am Beispiel eines Plattwurmes, daneben vergrößert die Terminalzelle
Quelle: <http://www.uni-frankfurt.de/fb14/fsbc/lexikon/p/protonephridium.html>



3.3 Metanephridien

Anneliden sondern Exkrete über Metanephridien ab.

Diese mehrfach gefalteten, unverzweigten Kanäle haben im Inneren Cilien, die für den Flüssigkeitsstrom nach außen sorgen. Sie haben ihren Anfang im Coelom mit einem offenen Wimperntrichter (Nephrostom), durchdringen dann ein Dissepiment und münden im nächsten Segment über einen Exkretionsporus aus dem Körper hinaus. Die Gefäße sind von extrazellulärer Matrix umgeben und werden von Podozyten stabilisiert. Das Kanalsystem ist von einem dichten Blutkapillarnetz umgeben.

Coelomflüssigkeit wird in den offenen Wimperntrichter eingestrudelt und gelangt so in den Kanal. Durch Ultrafiltration gelingt es dem Körper 100% an Glucose zu reabsorbieren, bei Aminosäuren, K^+ und Cl^- zum großen Teil. Der ausgeschiedene Harn der Anneliden ist hypoosmotisch.

Inneren Cilien, die für den

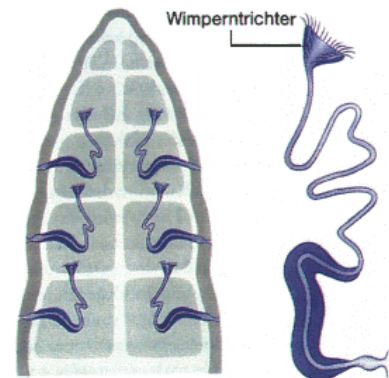


Abb.6: Ein Metanephridium und seine Lage im Körper am Beispiel eines Regenwurms

Quelle: <http://www.uni-frankfurt.de/fb14/fsbc/lexikon/m/metanephridium.html>

3.4 Molluskenniere

Dieses Exkretionsorgan kann paarig oder unpaarig bei den verschiedenen Tierarten auftreten. Der Aufbau der Molluskenniere beginnt mit einem Wimperntrichter im Perikard, das einen Coelomrest darstellt und führt über den Renoperikardialgang zum Nierensack, von wo der Weg über einen Ureter nach draußen führt. Bei Gastropoden und Muscheln erfolgt die Ultrafiltration der Hämolymphe durch die Herzwand in den Perikardialraum, wobei das Herz den nötigen Filtrationsdruck erzeugt. Der Primärharn fließt dann über den Ductus renopericardialis in die „Niere.“ Reabsorptions- Sekretionsvorgänge finden im Ureter statt. Das Nierenepithel ist relativ impermeabel für Wasser, wodurch hypoosmotischer Harn ausgeschieden wird. Bei landlebenden Lungenschnecken entsteht der Primärharn erst im Nierensack durch Filtration der Hämolymphe durch das Nierensackepithel. Aufgrund der Permeabilität des Nierenepithels für Wasser, ziehen die reabsorbierten Ionen das Wasser osmotisch nach, wodurch konzentrierter Harn produziert wird. Diese Schnecken scheiden hyperosmotischen Harn im Vergleich zur Hämolymphe aus.

Bei den Cephalopoden *Sepia* und *Octopus* findet Ultrafiltration an den Kiemenherzanhängen statt. Der Primärharn gelangt ins Perikardialcoelom. Kationen, wie K^+ , Ca^{2+} oder Mg^{2+} werden in den Nierensäcken stark reabsorbiert, was aber durch die Sezernierung von NH_4^+ in den Harn ausgeglichen wird. Sulfationen werden nicht zurückgewonnen, was zu einer erhöhten Konzentration im Harn führt. Insgesamt handelt es sich um isoosmotischen Harn.

