

Adenosin und Urat modulieren die Sauerstoffversorgung  
des Sumpfkrebsees *Astacus leptodactylus*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jeannette van de Meer  
aus Düsseldorf

Düsseldorf, 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M.K. Grieshaber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. C.R. Bridges

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Januar 2004

Meinen Eltern

*„Die Monde ohne R sind gut zum Reisen, zum  
Hochzeitmachen und zum Krebsespeisen.“*

Volksmund



Zuerst möchte ich Herrn Prof. M.K. Grieshaber für die Zeit danken, die er mich in seinem Institut betreut und meine Arbeit gefördert hat. Sein Interesse, seine Diskussionsbereitschaft und die vielseitigen Anregungen waren mir bei meiner Arbeit immer sehr hilfreich.

Herrn Prof. C.R. Bridges danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für zahlreiche interessante Gespräche, deren Inhalte nicht nur von Crustaceen bestimmt wurden.

Ich danke auch allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes für Zoophysikologie für ihre Hilfsbereitschaft, ihren Teamgeist, ihre konstruktive Kritik bei Diskussionen und Vortragsvorbereitungen sowie für viele schöne Stunden außerhalb des Institutes.

Vor allem danke ich meinen Eltern, die mich die vielen Jahre auf jegliche Weise unterstützt haben und auch in schwierigsten Situationen immer für mich da waren. Zudem geht ein Dank an meine ganze Familie und an meine Freunde für stete Motivation und geduldige Ohren.

An die Deutsche Forschungsgemeinschaft richtet sich mein letzter Dank, da sie meine Arbeit über mehrere Jahre unterstützte.



---

<b><u>1. EINLEITUNG .....</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>2. MATERIAL UND METHODEN .....</u></b>	<b><u>12</u></b>
2.1 VERSUCHSTIERE .....	12
2.2 CHEMIKALIEN.....	12
2.3 MESSUNGEN MIT DEM PULSED-DOPPLER-FLOWMETER.....	12
2.3.1 INFUSIONSLÖSUNGEN .....	12
2.3.1.1 Ringer-Lösung.....	12
2.3.1.2 Purinderivatlösungen.....	13
2.3.2 PRÄPARATION DER VERSUCHSTIERE FÜR DIE DOPPLER-MESSUNGEN .....	13
2.3.3 VERSUCHSAUFBAU.....	14
2.3.4 VERSUCHSPROTOKOLLE .....	15
2.3.4.1 Infusionsversuche.....	15
2.3.4.2 Versuch zur funktionellen Hypoxie .....	16
2.3.4.3 Versuch zur biotopbedingten Hypoxie.....	16
2.3.5 DAS PRINZIP DER DOPPLERMESSUNGEN.....	17
2.3.6 DATENAUFZEICHNUNG UND AUSWERTUNG.....	20
2.4 BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON PURINDERIVATEN .....	20
2.4.1 VERSUCHSAUFBAU.....	20
2.4.2 VERSUCHSPROTOKOLLE .....	21
2.4.2.1 Normoxie.....	21
2.4.2.2 Hyperoxie.....	22
2.4.2.3 biotopbedingte Hypoxie .....	22
2.4.2.4 funktionelle Hypoxie.....	22
2.4.3 PROBENENTNAHME .....	23
2.4.3.1 Hämolympfproben.....	23
2.4.3.2 Gewebeproben.....	23
2.4.4 EXTRAKTION DER PURINDERIVATE .....	23
2.4.4.1 Extraktion der Purinderivate aus der Hämolymphe .....	23
2.4.4.2 Extraktion der Purinderivate aus dem Gewebe .....	24
2.4.5 KONZENTRIERUNG DER EXTRAKTE MITTELS FESTPHASENEXTRAKTION (SPE).....	24
2.4.6 BESTIMMUNG DER PURINKONZENTRATIONEN MITTELS RP-HPLC.....	25
2.4.6.1 Bestimmung der Konzentrationen von Adenosin und Inosin .....	25

2.4.6.2	Bestimmung der Konzentration von Urat .....	26
<b>2.5</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG.....</b>	<b>28</b>
<b>3.</b>	<b><u>ERGEBNISSE .....</u></b>	<b><u>29</u></b>
<b>3.1</b>	<b>DIE WIEDERFINDUNG DER PURINDERIVATE IN HÄMOLYMPHE UND GEWEBE.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>DIE EFFEKTE VON PURINDERIVATEN AUF HERZKREISLAUFPARAMETER UND DEREN KONZENTRATION IN HÄMOLYMPHE UND GEWEBE UNTER NORMOXISCHEN INKUBATIONSBEDINGUNGEN .....</b>	<b>30</b>
3.2.1	MESSUNG DER ARTERIELLEN FLIEßGESCHWINDIGKEIT DER HÄMOLYMPHE SOWIE DER HERZFREQUENZ MIT HILFE DER PULSED-DOPPLER-FLOWMETRIE.....	30
3.2.1.1	Einfluß des Infusionsvolumens .....	30
3.2.1.2	Purinderivatkonzentration der Infusionen.....	31
3.2.1.3	Dauer der Infusionen.....	33
3.2.1.4	Kumulation der Infusionen.....	36
3.2.1.5	Infusion verschiedener Purinderivate des ATP-Katabolismus.....	38
3.2.2	BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON ADENOSIN, INOSIN UND URAT IN DER HÄMOLYMPHE.....	44
3.2.3	BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON ADENOSIN, INOSIN UND URAT IN VERSCHIEDENEN GEWEBEN.....	45
<b>3.3</b>	<b>DIE URATKONZENTRATION IN DER HÄMOLYMPHE UNTER MODERATER HYPEROXIE</b>	<b>47</b>
<b>3.4</b>	<b>DIE AUSWIRKUNG EINER BIOTOPBEDINGTEN HYPOXIE AUF DIE HERZKREISLAUFPARAMETER UND DIE PURINKONZENTRATIONEN IN HÄMOLYMPHE UND GEWEBE .....</b>	<b>48</b>
3.4.1	MESSUNG DER ARTERIELLEN FLIEßGESCHWINDIGKEIT DER HÄMOLYMPHE UND DER HERZFREQUENZ MIT HILFE DER PULSED-DOPPLER-FLOWMETRIE.....	48
3.4.2	BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON ADENOSIN, INOSIN UND URAT IN DER HÄMOLYMPHE.....	52
3.4.2.1	Biotopbedingte Hypoxie über vier und über 20 Stunden .....	52
3.4.2.2	Die Akkumulation von Urat in Abhängigkeit von unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken .....	54
3.4.3	DIE KONZENTRATION VON ADENOSIN, INOSIN UND URAT IN VERSCHIEDENEN GEWEBEN NACH 24 STUNDEN BIOTOPBEDINGTER HYPOXIE .....	55

---

<b>3.5 DIE AUSWIRKUNG EINER AKUTEN FUNKTIONELLEN HYPOXIE AUF DIE HERZKREISLAUFPARAMETER UND DIE PURINKONZENTRATIONEN IN HÄMOLYMPHE UND GEWEBE .....</b>	<b>57</b>
3.5.1 MESSUNG DER ARTERIELLEN FLIEßGESCHWINDIGKEIT UND DER HERZFREQUENZ MIT HILFE DER PULSED-DOPPLER-FLOWMETRIE .....	58
3.5.2 BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON ADENOSIN, INOSIN UND URAT IN DER HÄMOLYMPHE.....	60
3.5.3 BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON ADENOSIN, INOSIN UND URAT IN VERSCHIEDENEN GEWEBEN.....	61
<b><u>4. DISKUSSION .....</u></b>	<b>64</b>
<b>4.1 CARDIOVASCULÄRE AUSWIRKUNGEN INFUNDIERTER PURINDERIVATLÖSUNGEN BEI <i>ASTACUS LEPTODACTYLUS</i> .....</b>	<b>65</b>
4.1.1 EINFLÜSSE DURCH DIE INFUSION VON FLÜSSIGKEIT IN DAS KREISLAUFSYSTEM .....	65
4.1.2 ABSCHÄTZUNG DER INFUSIONSBEDINGUNGEN .....	66
4.1.3 INFUSION DER ADENYLATE ATP, ADP, AMP UND ADENOSIN.....	69
4.1.4 INFUSION WEITERER ATP-ABBAUPRODUKTE.....	76
<b>4.2 DIE AUSWIRKUNG EINER BIOTOPBEDINGTEN HYPOXIE AUF HERZKREISLAUF UND PURINKONZENTRATIONEN VON <i>ASTACUS LEPTODACTYLUS</i>.....</b>	<b>77</b>
4.2.1 EFFEKTE EINER MANGELNDEN SAUERSTOFFVERSORGUNG UND GLEICHZEITIGER ADENOSININFUSION AUF DEN HERZKREISLAUF .....	77
4.2.2 EFFEKTE EINER MANGELNDEN SAUERSTOFFVERSORGUNG AUF DIE VERTEILUNG DER PURINDERIVATE IN HÄMOLYMPHE UND GEWEBE.....	82
4.2.2.1 Konzentrationen in der Hämolymphe .....	82
4.2.2.2 Konzentrationen in verschiedenen Geweben .....	86
<b>4.3 DIE AUSWIRKUNG EINER FUNKTIONELLEN HYPOXIE AUF HERZKREISLAUF UND PURINKONZENTRATIONEN VON <i>ASTACUS LEPTODACTYLUS</i>.....</b>	<b>88</b>
4.3.1 EFFEKTE EINES ERHÖHTEN SAUERSTOFFBEDARFS DURCH MUSKULÄRE AKTIVITÄT AUF DEN HERZKREISLAUF .....	88
4.3.2 EFFEKTE EINES ERHÖHTEN SAUERSTOFFBEDARFS DURCH MUSKULÄRE AKTIVITÄT AUF DIE VERTEILUNG DER PURINDERIVATE IN HÄMOLYMPHE UND GEWEBE.....	95
4.3.2.1 Konzentrationen in der Hämolymphe .....	95
4.3.2.2 Konzentrationen in verschiedenen Gewebe .....	96

<b><u>5.</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b><u>99</u></b>
<b><u>6.</u></b>	<b><u>LITERATUR.....</u></b>	<b><u>101</u></b>
<b><u>7.</u></b>	<b><u>ANHANG .....</u></b>	<b><u>115</u></b>

A.d. oder II	Arteria descendens
A.l. oder III	Arteria(e) lateralis(es)
A.p. oder I	Aorta posterior
AD	Außendurchmesser
ADA	Adenosindesaminase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AID	analog input device
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ANOVA	Analysis of Variance
APEC	2-[(2-aminoethylamino)carbonylethylphenylethylamino]-5- <i>N</i> -ethyl-carboxamidoadenosine
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bpm	beats per minute
C	Chela (Schere)
CCAP	crustacean cardioactive peptide
CPA	N <sup>6</sup> -cyclopentyladenosine
CSC	8-(3-chlorostyryl)caffeine
dp	Datenpunkt
ec	endcapped
EHNA	Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin
H	Hepatopankreas
Hf, f <sub>H</sub> oder IV	Herzfrequenz
HL	Hämolymphe
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HSM	HPLC System Manager
HWZ	Halbwertszeit
HZV	Herzzeitvolumen
IB-MECA	N <sup>6</sup> -(3-iodobenzyl)5'-( <i>N</i> -methylcarbamoyl)adenosine
ID	Innendurchmesser
IMP	Inosin-5'-monophosphat
LM	Laufmittel
MRS 1067	3,6-dichloro-2'-isopropoxy-4'-methylflavone
NO	Stickoxid
P	Pleon (Abdomen bzw. Krebschwanz)
PCA	Perchlorsäure
PE	Polyethylen
PNP	Purinnucleosidphosphorylase
PNS	peripheres Nervensystem
PO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PRPP	5'-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
PVC	Polyvinylchlorid
RCF	relative centrifugal force
RP	reversed-phase
R-PIA	( <i>R</i> )N <sup>6</sup> -phenylisopropyladenosine
SD	Standardabweichung
SPE	solid phase extraction
v	Geschwindigkeit
VF	Verdünnungsfaktor
X	Mittelwert
XAC	xanthine amine congener
XDH	Xanthindehydrogenase
ZNS	zentrales Nervensystem



## 1. Einleitung

„*The heart of animals is the foundation of their life, the sovereign of everything within them...from which all power proceeds.*“ Die Äußerung William Harveys (Willis 1910 zitiert in Schultz 2002) stand im Einklang mit der Erkenntnis Claudius Galens, der schon um 150 n.Chr. die Pumpfunktion als wesentliche Aufgabe des Herzens sah (Teichmann 1992). Allerdings wurde erst 1628 die alte galenische Lehre von der Blutbewegung durch William Harvey widerlegt, der mit seiner Berechnung des „Halbstundenvolumens“ die Existenz des Blutkreislaufs bewies (Teichmann 1992): „*...it is a matter of necessity that the blood performs a circuit, that it returns to whence it set out*“ (Willis 1910 zitiert in Schultz 2002).

Die Zirkulation des Blutes verläuft bei Vertebraten, aber auch bei vielen Anneliden und Cephalopoden in einem geschlossenen Gefäßsystem, während bei Arthropoden und allen anderen Mollusken ein offenes Herzkreislaufsystem vorliegt (Wehner und Gehring 1990). Da innerhalb der Mollusken die Cephalopoden sekundär ein geschlossenes System entwickelt haben, hat man das offene System unterhalb des geschlossenen Systems eingestuft (Bourne und McMahon 1990). Inzwischen ist aber bekannt, daß z.B. das offene Blutgefäßsystem der Crustaceen komplizierter gebaut und organisiert ist als angenommen wurde und funktionell dem Vertebratensystem entspricht (McMahon und Burnett 1990; Reiber und McMahon 1998).

Das muskulöse, einkammrige Herz der Decapoden liegt median am dorsalen hinteren Rand des Cephalothorax im Pericardialsinus, wo es durch hauptsächlich sechs Ligamente befestigt ist, die dem Herzen seine rhombische Gestalt verleihen (Baumann 1921; Kükenthal 1984). Der Pericardialsinus ist gegen die anliegenden Organe durch ein Septum abgegrenzt, so daß die sauerstoffreiche Hämolymphe aus den Kiemen nur über die gefäßartigen Branchiopericardialkanäle eintreten kann. Über drei Paar zweilippige Ostien, die einen muskelumsäumten Rand besitzen, gelangt die Hämolymphe ins Herz und wird von dort in Arterien gepumpt, die offen im Mixocoel enden. Von einem großen, ventral gelegenen Blutsinus aus, fließt die sauerstoffarme Hämolymphe über die Kiemen zurück zu den Branchiopericardialkanälen.

Vom Herzen der Decapoden entspringen sieben Hauptgefäße, darunter die Aorta anterior und zwei Arteriae laterales an der vorderen Herzspitze (Abb. 1.1). Die Aorta anterior verläuft unverzweigt rostral und erweitert sich ampullenartig zum Cor frontale, einem muskulösen Nebenherzen, das die Pumpfunktion des Herzens durch aktive Blutbewegung unterstützt und kurz vor der Aortengabelung sitzt, über die das Cerebralganglion, die Augen und Antennen versorgt werden. Beiderseits der Aorta anterior verlaufen die Arteriae laterales, die sich

## 2 Einleitung

---

verzweigen und zu den Kopfanhängen, Magenwänden und Exkretionsorganen führen. Teile des Darms, des Hepatopancreas und die Gonaden werden über die ventral vom Herzen abzweigenden *Arteriae hepaticae* versorgt. Am caudalen Ende des Herzens ist die Aorta posterior zu einem Bulbus (*Bulbus arteriosus*) erweitert, von dem nach ventral die *Arteria descendens* abzweigt, die sich dann in rostrale *Arteria subneuralis* (Versorgung der Bauchganglienkette, Mundwerkzeuge, Thoracalmuskulatur) und caudale *Arteria subneuralis* (Versorgung der posterioren Ganglien und ventralen Anteile der Extremitäten) aufgliedert. Die Aorta posterior versorgt über segmentale Äste die gesamte Abdominalmuskulatur, den posterioren Darm, Pleopoden, Uropoden und Telson (Baumann 1921; McLaughlin 1983; Kükenthal 1984).

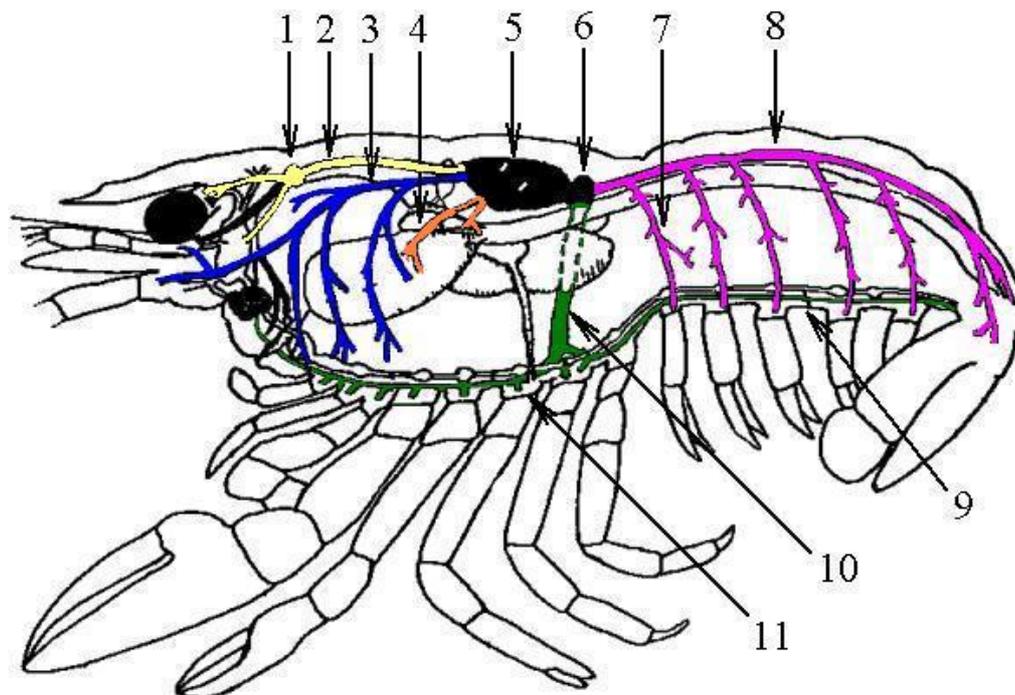


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des offenen Kreislaufsystems eines Flußkrebsees. 1. Cor frontale, 2. Aorta anterior, 3. linke Arteria lateralis, 4. linke Arteria hepatica, 5. Herz mit einem lateralen und einem dorsalen Ostium, 6. Bulbus arteriosus, 7. eine der Arteriae laterales abdominales, 8. Aorta posterior, 9. caudale Arteria subneuralis, 10. Arteria descendens, 11. rostrale Arteria subneuralis (verändert nach McLaughlin 1983)

Semilunare Klappen trennen die Gefäße vom Herzen und verhelfen zu einem unidirektionalen Hämolympffluß (Maynard 1960), da die Klappen während der Diastole aneinandergedrückt werden und somit ein Reflux verhindert wird (Baumann 1921; McMahan und Burnett 1990). Die muskulösen Klappen befinden sich an jedem Gefäßvorsprung, mit Ausnahme der Aorta posterior: dort sind nur am Ursprung der lateralen abdominalen Arterien Klappen vorhanden und mit Muskeln assoziiert (Maynard 1960). Alle Klappen werden neuronal innerviert und können rhythmisch kontrahieren, wodurch die Verteilung des Herzaus-

stoßes kontrolliert werden kann (Alexandrowicz 1932; McMahon und Burnett 1990). Bis auf die zu den Klappen benachbarten Stellen (Martin und Hose 1995) sind die großen Arterien dünne Strukturen ohne Muskelschicht (von Buddenbrock-Hettersdorff 1967), wobei Burnett (1984) und Wilkens et al. (1997a) die Aorta posterior davon ausnehmen.