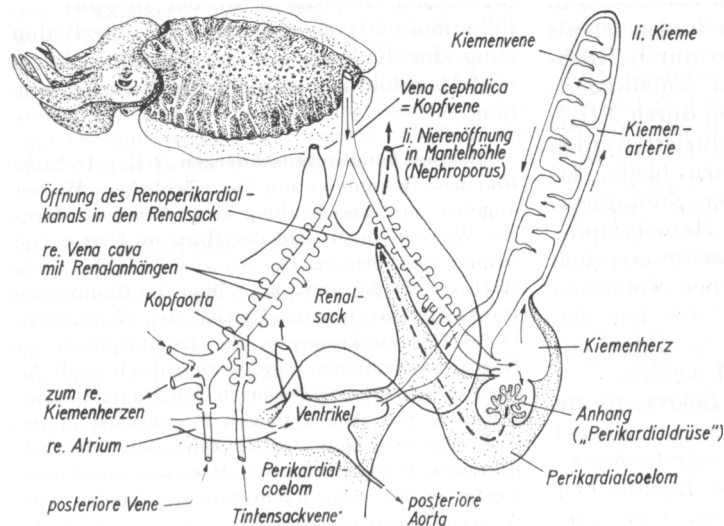


Abb.7: Molluskenniere
Quelle: Penzlin, Lehrbuch der Tierphysiologie; S. 341

3.5 Arthropodenniere

Die von Metanephridien abgeleitete Arthropodenniere tritt in max. 2 Körpersegmenten auf. Beginnend mit dem Endsäckchen (Sacculus) verläuft der Weg des Harns durch ein Labyrinth aus Kanälen hin zu einem gewundenen Exkretionskanal, der in die Blase mündet. Über einen kurzen Ausführungskanal wird Harn abgegeben. Von der Lage dieses Ausführungskanals abhängig ist die Bezeichnung der Arthropodenniere, z.B. als Maxillardrüsen, Antennendrüsen, Labialdrüsen oder Coxaldrüsen. Ort der Ultrafiltration ist der Sacculus, wobei wieder das Herz für den nötigen Druckunterschied sorgt. Sekretionsprozesse und die Reabsorption von Salzen und Glucose finden entlang des Nephridialkanals statt. Hypoosmotischer Harn wird als Endprodukt abgegeben.

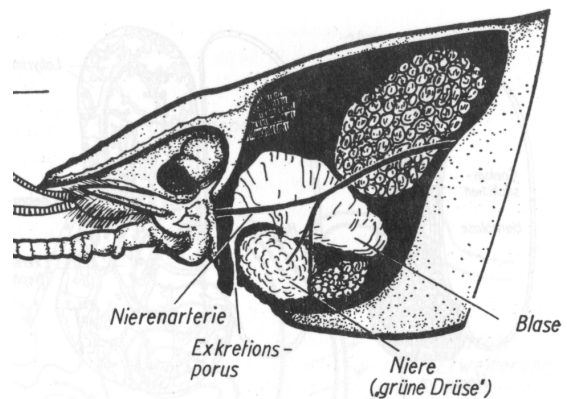


Abb.8: Arthropodenniere
Quelle: Penzlin, Lehrbuch der Tierphysiologie; S. 343

3.6 Malpighische Gefäße

Malpighische Gefäße finden wir bei landlebenden Arthropoden, wie z.B. Tracheaten oder Cheliceraten. Dabei handelt es sich um dünne, unverzweigte, schlauchartige Darmausstülpungen, deren Anzahl bei verschiedenen Vertretern zwischen 2 und mehreren 100 differieren kann. Die Ausstülpungen bestehen aus einschichtigen Transportepithelen (Gefäßepithel mit Polarität) und münden vor dem Enddarm in den Verdauungskanal. Die distalen Enden hören in der Leibeshöhle blind auf.

Primärharn wird hier mittels Sekretion von Ionen hergestellt. Ultrafiltration findet nicht statt. Na^+ u K^+ werden aktiv in die Gefäße transportiert, woraufhin Wasser und Cl^- passiv nachströmen. Auch Aminosäuren und Saccharide gelangen auf passivem Wege in die Gefäße, während Toxine aktiv in den Primärharn sezerniert werden. Die Rückresorption von Wasser, Natrium, Kalium, Chlorid, Aminosäuren und Glucose erfolgt im Rektum. Wie vorher erwähnt, gelangt auffällig viel K^+ in den Primärharn, wodurch folglich eine hohe osmotische Konzentration sowohl in den malpighischen Gefäßen, als auch im Perirektalraum vorliegt. Dem Rektum wird so Wasser entzogen und der Rest als hyperosmotischer Harn ausgeschieden.

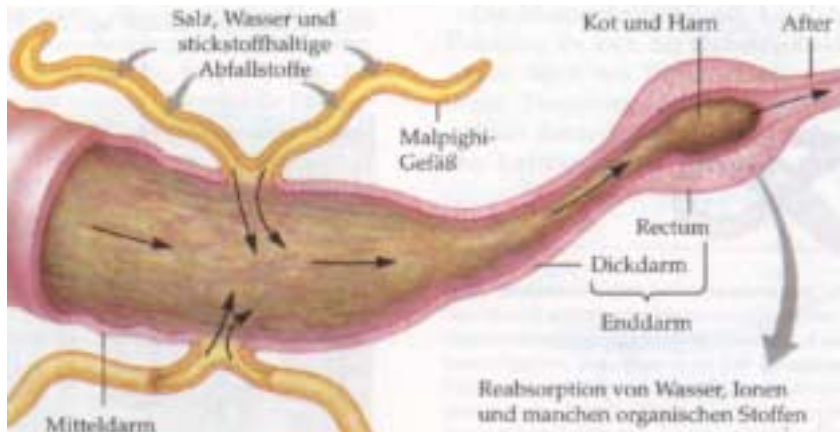


Abb. 9: Malpighische Gefäße
Quelle: Campbell, Biologie; S. 970

3.8 Säugerniere

3.8.1 Anatomie

Säugetiere haben paarige, bohnenförmige Nieren, die beiderseits des Zwerchfells liegen. Ihre Aufgaben bestehen in der Ausscheidung nicht mehr verwertbarer Metabolite, Regulierung des Blutdruckes und der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes.

Die Niere lässt sich bezüglich ihres Aufbaus in die Nierenrinde (Cortex) und das Nierenmark (Medulla) aufteilen. Die eigentliche Funktionseinheit der Niere sind die sog. Nephron, die wir in einem Umfang von ca. 1,7 Mio in der menschlichen Niere vorfinden. Nephron an der Oberfläche, werden als cortikale Nephron bezeichnet, tiefer liegende Nephron als medullär.

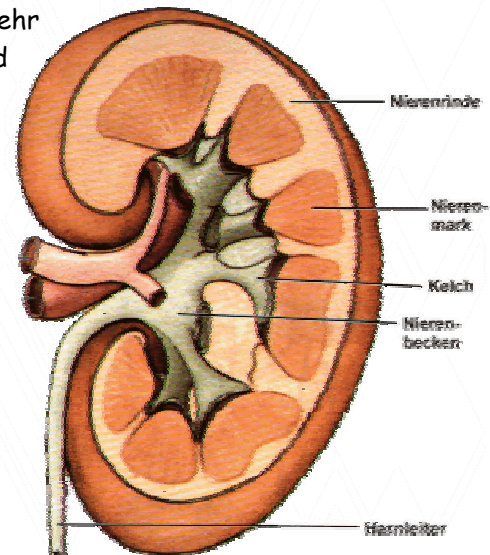


Abb.10: menschliche Niere
Quelle: <http://www.uni-frankfurt.de/fb14/fsbc/lexikon/n/niere.html>

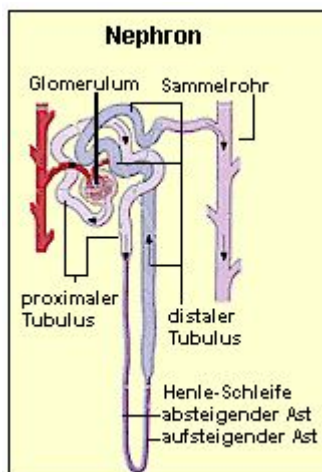


Abb.11: Aufbau eines Nephrons
Quelle: <http://www.medizininfo.de/urologie/anatomie/tubulusapparat.shtml>

Jedes Nephron besteht aus Malpighischem Körperchen und tubulärem Apparat.

Das Malpighische Körperchen besteht aus der Bowmanschen Kapsel (Halbkugel), in die das Glomerulum liegt. Daran schließt sich der tubuläre Apparat mit dem proximalen Tubulus an, der in den absteigenden Ast der Henleschen Schleife übergeht. Nach dem aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife erreicht man den distalen Tubulus, der nach einigen Windungen in das Sammelrohr mündet.

Die Bowmansche Kapsel ist ein doppelwandige Halbkugel, in die sich das Glomerulum schmiegt. Bei diesem Glomerulum handelt es sich um die Kapillarverzweigung einer kurzen Arteriole. Die Blutversorgung erfolgt über eine afferente Arteriole (Vas afferens) der Arteria renalis, die sich

in den Glomeruli verknäulen. Die ausführende Arterie heißt Vas efferens. Im Bereich des Tubulusapparates gehen die Arterien in das venöse System über. Die Arterien folgen den Tubuli bis ins Nierenmark und bilden dort ein Kapillarnetz um die Nierentubuli herum, wo sie in Venen übergehen. Das Sammelrohr, das z. T. im Nierenmark liegt, führt zunächst zum Nierenbecken und über den Ureter in die Blase.