Das Herzzeitvolumen (HZV) wird durch zwei Faktoren variiert, durch die Herzfrequenz und durch das Schlagvolumen. Das Schlagvolumen ist von der Füllung des Herzens während der Diastole und von dem Auswurf der Hämolymphe während der Systole abhängig. Dabei bestimmen Durchmesser der Ostienöffnung und Grad der Ventrikelausdehnung die diastolische Füllung, die Kontraktionskraft des Myocards und der Widerstand der arteriellen Gefäße den systolischen Auswurf (McMahon und Burnett 1990). Die Regulation des Crustaceenherzens ist neurogener Natur und beruht auf dem Zusammenspiel verschiedener Strukturen: (1) dem Herzganglion, (2) den Dorsalnerven, (3) den Nerven der arteriellen Klappen und (4) dem Pericardialorgan. Das Herzganglion ist ein y-förmiger, autonomer Nervenapparat, der an der inneren dorsalen Herzwand liegt und auf dem sich bei *Astacus astacus* 16 Zellen befinden (Alexandrowicz 1932). Die acht kleinen Zellen stellen den Schrittmacher dar, die acht großen Zellen innervieren das Myocard. Zusammen bewirken sie die Initiation der Herzkontraktion, die Kontrolle der Herzrate und die Kontraktilität des Herzmuskels. Die Dorsalnerven, die jeweils aus zwei regulatorischen Nerven und einem inhibitorischen Nerv bestehen, verbinden das ZNS und das Herz miteinander. Darüber kann die Herzaktivität auf chronotroper als auch auf inotroper Ebene über Effekte auf den Schrittmacher oder direkt auf das Myocard reguliert werden. Nerven der Arterienklappen regulieren den Auswurfwiderstand und sorgen für eine Muskelkontraktion während der Diastole (Alexandrowicz 1932; Maynard 1960; von Buddenbrock-Hettersdorff 1967; McMahon und Burnett 1990). Am Ende der Thoracalnerven, die in die Pericardialhöhle eintreten, liegt auf den Ligamenten sowie an der dorsalen Oberfläche des Herzens ein feines Netzwerk, das Pericardialorgan. 1953 entdeckten Alexandrowicz und Carlisle die neurosekretorische Funktion des Pericardialorgans, dessen freigesetzte Neurohormone cardioaktiv sind, da sie die Herzfrequenz regulieren (Alexandrowicz 1953), aber auch den Ventrikeldruck und die Hämolympffließgeschwindigkeit in der A. descendens verändern (Wilkens et al. 1996). Zu den Neurohormonen des Pericardialorgans gehören Amine wie 5-HT, Octopamin und Dopamin (Cooke und Sullivan 1982) sowie die bei Wilkens et al. (1996) aufgeführten Peptide Proctolin, CCAP und die FLRFamid ähnlichen.

Eine Änderung der cardiovasculären Parameter wird häufig im Zusammenhang mit Sauerstoffmangelsituationen beschrieben. Solche Situationen treten auf, wenn sich das Sauerstoffangebot innerhalb des Biotops ändert oder sich durch die Aktivität des Tieres die Stoff-

wechselrate erhöht und der Sauerstoffbedarf steigt. Um in diesen Fällen die Sauerstoffversorgung im Gewebe aufrechtzuerhalten, ist es notwendig, die physiologischen Systeme anzugleichen (McMahon und Burnett 1990). Die Anpassung erfolgt sowohl auf zirkulatorischer und respiratorischer Ebene, als auch auf sauerstofftransportierende Systeme (Cameron und Mangum 1982). So konnten McMahon und Wilkens (1975) in *Homarus americanus* ein vermindertes Herzzeitvolumen durch Änderung der Herzfrequenz während biotopbedingter Hypoxie messen, im Gegensatz dazu stieg bei den Tieren die Scaphognathitenfrequenz an. Auch funktionelle Hypoxie, wie starkes Schlagen des Abdomens, erhöhte bei *Homarus americanus* den arteriellen Hämolympffluß und die Herzrate. Auch die Scaphognathitenfrequenz und damit die Ventilationsrate wird erhöht (Stegen 2001). Nicht nur die starke Flexion des Abdomens, sondern allein die Lauftätigkeit bewirkte in *Cancer magister* (De Wachter und McMahon 1996b) und *Homarus americanus* (Rose et al. 2001) eine Veränderung der gleichen Parameter. Stärkere Ventilation und Fließgeschwindigkeit des Blutes bedingen einerseits eine höhere Hämolymphezufuhr in die Kiemen, wodurch mehr Sauerstoff aufgenommen werden kann, andererseits einen schnelleren Transport der respiratorischen Blutpigmente und eine Erhöhung der Sauerstofftransportkapazität (Cameron und Mangum 1983; McMahon und Burnett 1990). Die Sauerstoffversorgung der Gewebe wird jedoch nicht nur durch die Sauerstofftransportkapazität sondern auch durch die Modulation der Blutpigmente erreicht. Letztere hängt von verschiedenen Faktoren ab. So zeigte sich am Hämocyanin der Crustaceen, daß neben anorganischen Ionen wie  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  und  $Cl^-$  (Mangum 1983; Bridges und Morris 1986) auch L-Lactat (Truchot 1980) und vor allem Urat (Morris et al. 1985; Bridges und Morris 1986; Lallier et al. 1987; Zeis und Grieshaber 1993) während Hypoxie die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins erhöhen. Czytrich et al. (1989) und Lallier et al. (1987) konnten bei *Astacus leptodactylus* und bei *Carcinus maenas* tatsächlich nachweisen, daß Urat während einer biotopbedingten Hypoxie signifikant in der Hämolymphe ansteigt. Weiterhin ist bekannt, daß bei Vertebraten während einer Hypoxie und Ischämie das Purinderivat Adenosin aus Herz-, Skelettmuskeln und Nervengewebe freigesetzt wird (Gerlach et al. 1963; Berne et al. 1987; Böhm 1987; Bruns und Fergus 1989; Nilsson und Lutz 1992; Darvish und Metting 1993; Haas und Selbach 2000) und auch Muskelaktivität zu einer Erhöhung der Adenosinkonzentration führt (Langberg et al. 2002). Für Invertebraten wurde ein Adenosinanstieg im Nervengewebe von *Sipunculus nudus* beschrieben (Reipschläger et al. 1997).

Adenosin moduliert viele biologischen Funktionen, z.B. wirkt es als Neuromodulator, inhibiert die präsynaptische Freisetzung von Transmittern wie Acetylcholin, Noradrenalin, Dopamin, Glutamat und GABA, inhibiert die Lipolyse und die Catecholaminfreisetzung, stei-

gert die Histaminfreisetzung, beeinflusst die Adenylatcyclase und vor allem sind die myocardialen Effekte von Bedeutung (Burnstock 1978; Fredholm 1980; Schubert und Mager 1989; Nilsson und Lutz 1992; Julien 1997). Bereits 1929 zeigten Drury und Szent-Györgyi einen adenosininduzierten negativ chronotropen Effekt an Herzen von Säugetieren sowie eine arterielle Dilatation im Bereich der Coronargefäße. Im Laufe der Zeit wurde zunehmend über negativ chronotrope (Fredholm 1980; Deussen et al. 1988, Böhm 1987), negativ dromotrope (Böhm 1987) und negativ inotrope Effekte (Chiba und Himori 1975; Fredholm 1980; Böhm 1987) bei Vertebraten berichtet, die durch Adenosin ausgelöst worden waren. Dabei konnten sowohl eine Vasodilatation im Gewebe von Gehirn, Herz und Lunge (Gillespie 1934; Berne 1963; Burnstock 1978; Pearson und Gordon 1984; Julien 1997) gemessen werden, als auch eine Vasokonstriktion bei der Nierenzirkulation (Burnstock 1978). Bei Invertebraten (*Homarus americanus*) steigerte die Infusion von Adenosin die Herzfrequenz und die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe in verschiedenen Arterien (Stegen und Grieshaber 2001).

Diese Ausführungen verdeutlichen, daß sowohl Urat als auch Adenosin eine entscheidende Rolle bei der Versorgung des Organismus mit Sauerstoff spielen, jedoch auf sehr unterschiedlichen Ebenen ansetzen. Es stellt sich deshalb die Frage nach der Entstehung beider Purinmetabolite im Gewebe. Adenosin kann über den Methylierungsweg entstehen, indem *S*-Adenosylhomocystein durch *S*-Adenosylhomocysteinase zu Adenosin und Homocystein umgesetzt wird. Dieser Weg dient nicht zur großartigen Bildung von Adenosin, aber zur Aufrechterhaltung einer niedrigen intrazellulären Adenosinkonzentration (Daly 1982). Hauptsächlich werden Adenosin und Urat während des ATP-Katabolismus (Abb. 1.2) gebildet, wenn die Energieversorgung abnimmt, oder die Energieanforderung die Versorgung übersteigt und ein Energiedefizit entsteht (Daly 1982; Bruns und Fergus 1989; Bruns 1990; Fredholm et al. 2000). Dabei wird ATP über ADP zu AMP transphosphoryliert, das dann über zwei mögliche Wege zum Inosin abgebaut werden kann. Ein Weg verläuft über Adenosin und wird mit Hilfe einer 5'-Nucleotidase katalysiert. Von der 5'-Nucleotidase existieren eine membrangebundene, extrazelluläre Form (e-N) und drei cytosolische Formen (e-Ns, c-N-I und c-N-II), so daß Adenosin sowohl intra-, als auch extrazellulär gebildet werden kann. Zwei der rein löslichen, cytosolischen Formen unterscheiden sich in ihrer Affinität gegenüber dem Substrat: c-N-I bevorzugt AMP und setzt dieses zu Adenosin um, wohingegen c-N-II eine höhere Affinität für IMP besitzt und die Hydrolyse zu Inosin katalysiert (Zimmermann 1992; Hu et al. 1993). Die Konzentration des Adenosins ist abhängig von der Aktivität der 5'-Nucleotidase, der Adenosinkinase, die für die Rückreaktion zum AMP verantwortlich ist, und der Adenosindesaminase, die aus Adenosin Inosin bildet.