3.8.2 Funktionsweise

Die Bowmansche Kapsel ist der erste Schritt zur Urinbildung. Der Blutdruck presst Flüssigkeit aus dem Blut des Glomerulus durch die Schichten der Bowmanschen Kapsel. Durch Kapillarwand, Basalmembran und innere Zellschicht der Kapsel hindurch wirkt dies wie ein Filter und hält größere Moleküle zurück. Etwa 1/10 des Blutvolumens wird aus der afferenten Arteriole abfiltriert, so dass das Blutvolumen in der Vas efferens geringer ist und sie, um Druckverlust zu vermeiden, einen geringeren Durchmesser hat. Der entstandene Primärharn ist weitgehend frei von Zellen und Eiweißen und enthält Blutplasma. Dies fließt in den proximalen Tubulus, wo Na^+ aktiv reabsorbiert wird. Wasser und Cl^- werden osmotisch (passiv) ebenfalls herausgezogen. Auch Glucose und Aminosäuren werden dem Körper durch Rückresorption erhalten, wohingegen körperfremde Stoffe, wie z.B. Penicillin aktiv in das Lumen transportiert werden. Im folgenden absteigenden Ast der Henleschen Schleife, die gut permeabel für Wasser, aber kaum permeabel für Ionen ist, erfolgt eine weitere Rückgewinnung von Wasser. Bis hierher wurden bereits 4/5 an Wasser für den Körper zurückgewonnen. Die Konzentration im Primärharn steigt aufgrund des Wasserverlustes und ist in der Haarnadelkurve der Henleschen Schleife stark hyperosmotisch. Der aufsteigende Ast der Henleschen Schleife verhält sich gegenteilig und ist gut permeabel für Ionen. Na^+ kann demnach im dünnen Teil passiv, entsprechend seines Konzentrationsgefälles, in die interstitielle Flüssigkeit diffundieren und wird im dickeren Teil dieses Astes aktiv aus dem Lumen nach draußen transportiert. Der distale Tubulus ermöglicht eine weitere Reabsorption von Na^+ , Cl^- , HCO_3^- und Wasser, wohingegen er zur Regulierung des pH-Wertes K^+ , H^+ und NH_3 in das Lumen hinein sezerniert. Die letzten Schritte zur Bildung des Harns passieren im Sammelrohr, wo weiteres Wasser reabsorbiert werden kann und im unteren Teil (im Nierenmark) Harnstoff in die interstitielle Flüssigkeit diffundiert. ADH (antidiuretisches Hormon) kann auf die reabsorbierte Wassermenge an dieser Stelle Einfluß nehmen, indem es die Wasserdurchlässigkeit des Sammelrohres verändert. Von den rund 170l produziertem Primärharn pro Tag, scheidet der Mensch am Ende lediglich 1-2l/Tag aus.

4. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Kommt es zu einem stärkeren Abfall des arteriellen Blutdrucks im Glomerulum oder einem Natriummangel, erfolgt die Freisetzung der Protease Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat (JGA), die in der Lage ist aus Angiotensinogen das Decapeptid Angiotensin I zu bilden. Das Enzym ACE (angiotensin converting enzyme) verwandelt Angiotensin I, durch Abspaltung eines Dipeptids am C-terminalen Ende, in Angiotensin II. Dies bewirkt einen langanhaltenden Anstieg des arteriellen Blutdrucks durch Vasokonstriktion. Gleichzeitig wird aus dem Nebennierenmark das Mineralcorticoid Aldosteron freigesetzt, das die Na^+ - und Wasserretention in der Niere verstärkt und so ebenfalls blutdrucksteigernd wirkt.

Fehler! Unbekanntes Schalterargument.

Abb.12: Schema des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Quelle: <http://journals.imc.akh-wien.ac.at/journals/abbildungen/gross/1595.html>

5. Clearance und glomeruläre Filtratmenge

Als Clearance bezeichnet man die Blutplasma - oder Serummenge, die beim Durchfluss durch die Nieren pro Minute von Harnstoff oder einer anderen harnfähigen (durch die Glomeruli der Nierenkörperchen filtrierbaren) Substanz vollständig befreit wird.

Der bei der Überprüfung der Nierenfunktion ermittelte Clearancewert ist das Maß für die Ausscheidungsfähigkeit und Ausscheidungsgeschwindigkeit der Nieren.

Die Größe des Clearancewert hängt davon ab, ob die verwendete Testsubstanz in den Glomeruli der Nieren nur filtriert oder in den Nierentubuli auch reabsorbiert oder sezerniert wird. Wird ein Stoff ausschließlich durch Filtration ausgeschieden (z.B. Inulin), so muss sein Clearancewert unabhängig von seiner Plasmakonzentration sein und der pro Minute gebildeten glomerulären Filtratmenge (GFR) entsprechen.

$$CL_{\text{Inulin}} = GFR = (C_u \cdot V_u) / (C_p)$$

Beim Menschen liegt der GFR Wert bei ca. $125 - 130 \text{ cm}^3 / \text{min}$, das heißt 175 Liter pro Tag. 1 - $\frac{1}{2}$ Liter Harn werden aber nur ausgeschieden, d.h. es werden 98 - 99% des Primärharns reabsorbiert.

6. Spektralphotometer

Bei der Spektralphotometrie misst das Gerät, welcher Anteil des Lichts verschiedener Wellenlängen von der zu untersuchenden Lösung absorbiert oder durchgelassen wird.

Im Spektralphotometer (siehe Abbildung 13) mithilfe eines Prismas weißes Licht in verschiedene Wellenlängen zerlegt. Durch eine bestimmte Vorrichtung wird nur Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches man monochromatisches Licht bezeichnet, durchgelassen. Das monochromatische Licht lässt man durch die zu untersuchende Lösung fallen. Dann fällt das durchgelassene Licht auf eine Photozelle, die es in elektrischen Strom umwandelt. Dadurch wird Stromstärke erzeugt, die anhand eines Messinstruments aufgezeichnet wird. Bei jeder Wellenlänge wird gemessen, welchen Anteil des Lichtes die Probe durchdringt („Transmission“) bzw. welcher Anteil von ihr absorbiert wird („Extinktion“).

Also misst das Spektralphotometer das Verhältnis von Absorption und Transmission von Licht verschiedener Wellenlänge durch eine Farbstofflösung.

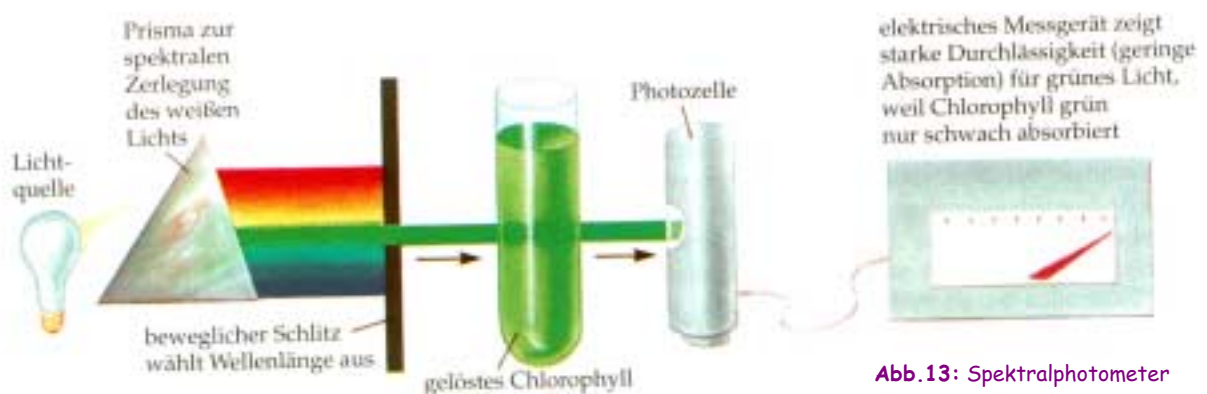


Abb.13: Spektralphotometer
Quelle: Campbell, Biologie; S. 206

7. Lambert-Beersches Gesetz

Das L.B Gesetz besagt, dass die Extinktion zu der Konzentration des gelösten Farbstoffes und der Dichte der durchstrahlten Schicht proportional ist. Die Extinktion ist das Maß für die Absorption.

Es hat die Größe:

$$E = \log I_0 / I = E \times c \times d$$

E = molare Extinktionskoeffizienten

C = Konzentration des Farbstoffes

d = Schichtdicke

I = Intensität des austretenden Lichts aus der Messlösung

I₀ = Intensität des eintretenden Lichts aus der Messlösung

E = Extinktion

8. Enzymatischer Test

Für den enzymatischen Test braucht man eine Pufferlösung, ein substratspezifisches Enzym und das Substrat, das mit dem enzymatischen Test nachgewiesen werden soll. Für den Reaktionsablauf benötigt man außerdem noch Co - Faktoren, wie z.B. Wasser oder Sauerstoff. Dabei spaltet das Enzym das Substrat auf, dadurch werden wiederum neue Substrate hergestellt. Diese reagieren mit bestimmten Stoffen (der Lösung) und führen so eine Farbveränderung der Lösung herbei (z.B. von klar/farblos nach grün). Beim Nichteintreten der Farbveränderung, erkennt man, dass sich das zu bestimmende Substrat nicht in der Lösung befindet.

II. Material und Methoden

Versuch 1: Bestimmung des Harnsäuregehaltes verschiedener Proben

Zur Durchführung des ersten Versuchs wird je eine weiße und eine schwarze Kotprobe des Geckos, sowie die Urinprobe eines Menschen verwendet. Zu Beginn werden die Proben des weißen und des schwarzen Geckokots abgewogen (schwarz: 23g; weiß: 21g). Die Proben werden mit 10 ml demin. H₂O auf dem Vortexer homogenisiert und in je zwei Eppendorfgläsern zentrifugiert. Das Zentrifugat der weißen Geckokotprobe wird nun ein weiteres Mal verdünnt (100µl Probe + 2ml H₂O → VF₂ =21), das der schwarzen Geckokotprobe bleibt unverdünnt (VF₂ =1). Die Standardlösung bleibt ebenfalls unverdünnt. Für die Urinprobe beträgt VF₂ 10, d.h. es werden zu 100µl der Probe 900µl H₂O gegeben.