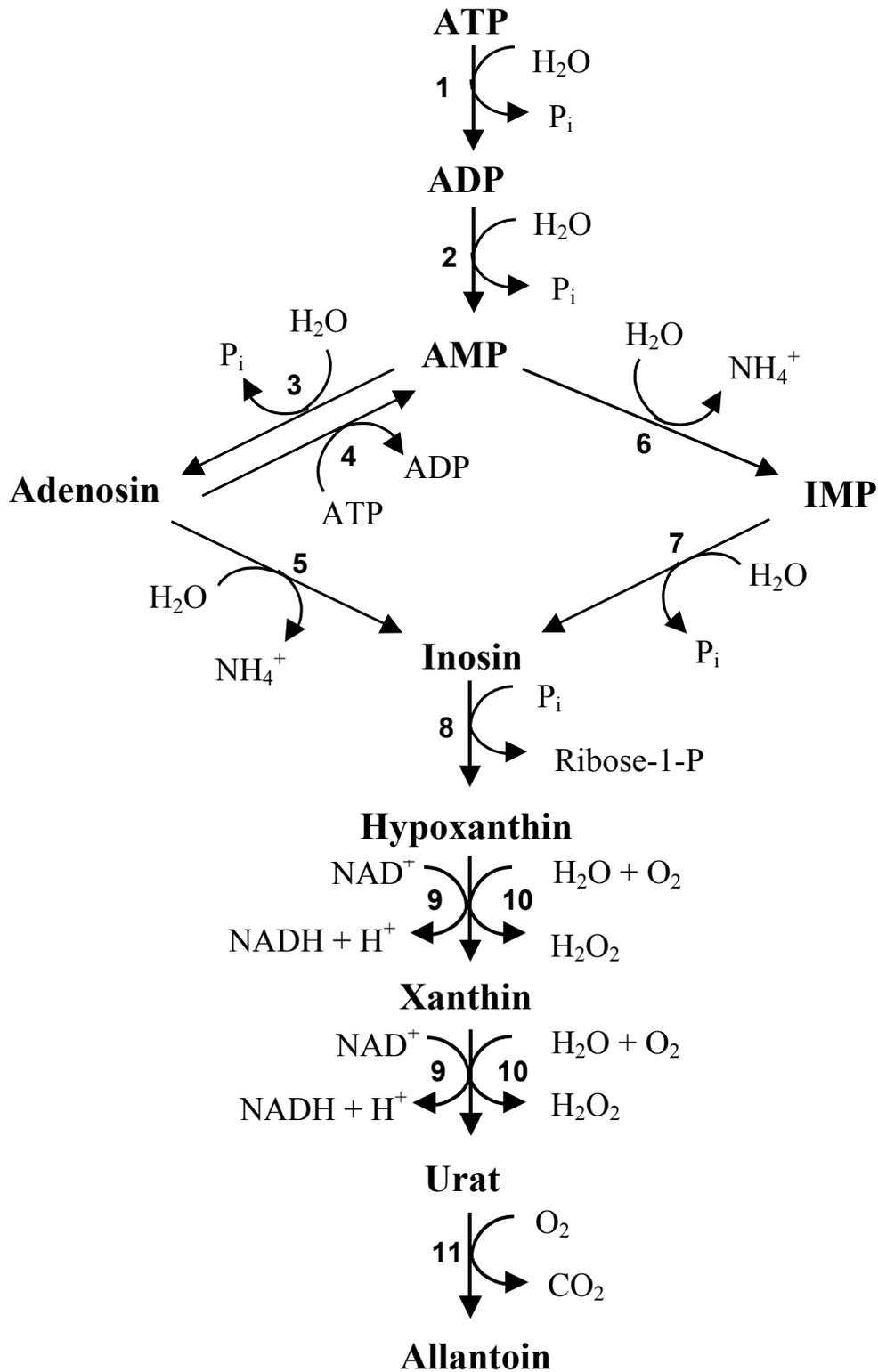


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des ATP-Katabolismus bis zur Stufe des Allantoins. 1+2: Kinasen, 3: AMP-spezifische 5'-Nucleotidase 4: Adenosinkinase, 5: Adenosin-Desaminase, 6: AMP-Desaminase, 7: IMP-spezifische 5'-Nucleotidase, 8: Purinnucleosidphosphorylase, 9: Xanthin-Dehydrogenase, 10: Xanthin-Oxidase, 11: Uricase

Da die Adenosinkinase substratgемhmt ist, kann das Gleichgewicht der Reaktionen zum Adenosin verschoben werden, wenn sich die Aktivität der 5'-Nucleotidase erhöht (Arch und Newsholme 1978). Der andere Weg vom AMP zum Inosin verläuft über IMP und wird

durch die AMP-Desaminase katalysiert. Hier existiert keine direkte Rückreaktion vom IMP zum AMP, vielmehr verläuft der Umweg unter Verbrauch von Aspartat über das Adenylosuccinat (Urich 1990; Stryer 1991). IMP ist auch das primäre Produkt bei der *de novo*-Purinsynthese (Urich 1990), wenn es nicht neben AMP und GMP bei der weniger aufwendigen Wiederverwertungsreaktion (salvage pathway) unter PRPP-Verbrauch entsteht (Stryer 1991). Nach Claybrook (1983) fehlt Crustaceen allerdings die Fähigkeit zur *de novo*-Purinsynthese, was Urich (1990) jedoch nicht bestätigt. In der Literatur finden sich kontroverse Meinungen über den Weg, der vom AMP zum Inosin eingeschlagen wird. Gerlach et al. (1963) zeigten in Vertebraten organspezifisch die Existenz beider Wege. Den Abbau zum Adenosin wiesen Fijisawa und Yoshino (1987) bei Vertebraten in der Skelettmuskulatur und dem Herzmuskel nach, aber auch bei Invertebraten ist der Weg nicht ausgeschlossen. Roush und Betz (1956) fanden im Hepatopankreas von Hummer und Flusskrebs Adenosindesaminaseaktivität und Arch und Newsholme (1978) konnten entsprechende Aktivität an Adenosinkinase und Adenosindesaminase im Muskel- und Nervengewebe von *Homarus vulgaris* nachweisen, allerdings keine für die 5'-Nucleotidase. Ebenso konnte der Weg über IMP in Fischen (Dingle und Hines 1971) und in Herzmyocyten (Hu et al. 1993) bestätigt werden, zudem im Abdominalmuskel von *Orconectes limosus* (Stankiewicz 1982) und von *Palaemon serratus* (Raffin und Thebault 1987). Allerdings scheint sich die AMP-Desaminase bei den Invertebraten strukturell und funktionell von der Vertebraten-Desaminase zu unterscheiden, deren Aktivität wesentlich höher ist (Dingle und Hines 1974; Stankiewicz 1982; Raffin und Thebault 1987; Urich 1990). Der weitere Abbau des Inosins zum primären Endprodukt Urat erfolgt über Hypoxanthin und Xanthin. Für beide Reaktionen ist eine Xanthin-Oxidoreduktase verantwortlich, die in zwei Formen vorliegt. Je nach Sauerstoffverfügbarkeit werden die Katalysen durch die Xanthin-Oxidase (XO), die molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor nutzt, oder durch die Xanthin-Dehydrogenase (XDH), die Elektronen auf  $\text{NAD}^+$  überträgt, durchgeführt (Olsson und Pearson 1990; Linton und Greenaway 1998). Lallier und Walsh (1991) fanden beide Enzyme in terrestrischen und aquatischen Krabben, wobei die Aktivität der XDH im Vergleich zur XO meist höher war. Durch beide Enzymformen ist unabhängig vom Sauerstoff der Abbau bis zum Urat gewährleistet. Urat kann je nach Organismus unter normoxischen Bedingungen durch die Uricase zu Allantoin und weiter über Allantoinensäure und Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxid abgebaut werden (Uricolyse) (Claybrook 1983). Da jedoch die Uricase sauerstoffabhängig ist (Dykens 1991), kommt es unter Sauerstoffmangel z.B. bei *Astacus leptodactylus* zu einer Akkumulation von Urat (Czytrich 1990), das dann an Hämocyanin bindet und dessen Sauerstoffaffinität erhöht.

Im Gegensatz zum Urat werden die biologische Effekte der Purinderivate ATP, ADP und Adenosin über Zelloberflächenrezeptoren, den Purinrezeptoren, vermittelt (Ralevic und Burnstock 1998). Erste Hinweise auf die Existenz verschiedener Purinrezeptoren gab Gillespie 1934, als er die unterschiedliche Wirkung von ATP und Adenosin auf den Blutdruck des Kaninchens (*Leporidae*) und der Katze (*Felis*) zeigte. Eine formale Unterscheidung der Purinrezeptoren in die zwei Rezeptortypen P1 und P2 (Tab. 1.1) erfolgte dagegen erstmals 1978 von Burnstock.

Tab. 1.1: Einteilung der Purinrezeptoren in Nucleosidrezeptoren (P1) und Nucleotidrezeptoren (P2) nach unterschiedlicher Literatur (in Klammern)

	<b>P1-Rezeptor</b>	<b>P2-Rezeptor</b>	
alternative Bezeichnung	Adenosinrezeptor (1,2)	ATP-Rezeptor (1)	
natürliche Liganden	Adenosin (2)	ATP, ADP, UTP, UDP Adenindinucleotide (2)	
Untergruppe		<b>P2X (2)</b>	<b>P2Y (2)</b>
Rezeptortyp	G-Protein-gekoppelt (1,2,3)	ligandenkontrollierter Ionenkanal (1,2,3)	G-Protein-gekoppelt (1,2,3)
Entwicklung der Subtypen	A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> (4) R <sub>i</sub> , R <sub>a</sub> (5) A <sub>3</sub> (6,7) A <sub>1a</sub> , A <sub>1b</sub> , A <sub>2a</sub> , A <sub>2b</sub> , A <sub>3</sub> (8) A <sub>1a</sub> , A <sub>1b</sub> , A <sub>2a</sub> , A <sub>3</sub> (9) A <sub>1a</sub> , A <sub>1b</sub> , A <sub>2a</sub> , A <sub>2b</sub> , A <sub>3</sub> , A <sub>4</sub> (10)	P <sub>2X</sub> , P <sub>2Y</sub> , P <sub>2T</sub> , P <sub>2Z</sub> (11) P <sub>2X</sub> , P <sub>2Y</sub> , P <sub>2S</sub> , P <sub>2T</sub> , P <sub>2Z</sub> (8)	
aktuelle Subtypen	A <sub>1</sub> , A <sub>2a</sub> , A <sub>2b</sub> , A <sub>3</sub> (2,3)	P <sub>2X</sub> <sub>1-7</sub> , P <sub>2X</sub> <sub>n</sub> (2,3)	P <sub>2Y</sub> <sub>1</sub> , P <sub>2Y</sub> <sub>2</sub> , P <sub>2Y</sub> <sub>4</sub> , P <sub>2Y</sub> <sub>6</sub> , P <sub>2Y</sub> <sub>11</sub> , P <sub>2Y</sub> <sub>ADP</sub> (2,3)
<b>nicht-selektive Antagonisten</b>	Xanthinderivate, z.B. Theophyllin, Koffein (2)	z.B. Suramin (2)	
Einfluß auf die Herzaktivität	negativ inotrop (8)	positiv oder negativ inotrop (8)	
Lokalisation	prä- und postsynaptisch (8)	vorwiegend postsynaptisch (8)	
Calcium-Permeabilität	Abnahme (8)	Zunahme (8)	