Tabelle 1: Probenverdünnung der Harnsäure

	Gecko (weiß)	Gecko (schwarz)	Urin	Standard
Probe	500 µl	---	100 µl	---
Wasser	10 ml	---	900 µl	---
VF ²	21	1	10	1

Im ersten Reaktionsschritt werden von jeder Probe 2mal 100 μ l benötigt. Es wird jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Versuchsproben werden folgendermaßen pipettiert:

Tabelle 2: Pipettierschema der Harnsäure

	Leerwert	Standard	Proben
Reagenzlösung	2500 μ l	2500 μ l	2500 μ l
Aqua demin	100 μ l	---	---
Standardlösung	---	100 μ l	---
Probelösung	---	---	100 μ l

Die verwendete Standardlösung ist eine synthetisch hergestellte Harnsäure mit einer Konzentration von 6mg/dl bzw. 357 μ mol/l. Alle Lösungen werden nun gut gevortext und dann bei 37°C etwa 5 Minuten lang im Wasserbad inkubiert. Bei der anschließenden photometrischen Messung wird mithilfe eines Spektralphotometers die Extinktion E1 bei 555nm gemessen. Hierzu werden alle vorbereiteten Probelösungen in Küvetten gefüllt. Nachdem mit der Leerwertprobe der Nullabgleich durchgeführt wurde, werden alle Proben nacheinander in das Photometer eingesetzt und die jeweilige Extinktion E1 notiert. Nach Beendigung der photometrischen Bestimmung werden die Messlösungen wieder in die Reagenzgläser zurückgefüllt.

Im zweiten Reaktionsschritt des Versuchs wird jeder Probe 500 μ l einer Startreagenz zugesetzt, woraufhin sich jede Messlösung unterschiedlich färbt. Daraufhin wird erneut im 37°C warmen Wasserbad 5 Minuten lang inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgt wiederum ein Nullabgleich mit Wasser und danach eine erneute Messung der Extinktion E2 mithilfe des Photometers (555nm).

Versuch 2: Bestimmung des Harnstoffgehaltes verschiedener Proben

In diesem Versuch soll die Harnstoffkonzentration des menschlichen Urins und des weißen Gecko-Kots ermittelt werden. Dazu verwendet man 2x20 μ l der für Versuch 1 hergestellten Lösung des weißen Gecko-Kots, sowie 2x20 μ l des menschlichen Urins, der zuvor 101-fach verdünnt wurde. Als Vergleichswert nimmt man 2x20 μ l Standardlösung mit der bekannten Harnstoffkonzentration von 30 mg/dl bzw. 5 mmol/l. Zur Eichung des Photometers und Kontrolle der Reaktion wird noch eine Leerwertprobe von 20 μ l demineralisiertem Wasser bereitgestellt. Es wird die Harnstoff-Farbstest-Kombination der Boehringer-Mannheim GmbH verwendet. Zu allen Probelösungen werden zunächst 2,5 ml der aus Puffer, Urease und Salicylat bestehenden Reagenzlösung 1 hinzupipettiert. Nach kurzem Vortexen werden alle Proben etwa 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Dabei katalysiert das Enzym Urease die Reaktion von einem Molekül Harnstoff mit zwei Molekülen Wasser zu einem Ammonium- und einem Bicarbonation. Die Lösungen färben sich zunächst lila. Nach Zugabe der Hypochlorit enthaltenden Reagenzlösung 2 ist ein Farbumschlag nach gelb zu beobachten. Es wird erneut 5 Minuten lang bei 37°C inkubiert, während die Lösungen (bis auf den Leerwert) sich langsam mehr oder weniger stark grün färben. Dabei reagieren die vorhin entstandenen Ammoniumionen mit dem Salicylat und dem Hypochlorit unter Bildung eines grünen Farbstoffes. Anschließend werden alle Proben bei 600 nm photometriert und jeweils ein Mittelwert für die Extinktion gebildet. Mithilfe der bekannten Harnstoffkonzentration der Standardlösung kann auf die jeweiligen Konzentrationen bei Gecko und Mensch zurückgerechnet werden. Es gilt dabei: $c_{\text{Probe}} = E_{\text{Probe}} \cdot E_{\text{Standard}}^{-1} \cdot c_{\text{Standard}} \cdot \text{Verd.}_{\text{gesamt}}$. Des Weiteren ist beim Menschen aus der bekannten 24h-Urinmenge auch noch die Harnstoffmenge zu bestimmen, die innerhalb eines Tages ausgeschieden wird.

III. Ergebnisse

Versuch 1: Bestimmung des Harnsäuregehaltes verschiedener Proben

Die unten aufgeführte Tabelle zeigt die Ergebnisse zur Harnsäurekonzentrationsmessung in den einzelnen Versuchsproben:

Tabelle 3: Harnsäurebestimmung

	Weißer Geckokot	Schwarzer Geckokot	Urin	Standard	Leerwert
Gewicht der Probe [mg]	21	23			
Volumen der Probe [ml]	0,021	0,023	0,1		
VF ₁	477,19	435,78			
VF ₂	21	1	10	1	
VF_{gesamt}	10020,99	435,78	10	1	
E ₁	0,000	0,000	0,002	0,008	0,000
E ₁	0,001	0,000	0,009	0,000	
ΔE ₁	0,0005	0,000	0,0055	0,004	0,000
E ₂	0,058	0,052	0,074	0,151	0,000
E ₂	0,062	0,081	0,069	0,161	
ΔE ₂	0,060	0,0665	0,0715	0,156	0,000
ΔE_{gesamt}	0,0596	0,0665	0,0669	0,1526	0,000
C [mg/ml]	234,83	11,39	0,26	0,06	
C [mMol]	1408,98	68,34	1,56	0,36	
C [%]	23,483	1,139	0,026	0,006	
24h-Anteil [mMol]			3588		
24h-Anteil [g]			0,598		

Die weiße Geckokotprobe wurde zweimal verdünnt, so dass zwei verschiedene Verdünnungsfaktoren vorliegen. Die Formeln zur Berechnung der einzelnen Verdünnungsfaktoren und Konzentrationen sollen anhand des weißen Geckokots veranschaulicht werden.

Verdünnungsfaktoren:

$$VF_1 = \frac{V_{Kotprobe} \cdot V_{H_2O}}{V_{Kotprobe}}$$

$$VF_1 = \frac{0,021ml + 10ml}{0,021ml} = 477,19$$

Der erste Verdünnungsfaktor VF₁ beträgt 477,19.

Der zweite Verdünnungsfaktor VF_2 wird analog berechnet.

$$VF_2 = \frac{V_{Probe} + V_{H_2O}}{V_{Probe}}$$

$$VF_2 = \frac{0,1ml + 2ml}{0,1ml} = 21$$

Es ergibt sich für VF_2 des weißen Geckokots 21.

Der gesamte Verdünnungsfaktor ergibt sich aus dem Produkt der Einzelfaktoren.

$$VF_{gesamt} = VF_1 * VF_2$$

Für den weißen Geckokot gilt: $477,19 \cdot 21 = 10020,99$

Harnsäurekonzentration:

Zur Berechnung der Harnsäurekonzentration benötigt man neben dem Verdünnungsfaktor die Extinktionen der Standard- und der Probelösung, sowie die Konzentration der Standardlösung.

$$c_{Probe} = \frac{E_{Probe}}{E_{Standard}} * c_{Standard} * VF_{gesamt}$$

Die fehlenden Größen werden mit folgenden Formeln berechnet:

$$E_{Probe} = E_{2Probe} - 0,839 * E_{1Probe} \quad E_{Leer}$$

Für diese Gleichung bezogen auf den weißen Geckokot ergibt sich:

$$\Delta E_{Geckoweiß} = 0,06 - 0,839 * 0,0005 - 0 = 0,0596$$

$$E_{Leer} = E_{2Leer} - 0,839 * E_{1Leer}$$

$$\Delta E_{Leer} = 0,000 - 0,839 * 0 = 0$$

$$E_{Standard} = E_{2Standard} - 0,839 * E_{1Standard} \quad E_{Leer}$$

$$\Delta E_{Standard} = 0,156 - 0,839 * 0,004 - 0 = 0,1526$$

Mit diesen Werten lässt sich jetzt mit folgender Gleichung die Harnsäurekonzentration berechnen:

$$c_{Geckoweiß} = \frac{0,0596}{0,1526} * 0,06 \frac{mg}{ml} * 10020,99 = 234,83 \frac{mg}{ml}$$

Die Konzentration der Probe in mMol ergibt sich, wenn man für die Konzentration der Standardlösung 0,36 mMol einsetzt ($0,06 \text{ mg/ml} = 0,36 \text{ mMol}$). Die Werte der anderen Proben in der oben aufgeführten Tabelle wurden analog berechnet.

Der **24h-Anteil** der Harnsäure im Urin lässt sich über das Gesamtvolumen des Urins (=2300ml), das Volumen der Probe (=0,1 ml) und die Harnsäurekonzentration der Probe (0,32 mg/ml) berechnen.

$$24h - \text{Anteil} = 0,1\text{ml} * 23000 * 0,26 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = 598\text{mg}$$

Versuch 2: Bestimmung des Harnstoffgehaltes verschiedener Proben

Tabelle 4: Harnstoffbestimmung

	Standard	weißer Gecko-Kot	menschlicher Urin	Literaturangaben
Verdünnung	1	1	101	-
E ₁	0,187	0,042	0,050	-
E ₂	0,209	0,049	0,087	-
Mittelwert E	0,198	0,0455	0,0685	-
24h-Menge [l]	-	-	2,3	-
c [mg/ml]	0,3	0,069	10,48	-
c [mmol/l]	5,0	1,149	174,71	-
c [%]	0,12	0,027	4,18	-
Menge [g/24h]	-	-	24,10	20 - 35
Menge [mmol/24h]	-	-	401,833	333 - 583