Literatur: (1) Mutschler 1996, (2) Ralevic und Burnstock 1998, (3) Illes et al. 2000, (4) Van Calcar et al. 1979, (5) Londos et al. 1980, (6) Ribeiro und Sebastião 1986, (7) Zhou et al. 1992, (8) Stone 1991, (9) Tucker und Linden 1993, (10) Abe et al. 1997, (11) Burnstock 1989

Dabei verhalfen Kriterien, wie relative Potenz der Agonisten (ATP, ADP, AMP und Adenosin), die selektive Wirkung von Antagonisten, die Aktivierung der Adenylatcyclase durch Adenosin sowie die Induktion der Prostaglandinsynthese durch ATP, zur Klassifizierung dieser beiden Rezeptorgruppen (Burnstock 1978, 1989). So war es im Laufe der Zeit möglich, P1- und P2-Rezeptoren weiter zu unterteilen. Für den P1-Rezeptor wurden primär zwei Subtypen beschrieben, die G-Protein-gekoppelt sind und sich in ihrer Eigenschaft der Inhibierung ( $A_1/R_i$ ), bzw. der Aktivierung ( $A_2/R_a$ ) der Adenylatcyclase und der damit verbundenen cAMP-Konzentration unterscheiden (Van Calcar et al. 1979; Londos et al. 1980; Burnstock 1989). Ein dritter P1-Subtyp ( $A_3$ ) wurde 1986 von Ribeiro und Sebastião postuliert und 1992 von Zhou et al. nachgewiesen. Dieser Adenosinrezeptor scheint wie der  $A_1$ -Rezeptor inhibierend auf die Adenylatcyclase zu wirken (Illes et al. 2000). In weiterführenden Untersuchungen wurden neue Subtypen angegeben:  $A_{1a}$ ,  $A_{1b}$  (Stone 1991),  $A_{2a}$ ,  $A_{2b}$  (Stone 1991; Olah und Stiles 1995),  $A_4$  (Abe et al. 1997).

Tab. 1.2: Einteilung der Adenosinrezeptoren/P1-Rezeptoren in die Subtypen nach unterschiedlicher Literatur (in Klammern)

	<b>A<sub>1</sub></b>	<b>A<sub>2A</sub></b>	<b>A<sub>2B</sub></b>	<b>A<sub>3</sub></b>
G-Protein (1)	G <sub>i/o</sub>	G <sub>s</sub>	G <sub>s</sub> G <sub>q</sub>	G <sub>i</sub> G <sub>q</sub>
Transmitterfreisetzung (1,2)	Inhibierung cAMP ↓ IP <sub>3</sub> ↑ K <sup>+</sup> ↑ Ca <sup>2+</sup> ↓	Aktivierung cAMP ↑	Aktivierung cAMP ↑	Inhibierung cAMP ↓
Effekte (1)		—	IP <sub>3</sub> ↑	IP <sub>3</sub> ↑
selektive Agonisten (1,3)	N <sup>6</sup> -substituierte Analoga z.B. CPA, R-PIA	5'-substituierte Analoga z.B. APEC	—	z.B. IB-MECA
selektive Antagonisten (1)	z.B. XAC	z.B. CSC	—	z.B. MRS 1067
Lokalisation (1,2)	präsynaptisch u. postsynaptisch u.a. Neurone, Herzmuskel	u.a. ZNS, PNS, glatte Gefäßmuskeln, Endothel	u.a. glatte Muskulatur der Atemorgane, Gefäße	präsynaptisch u.a. Herz
cardiovasculäre Effekte (2,4)	neg. chronotrop neg. inotrop neg. dromotrop	Vasodilatation	Vasodilatation	evt. negativ inotrop
Adenosinaffinität (1)	$A_1 > A_{2A} > A_{2B} > A_3$			

Literatur: (1) Ralevic und Burnstock 1998, (2) Stone 1991, (3) Burnstock 1989, (4) Shryock und Belardinelli 1997

Heute geht man davon aus, daß bei den Adenosin-P1-Rezeptoren nur vier Subtypen  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  und  $A_3$  existieren (Tab. 1.2) und die sich in ihren molekularen, biochemischen sowie pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden (Ralevic und Burnstock 1998). Ähnlich den Adenosin-P1-Rezeptoren wurden auch die endogenen P2-Rezeptoren aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften in P2X- und P2Y-Rezeptoren eingeteilt. Dabei gehören die P2X-Rezeptoren zu den ligandenkontrollierten Ionenkanalrezeptoren, während die P2Y-Rezeptoren wie die Adenosinrezeptoren G-Protein-gekoppelt sind (Burnstock 1989; Mutschler 1996). Bisher konnten für Mammalia sieben Subtypen der P2X-Familie ( $P2X_{1-7}$ ) und fünf Subtypen der P2Y-Familie ( $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$ ,  $P2Y_6$ ,  $P2Y_{11}$ ) geklont werden (Ralevic und Burnstock 1998; Illes 2000). Die aktuelle Nomenklatur wurde aufgrund der Übereinstimmung des pharmakologischen Profils geklonter und endogener Rezeptoren entwickelt und ersetzte die alten Rezeptorbezeichnungen  $P_{2X}$ ,  $P_{2Y}$ ,  $P_{2U}$ ,  $P_{2T}$ ,  $P_{2Z}$  (Ralevic und Burnstock 1998). Bei Invertebraten wurden ebenfalls Effekte beschrieben, die von Purinrezeptoren vermittelt werden (Cox und Walker 1987; Hoyle und Greenberg 1988; Burnstock 1996). Daraus ergibt sich die Möglichkeit, daß die rezeptorvermittelten Wirkungen in diesen Tieren über ähnliche Mechanismen ablaufen, wie sie für Vertebraten bekannt sind.

Vor dem Hintergrund dieser Fakten stellen sich nun für die vorliegende Arbeit Fragen zur Modulation der Sauerstoffversorgung von *Astacus leptodactylus* durch die Purinderivate Adenosin und Urat.

In einem Teil der Arbeit soll die Beeinflussung der cardiovasculären Parameter durch die Infusion der einzelnen ATP-Abbauprodukte *in vivo* untersucht werden und zeigen, ob die Adenylate und das Adenosin bei *Astacus leptodactylus* Änderungen in der Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe und der Herzfrequenz bewirken. Auch sollen die Auswirkungen einer biotopbedingten und funktionellen Hypoxie weiteren Aufschluß darüber geben, wie sich das Herzkreislaufsystem an Sauerstoffmangelsituationen anpaßt und welche Regulationsmechanismen dies ermöglichen.

Ein weiterer Teil beschäftigt sich mit der Konzentration der Purinderivate Adenosin, Inosin und Urat in der Hämolymphe und in verschiedenen Geweben von *Astacus leptodactylus*. Hier sollen die Verschiebungen der Metabolitkonzentrationen in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit ermittelt werden und zur Beantwortung folgender Fragen beitragen:

1. In welchen Konzentrationen liegen die drei Purinderivate in der Hämolymphe und im Gewebe in Abhängigkeit vom  $PO_2$  vor?

2. Findet eine Akkumulation der Purinderivate während biotopbedingter und funktioneller Hypoxie statt?
3. Wenn eine Anhäufung auftritt, sind die Akkumulationsorte der einzelnen Purinderivate unterschiedlich und geben dadurch Hinweise auf ihre jeweilige physiologische Rolle?

Letztendlich soll mit Hilfe aller Ergebnisse erklärt werden, wie die purininduzierten Effekte vermittelt werden und wie möglicherweise eine rezeptorvermittelte Übertragung aussehen könnte. Abschließend sollte eine Aussage über die Anpassung von *Astacus leptodactylus* an Sauerstoffmangelsituationen in seinem Lebensraum auf Ebene der zirkulatorischen und sauerstofftransportierenden Systeme möglich sein.

### 2. Material und Methoden

#### 2.1 Versuchstiere

Überwiegend männliche Flußkrebse der Art *Astacus leptodactylus* wurden über die Firmen Crayfish Company (Düsseldorf) und Feinkost Langbein (Hamburg) bezogen. Die Krebse wurden in Aquarien mit belüftetem Leitungswasser gehältert, dessen Temperatur mit der Raumtemperatur schwankte. Der Tag-Nacht-Rhythmus folgte dem natürlichen Lichteinfall in den Hälterungsraum. Durch regelmäßigen Wasserwechsel sowie durch Wasserumwälzung mittels einer Filterpumpe (EHEIM professionel, Deizisau) betrug der Nitritgehalt des Aquarienwassers  $< 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ . Für die Versuche wurden Krebse verwendet, deren mittleres Gewicht  $122 \pm 24 \text{ g}$  betrug und die sich im Zwischenhäutungsstadium befanden. Zweimal wöchentlich wurden die Tiere mit Erbsen, Krabben oder Hühnerherzen gefüttert, wohingegen kurz vor und während der experimentellen Phase keine Fütterung der verwendeten Versuchstiere erfolgte.

#### 2.2 Chemikalien

Die verwendeten Feinchemikalien wurden von den Firmen Acros (Geel, Belgien), Baker (Deventer, Niederlande), Bernd Kraft (Duisburg), Merck (Darmstadt), LGC Promochem (Wesel), Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen. Die Enzyme lieferten die Firmen Boehringer (Mannheim) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), die Gase, Stickstoff (4.0) und Sauerstoff (handelsübliche Qualität), die Firma Messer Griesheim (Krefeld).

#### 2.3 Messungen mit dem Pulsed-Doppler-Flowmeter

##### 2.3.1 Infusionslösungen

###### 2.3.1.1 Ringer-Lösung

Nach Van Harreveld (1936) wurde eine physiologische Salzlösung (Ringer) für Süßwasserkrebse hergestellt, die als Grundlage für alle Infusionen diente. Für einen Liter Ringer-Lösung wurden  $205,34 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$ ,  $13,50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $5,36 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KCl}$ ,  $2,62 \text{ mmol L}^{-1} \text{ MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$  und  $2,38 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$  in einem Liter hochreinem Wasser (Millipore, Bedford, USA) gelöst und auf einen pH-Wert von 7,55 eingestellt. Diese Ringer-Lösung wird auch heute noch für verschiedene Krebsarten eingesetzt, so z.B. 1984 von Masabau und Burtin für *Astacus leptodactylus*, als auch 2001 von Aonuma und Newland für *Pacifastacus leniusculus*.