IV. Diskussion

zu Versuch 1: Bestimmung des Harnsäuregehaltes verschiedener Proben

Aus den Ergebnissen der Tabelle 3 lässt sich erkennen, dass die weiße Kotprobe des Geckos mit 234,83mg/ml bzw. 1408,98mMol mit Abstand den höchsten Harnsäuregehalt aufweist. Der Gecko ist ein Reptil, das bedeutet, dass er zu der Tiergruppe gehört, die überwiegend als stickstoffhaltiges Endprodukt in ihrem Harn Harnsäure ausscheiden. Bei Geckos handelt es sich also um uricotelische Lebewesen. Im Gegensatz zum schwarzen Kot ist vor allem der weiße Kot stark Harnsäurehaltig. Das Ausscheiden von Harnsäure hat besonders für Lebewesen in sehr trockenen Gebieten einen außerordentlichen Vorteil, denn Harnsäure ist sehr schlecht wasserlöslich und lässt sich so in völlig trockenem Zustand absondern. Das Wasser bleibt somit dem Organismus erhalten. Bei extremem Wassermangel steigt der Harnsäuregehalt des Kots und es wird weißer Kot abgeschieden, ist hingegen genügend Wasser vorhanden, so wird schwarzer Kot gebildet, der eine wesentlich geringere Harnsäurekonzentration, aber eine höhere Harnstoffkonzentration aufweist.

Die Konzentration der Harnsäure in der untersuchten Urinprobe des Menschen ist mit 0,26mg/ml bzw. 1,56mMol im Vergleich zum Gecko wesentlich geringer. Der Mensch ist ein Säugetier und zählt somit zu den ureotelischen Lebewesen. Dies bedeutet, dass als Endexkret vor allem Harnstoff ausgeschieden wird. Die Harnsäure entsteht im Menschen neben Allantoin durch den Purinabbau. Der Harnsäuregehalt im menschlichen Exkret sollte laut Literaturwerten

zwischen 0,25 und 0,75g/24h liegen. Der ermittelte Wert unserer Versuchsperson liegt bei 0,26mg/ml bzw. 0,598g/24h und fällt somit in diesen Normalwertbereich.

Alle ermittelten Werte bewegen sich in der zu erwartenden Größenordnung und weichen nicht von den Literaturwerten ab.

zu Versuch 2: Bestimmung des Harnstoffgehaltes verschiedener Proben

Die Konzentration des Harnstoffs im weißen Gecko-Kot ist extrem niedrig. Dies war zu erwarten, da der Gecko ein uricotelisches Tier ist und seine Stickstoffabfälle im Wesentlichen in Form von Harnsäure ausscheidet.

Der Mensch ist ureotelisch; er scheidet wie die meisten Säuger Harnstoff aus, um die Stickstoffabfälle aus dem Amino- und Nukleinsäurestoffwechsel zu beseitigen. Deshalb ist die Harnstoffkonzentration im menschlichen Urin auch entsprechend hoch.

Wie Tabelle 2 zeigt, liegt die in 24 Stunden ausgeschiedene Harnstoffmenge unseres Probanden im Bereich der Normalwerte.

V. Zusammenfassung

Aufgrund der oben erläuterten Versuche lassen sich folgende Erkenntnisse festhalten:

- Der Gecko ist ein uricotelisches Tier. Er scheidet mit dem weißen Kot Stickstoffabfälle in Form von Harnsäure aus. Mit dem schwarzen Kot werden lediglich unverdauliche Nahrungsüberreste abgegeben.
- Der Mensch ist ureotelisch. Deshalb enthält der menschliche Urin eine hohe Konzentration an Harnstoff, mithilfe dessen überschüssiger Stickstoff aus dem Amino- und Nukleinsäurestoffwechsel beseitigt wird, und nur geringe Mengen Harnsäure.

Literaturverzeichnis

- **Versuchsskript „Kurs Exkretion“**, Anfängerpraktikum Tierphysiologie, Abschnitt Stoffwechselphysiologie, WS 03/04
- **„Tierphysiologie“**, Eckert u.A.; Thieme Verlag, 2.Auflage 1993
- **„Biologie“**, Campbell; Spektrum Verlag, 1. deutsche Auflage 1997
- **„Zoologie“**, Wehner, Gehring; Thieme Verlag, 22.Auflage 1991
- **„Kurzes Lehrbuch der Biochemie“**, Karlson u.A.; Thieme Verlag, 14.Auflage 1994
- **„Lehrbuch der Tierphysiologie“**, Penzlin; Gustav Fischer Verlag, 5. Auflage 1991