### 2.3.1.2 Purinderivatlösungen

Für die Infusionen wurden aus den jeweiligen Purinderivaten und der Ringer-Lösung Stammlösungen hergestellt, die entsprechend dem Gewicht der Versuchstiere verdünnt wurden, um so bei gleicher Infusionsgeschwindigkeit die Applikation der gleichen Purinkonzentration in jedes Tier zu gewährleisten. Die Konzentration der Stammlösung betrug bei ATP, ADP, AMP, IMP und Inosin  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , bei Adenosin 10, 15 und  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  und bei Hypoxanthin und Urat aufgrund der schlechten Löslichkeit beider Substanzen in Ringer-Lösung nur  $2 \text{ mmol L}^{-1}$ .

### 2.3.2 Präparation der Versuchstiere für die Doppler-Messungen

Jedem Versuchstier wurde nach hypothermaler Anaesthetie auf Eis maximal drei piezoelektrische Transducerkristalle ( $\varnothing 1 \text{ mm}$ ,  $180^\circ$ , 20 MHz; Iowa Doppler Products, Iowa City, USA) (Abb. 2.1) implantiert sowie für die Infusionsversuche zusätzlich ein Infusionskatheter gelegt. Für die Katheterisierung wurde ein spitzes, mit Infusionslösung gefülltes Stück PE-Schlauch (0,5/1,0 ID/AD; SIMS Portex Ltd., GB) zwischen dem dritten und vierten Schreitbeinpaar durch das Gelenkhäutchen ca. 1 cm weit in den ventralen Blutsinus eingeführt. Die sofortige, bolusartige Injektion von Infusionslösung verhinderte das Verstopfen des Schlauchendes durch mögliche Hämolymphekoagel. Fixiert wurde der Katheter mit Gewebefixativ und Cyanoacrylat am seitlichen Cephalothorax des Krebses. Über ein 3-Wege-Ventil (Hamilton, Darmstadt) war der Katheter mit einer Spritze und einem Perfusor (Precidor Infors AG, Basel, CH) verbunden.

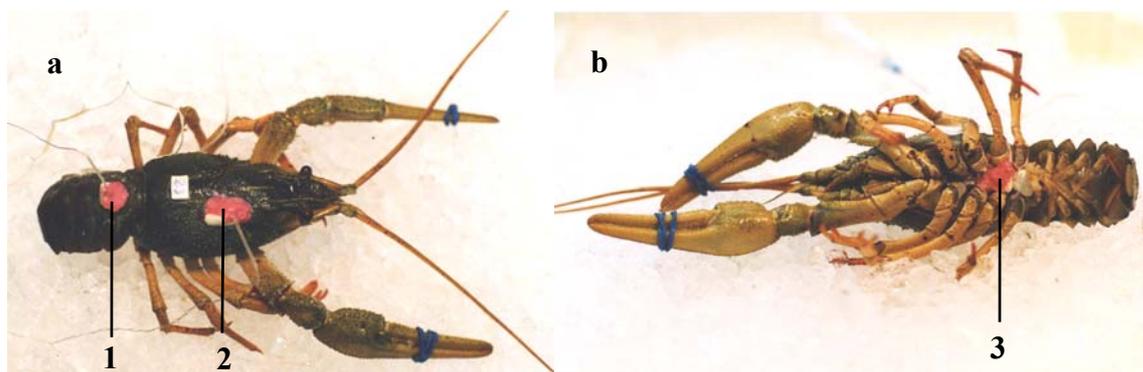


Abb. 2.1: Dorsale (a) und ventrale (b) Ansicht eines für die Pulsed-Doppler-Flowmetrie präparierten *Astacus leptodactylus*. Die mit Plastilin, Dentalwachs und Cyanoacrylat fixierten piezoelektrischen Transducerkristalle wurden im Bereich der A. posterior (1), der A. lateralis (2) und der A. descendens (3) eingeführt

Um die piezoelektrischen Transducerkristalle in die Nähe der Arterien einführen zu können, mußte mit einem Zahnarztbohrer (KaVo EWL, Leutkirch i.A.; 1 mm Bohrkopf: Mei-

singer, USA) für die Aorta descendens auf der ventralen Seite zwischen dem dritten und vierten Schreitbeinpaar der Carapax perforiert werden. Die Öffnung für die Aorta posterior befand sich in der Mitte des zweiten Abdominalsegments, das für die Arteria lateralis in Höhe der Nackenfurche, ca. 1 cm neben der Meridianebene. Durch vorsichtige Drehbewegungen wurde der Transducerkristall, der im unteren Kabelbereich durch ein Stück PE-Schlauch stabilisiert war, mit seiner breiteren Seite der entsprechenden Arterie in einem 45° Winkel angenähert. Dabei dienten sowohl akustische (hohes, lautes Zischen mit geringem Grundrauschen), als auch optische Signale (phasisches Signal auf dem Monitor) dazu, den Kristall optimal zu positionieren. Ein Stück Plastilin hinter der jeweiligen Bohrung hielt den Kristall in seiner Position. Zusätzlich diente eine dickere Schicht Dentalwachs auf Kristall und Plastilin, überzogen mit Cyanoacrylat, der Fixierung und dichtete die Perforation gegen auslaufende Hämolymphe ab.

### 2.3.3 Versuchsaufbau

Am Vorabend der Dopplerversuche wurde ein einzelner, präparierter *Astacus leptodactylus* zur Akklimatisierung an die Umgebungsbedingungen (20 °C,  $PO_2 < 20$  kPa) in die Versuchsanordnung (Abb. 2.2) eingesetzt.

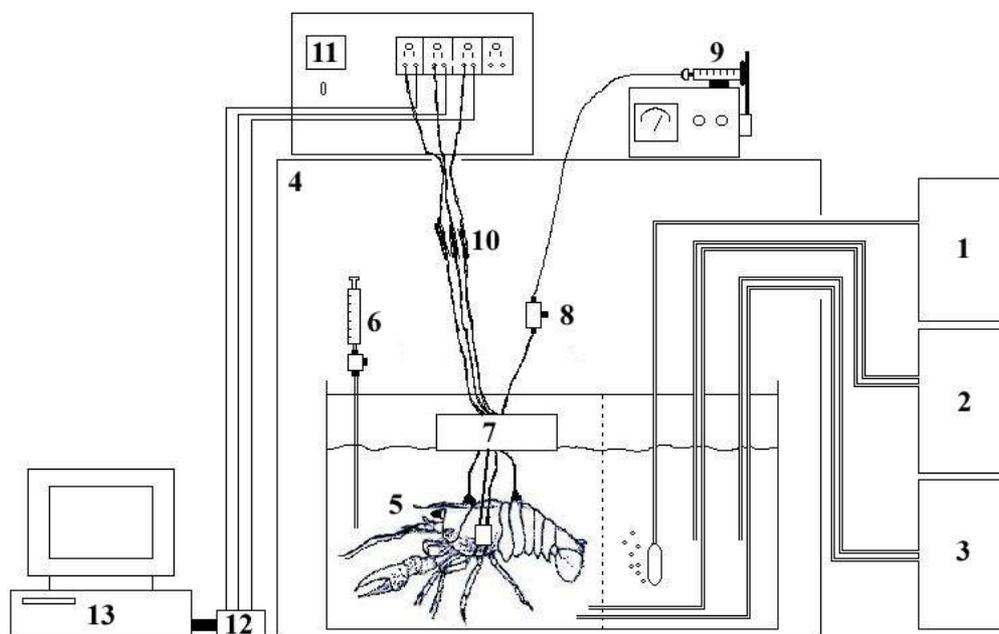


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Messung der Herzkreislaufparameter von *Astacus leptodactylus* mittels Pulsed-Doppler-Flowmetrie. 1: Gaszufuhr (Luft,  $N_2$ ), 2: Umwälzpumpe, 3: Kryothermostat bzw. Raumkühlung, 4: Faraday-Käfig, 5: Versuchsbecken mit Abdeckung, gefüllt mit Leitungswasser, 6: Kanüle mit 3-Wege-Ventil zur Wasserentnahme ( $PO_2$ -Bestimmung), 7: Styroporschwimmer, 8: Infusionsschlauch mit 3-Wege-Ventil, 9: Perfusor, 10: Dopplerkabel mit Zuleitung zum Pulsed-Doppler-Flowmeter, 11: Pulsed-Doppler-Flowmeter, 12: Screw Terminal Board, 13: Computer

Das Versuchsbecken (20·39·29,5 cm) und die Abdeckung (kein gasdichter Verschluss) bestanden aus undurchsichtigem PVC, um visuelle Stimulationen der Versuchstiere zu vermeiden. Es befand sich zur Abschirmung gegen ein äußeres elektrisches Feld innerhalb eines geerdeten Faraday-Käfigs. Mit Hilfe einer Trennwand wurde das Versuchstier im Versuchsbecken in seiner Bewegungsfreiheit eingeschränkt, um bewegungsabhängige Störungen während einer Messung auf ein Minimum zu reduzieren. Das im Versuchsbecken befindliche Leitungswasser wurde je nach Versuchsanordnung kontinuierlich mit Luft oder Stickstoff begast, wobei eine Umwälzpumpe für optimale Gasverteilung im gesamten Wasser sorgte. Um den  $PO_2$  mittels einer Sauerstoffelektrode (PHM 71, Radiometer, Copenhagen) bestimmen zu können, wurde eine Wasserprobe über eine im Deckel angebrachte, ins Versuchsbecken hineinreichende Kanüle entnommen. Da temperaturabhängige Effekte auf Kreislaufparameter bekannt sind (De Wachter und McMahon 1996a), wurde die Wassertemperatur von 20 °C durch eine Kühlschleife, die mit einem externen Thermokryostaten (RM6 Lauda, Lauda-Königshofen) verbunden war, bzw. durch eine Raumkühlung, konstant gehalten. Ein Perfusor infundierte die entsprechend temperierten Infusionslösungen über den gelegten Katheter ins Tier. Das dazwischengeschaltete 3-Wege-Ventil verkürzte den Kathetertotraum zum Tier hin, wodurch beim Wechsel der Infusionslösung (Zwischeninfusion) die Belastung für das Tier verringert werden konnte. Sowohl Katheter als auch die Kabel der Transducerkristalle waren zum Schutz gegen Verwickeln und Herausreißen an einem Styroporschwimmer fixiert. Die Herzkreislaufparameter wurden über die Transducerkristalle und ein angeschlossenes 545C-4 Directional-Pulsed-Doppler-Flowmeter (Bioengineering, University of Iowa, USA) erfaßt, die Signale durch ein Screw Terminal Board zusammengeführt (Keithley Instruments, Cleveland, USA) und mit Hilfe einer speziellen Software (Viewdac®, Keithley Asyst, Taunton, USA) aufgezeichnet.

## **2.3.4 Versuchsprotokolle**

### **2.3.4.1 Infusionsversuche**

Für die Infusionsversuche wurde ein Meßzyklus von 60 Minuten ausgewählt. Jede Messung begann mit einem zehnmütigen Vorlauf ( $t_1-t_{10}$ ), der die Herzfrequenz und die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe in Ruhe repräsentierte und als Kontrolle für die nachfolgenden 40 Meßminuten diente. An den Vorlauf schloß sich eine zehnmütige Infusionsphase ( $t_{11}-t_{20}$ ) an, in der dem Versuchstier eine definierte Menge Purinderivatlösung mit gleichbleibender Geschwindigkeit von 0,046 mL/min infundiert wurde. Bolusartige, voluminöse Injektionen der Purinderivatlösungen wurden vermieden, um baroreflektorische Reakti-

onen auf den Kreislauf des Tieres auszuschließen (Burggren et al. 1990). Um bei gleichbleibender Infusionsgeschwindigkeit immer die gleiche, auf das Gewicht bezogene Purinderivatmenge infundieren zu können, mußten alle Stammlösungen vor der Applikation entsprechend mit Ringer-Lösung verdünnt werden. Reine Ringer-Infusionen dienten primär als Kontrolle für die Purinderivatlösungen, sekundär gaben sie Aufschluß über Volumeneinflüsse.

Für einige Experimente wurden mehrere der beschriebenen Zyklen aneinandergereiht. Die Pausen zwischen den jeweiligen Infusionen betragen je nach Experiment entweder 55 oder 170 Minuten, die vorangegangene Erholungsphase und den nachfolgenden Vorlauf eingerechnet.

Durch kurzzeitige Zwischeninfusionen, bei der die Purinderivatlösungen im Kathetertotraum ausgetauscht wurden, war es möglich, an ein und demselben Tier unterschiedliche Einzelinfusionsexperimente durchzuführen.

### **2.3.4.2 Versuch zur funktionellen Hypoxie**

Das Versuchsprotokoll der Versuche zur funktionellen Hypoxie unterscheidet sich zu dem der Infusionsversuche nur dadurch, daß anstelle der Infusionsphase ( $t_{10}$ - $t_{20}$ ) das Tier während dieses Zeitraums gestört und zur typischen Fluchtreaktion, dem Schwanzschlagen, animiert wurde. Die Fluchtreaktion konnte ausgelöst werden, indem man das Tier im Kopfbereich berührte oder auf den Rücken drehte.

### **2.3.4.3 Versuch zur biotopbedingten Hypoxie**

Die Messung zur biotopbedingten Hypoxie bestand aus zwei Versuchsphasen, einer hypoxischen ( $t_1$ - $t_{120}$ ) und einer daran anschließenden Reoxigenierungsphase ( $t_{120}$ - $t_{210}$ ).

Die hypoxische Phase begann nach einem normoxischen Vorlauf von zehn Minuten ( $t_1$ - $t_{10}$ ) mit der Einleitung von Stickstoff ins Versuchsbecken, bis der  $PO_2$  zum Zeitpunkt  $t_{20}$  unter 4 kPa lag. Während dieser stark hypoxischen Phase, die bis zum Zeitpunkt  $t_{120}$  andauerte, wurde im Zeitraum  $t_{80}$ - $t_{90}$  Adenosinlösung ( $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$ ) infundiert. Nach 120 Minuten ( $t_{120}$ ) wurde dann anstelle des Stickstoffs Luft in das Becken eingeleitet und innerhalb der 90 minütigen Reoxigenierungsphase abermals über zehn Minuten ( $t_{180}$ - $t_{190}$ ) Adenosinlösung ( $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$ ) infundiert. Zum Zeitpunkt dieser Adenosinapplikation lagen bereits normoxische  $PO_2$ -Werte ( $> 20 \text{ kPa}$ ) im Wasser vor. Aus technischen Gründen wurden die Herzkreislaufparameter zwischen beiden Phasen im Zeitraum  $t_{110}$ - $t_{120}$  nicht aufgezeichnet.

### 2.3.5 Das Prinzip der Dopplermessungen

„Die Frequenz einer Wellenbewegung an einem Beobachtungsort ändert sich, wenn der Beobachter und das Erregungszentrum der Welle gegeneinander bewegt werden“ lautet das 1841 von Christian Doppler entdeckte und nach ihm benannte Prinzip (Lecher 1973). Auf dieser Frequenzänderung basiert die Pulsed-Doppler-Flowmetrie. Eine veränderte Frequenz entsteht, wenn emittierte Ultraschallwellen von einem sich bewegenden Körper rückreflektiert werden (Chauveau et al. 1985). Bewegt sich der Empfänger auf die Schallquelle zu, erhöht sich die Frequenz, weil auf den Empfänger pro Zeiteinheit mehr Wellen auftreffen als in Ruhe. Frequenzerniedrigung tritt auf, wenn sich der Empfänger von der Schallquelle entfernt (Franke 1969).

Die Pulsed-Doppler-Flowmetrie ist eine kontinuierliche Meßmethode, die eine *in vivo* Messung der kardiovaskulären Parameter auch in kleinen Tieren ermöglicht. Durch die Verwendung kleiner piezoelektrischer Transducerkristalle, kann der Blutfluß in Gefäßen bis zu einem Durchmesser von 1 mm bestimmt werden. Die Transducerkristalle werden entlang der Gefäßachse positioniert und können nach Implantation über einen längeren Zeitraum im Tier verweilen, da sie gegenüber Gewebsflüssigkeiten sehr tolerant sind. Durch Implantation mehrerer Kristalle lassen sich die Blutflüsse verschiedener Arterien gleichzeitig messen (Hartley und Cole 1974; West 1989). Piezoelektrische Transducerkristalle können aufgrund ihres kristallographischen Feinbaus zu hochfrequenten elastischen Schwingungen angeregt werden. Entweder entstehen bei Zug- oder Druckbeanspruchung in bestimmten Richtungen auf der Kristallfläche elektrische Ladungen bzw. treten umgekehrt mechanische Verformungen des Kristalls durch elektrische Beanspruchung auf (Lecher 1973).

Bei der Pulsed-Doppler-Flowmetrie agiert der einzelne Transducerkristall sowohl als Sender, als auch als Empfänger von Ultraschallwellen. Während eines Funktionszyklus (FZ) (Abb. 2.3) von 16  $\mu\text{s}$  sendet er für 0,8  $\mu\text{s}$  ein Signal mit einer Frequenz von 20 MHz in Richtung des Gefäßes aus, das dort auf die bewegten Hämocyten in einem definierten Probenvolumen von 0,5  $\text{mm}^3$  trifft (West 1989) und von diesen zum Transducer zurück reflektiert wird. Durch die Geschwindigkeit der Hämocyten entsteht bei der Reflexion des Signals eine Zeitverzögerung und damit eine Frequenzveränderung. Nach Emission eines 0,8  $\mu\text{s}$  langen Ultraschallsignals verbleiben dem Transducer für den Empfang des Echos 15,2  $\mu\text{s}$  bis zum Beginn des nächsten Zyklus. Das ebenfalls 0,8  $\mu\text{s}$  lange Echo kann innerhalb dieser 15,2  $\mu\text{s}$  zu jedem Zeitpunkt auftreten (z.B. a2, b2, c2 in Abb. 2.3), je nach Position des Probenvolumens im Gefäßdurchmesser (a1, b1, c1 in Abb. 2.3). Mit Hilfe der „RANGE“-Funktion des Dopplers wird der Abstand des Transducerkristalls zur Reflexionsfläche des Probenvolumens auf einen

bestimmten Punkt im Gefäßdurchmesser (z.B. a1, b1 oder c1) festgelegt und damit auch der Zeitpunkt des Echoempfangs.

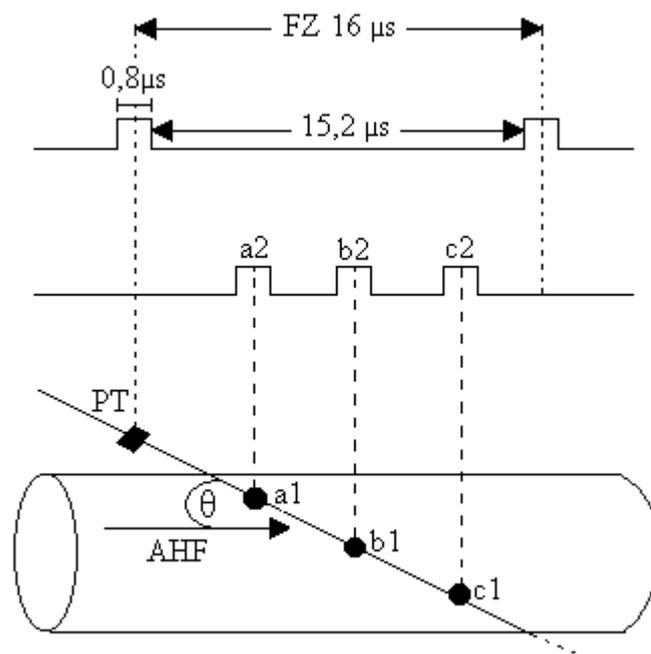


Abb. 2.3: Prinzip der Pulsed-Doppler-Flowmetrie, dargestellt anhand eines schematisierten Funktionszyklus. Die Erklärung der Abbildung erfolgt im Text. FZ: Funktionszyklus; PT: piezoelektrischer Transducerkristall; AHF: arterieller Hämolympfstrom;  $\theta$ : Winkel zwischen Oberfläche des Transducerkristalls und dem Gefäß, im Optimalfall  $\cos 45^\circ$ ; a1, b1, c1: Reflexionsfläche des Probenvolumens an drei möglichen Positionen im Gefäßdurchmesser innerhalb der Reichweite des Transducerkristalls; a2, b2, c2: Zeitpunkte des  $0,8 \mu\text{s}$  langen Echos der von den Positionen a1, b1, c1 reflektierten Ultraschallwellen (verändert nach Hartley et al. 1984).

Die Festlegung des Abstands ist jedoch von der maximalen Reichweite ( $R_{\text{max}}$ ) des Transducerkristalls abhängig, die sich mit Hilfe der Schallgeschwindigkeit des Signals anhand des Funktionszyklus berechnen läßt. Aus Gleichung (2.1) ergibt sich eine maximale Reichweite des Transducerkristalls von 1,13 cm für eine Richtung, innerhalb derer der Hämolympfstrom noch gemessen werden kann

$$R_{\text{max}} = \frac{(t_{\text{FZ}} - (t_{\text{E}_1} + t_{\text{E}_2})) \cdot c}{x} = 1,13 \text{ cm} \quad (2.1)$$

$R_{\text{max}}$  = maximale Reichweite des Transducerkristalls

$t_{\text{FZ}}$  = Zeitspanne des Funktionszyklus [ $16 \mu\text{s}$ ]

$t_{\text{E}_1}$  = Zeitspanne der Ultraschallemission [ $0,8 \mu\text{s}$ ]

$t_{\text{E}_2}$  = Zeitspanne des Ultraschallempfangs [ $0,8 \mu\text{s}$ ]

$c$  = Geschwindigkeit des Schalls in der Hämolymphe [ $0,1565 \text{ cm } \mu\text{s}^{-1}$ ]

$x$  = 2 (für die Hälfte der Wegstrecke)

Die Geschwindigkeit der Hämolymphe läßt sich nach Hartley und Cole (1974) sowie Reiber (1992) mit Hilfe folgender Gleichung berechnen

$$v = \frac{\Delta f \cdot c}{2 \cdot f_0 \cdot \cos\theta} \quad (2.2)$$

- $v$  = Geschwindigkeit der Hämocyten [ $\text{mm s}^{-1}$ ]  
 $\Delta f$  = Frequenzverschiebung/Doppler-Verschiebung [kHz]  
 $c$  = Geschwindigkeit des Schalls in der Hämolymphe [ $1565 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ]  
 $f_0$  = emittierte Frequenz [20 Mhz]  
 $\theta$  = Winkel zwischen Schallrichtungsvektor und der Richtung des Hämolympflusses, im Optimalfall  $\cos 45^\circ = 0,7071$

Der optimale Winkel zwischen Transduceroberfläche und Gefäß beträgt  $45^\circ$  in Blutflußrichtung (Hartley und Cole 1974; West 1989; Reiber 1992). Für den Fall, daß sich dieser Winkel nicht ändert, ist die Frequenzänderung (die Doppler-Verschiebung  $\Delta f$ ) nur von der Geschwindigkeit der Hämolymphe abhängig, was sich in Gleichung (2.3) nach Einsetzen der Konstanten  $c$ ,  $f_0$  und  $\theta$  zeigt

$$v [\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}] = 55,33 [\text{kHz}^{-1}] \cdot \Delta f [\text{kHz}] \quad (2.3)$$

Die Frequenzen der reflektierten Ultraschallwellen werden vom Transducer empfangen und durch das verwendete 545C-4 Directional-Pulsed-Doppler-Flowmeter in elektrische Spannungen umgewandelt. Bei der Umwandlung wird ein gerätespezifischer Faktor eingerechnet, der für das analoge Spannungssignal  $E$  [V] pro kHz Doppler-Verschiebung 0,5 beträgt. Pro kHz Doppler-Verschiebung entsteht ein doppelt so großes Spannungssignal, wie den Gleichungen (2.4) und (2.5) zu entnehmen ist

$$\frac{E [\text{V}]}{\Delta f [\text{kHz}]} = 0,5 \quad (2.4)$$

$$\Delta f [\text{kHz}] = \frac{E [\text{V}]}{0,5} \quad (2.5)$$

Setzt man nun Gleichung (2.5) in Gleichung (2.3) ein, wird deutlich, daß eine lineare Beziehung zwischen der Fließgeschwindigkeit  $v$  der Hämolymphe und dem analogen Ausgangssignal  $E$  besteht

$$v[\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}] = 110,66[\text{kHz}^{-1}] \cdot E[\text{V}] \quad (2.6)$$

### 2.3.6 Datenaufzeichnung und Auswertung

Das Pulsed-Doppler-Flowmeter besitzt Anschlüsse für vier Transducerkristalle, so daß gleichzeitig vier Arterien gemessen werden können. Über den jeweiligen PHASIC-Ausgang werden die gemessenen analogen Signale zu einem Screw Terminal Board (Keithley Instruments, Cleveland, USA) geleitet, dort zusammengeführt und durch ein DAS-1600 Board (Keithley MetraByte/Asyst, Taunton, USA) digitalisiert. Mit Hilfe der Software Viewdac® (Keithley Asyst, Taunton, USA) können die digitalisierten Daten vom Computer aufgezeichnet werden.

In den hier durchgeführten Versuchen betrug die vom Computer aufgezeichnete Datenanzahl 20 dp  $\text{s}^{-1}$ , die als Spannung  $E$  [V] in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  [min] dargestellt wurde. Da laut Gleichung (2.6) die Fließgeschwindigkeit der Spannung proportional ist, lassen sich über die Spannungssignale die Herzfrequenz (Signalanzahl) und die aktuelle Fließgeschwindigkeit sowie Fließrichtung (Amplitude der Signale) ermitteln. Durch Integration der Flächen aller Signale einer Minute, läßt sich nach Einsetzen dieses Wertes in Gleichung (2.6) die Fließgeschwindigkeit [ $\text{mm s}^{-1}$ ] für diesen Zeitraum berechnen.

## 2.4 Bestimmung der Konzentration von Purinderivaten

### 2.4.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau zur Pulsed-Doppler-Flowmetrie (s. 2.3.3) wurde in reduzierter Form für die Experimente zur Konzentrationsbestimmung verschiedener Purinderivate verwendet. Übernommen wurden das Tierbecken sowie die Geräte zur Konstanthaltung der Versuchsparameter (Abb. 2.4).

Das einzeln inkubierte Versuchstier wurde bei minimalem Lichteinfall sichtgeschützt in 20 °C temperiertem Wasser gehältert. Für einige Versuche wurden die benötigten Gase über eine zwischengeschaltete Gasmischpumpe (Wösthoff, Bochum) in bestimmten Verhältnissen gemischt und kontinuierlich eingeleitet. Der  $\text{PO}_2$ -Gehalt wurde auch hier über eine aus dem Versuchsbecken entnommene Wasserprobe kontrolliert. Im Gegensatz zur Pulsed-

Doppler-Flowmetrie war das Versuchstier zur Hämolympfabnahme frei beweglich auf einer Halterung fixiert. So konnte die Hämolymphe über die Perforation aus dem Pericard entnommen werden, ohne das Tier dafür in die Hand nehmen zu müssen und aufzuregen. Für die Gewebeversuche war das Tier auf einer Bank fixiert, die das Decapitieren und das Abtrennen der Gewebestücke erleichterte.

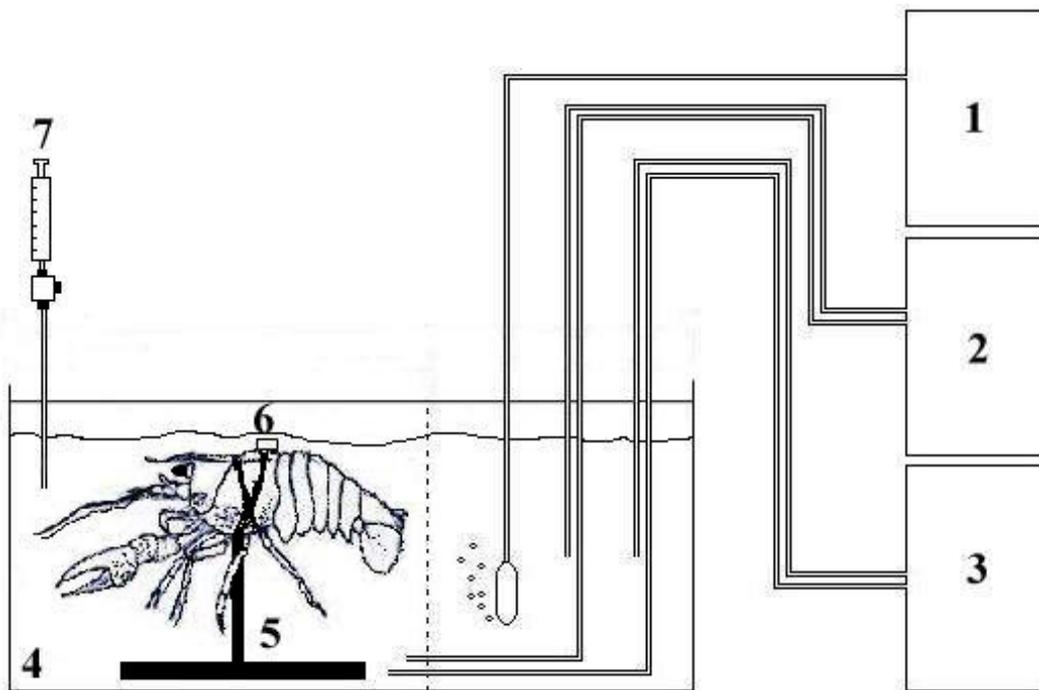


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Bestimmung der Purinkonzentrationen aus der Hämolymphe bzw. dem Gewebe von *Astacus leptodactylus*. 1: Gaszufuhr (Luft, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>), teils mit zwischengeschalteter Gasmischpumpe, 2: Umwälzpumpe, 3: Kryothermostat bzw. Raumkühlung, 4: Versuchsbecken mit Abdeckung, gefüllt mit Leitungswasser, 5: Versuchstier auf einer Halterung fixiert, 6: Bohrloch im Carapax mit Neopren abgedichtet, 7: Kanüle mit 3-Wege-Ventil zur Wasserentnahme (PO<sub>2</sub>-Bestimmung)

## 2.4.2 Versuchsprotokolle

Die Versuchstiere wurden am Vorabend der Experimente auf dem entsprechenden Versuchsgestell fixiert und über Nacht (mindestens 12 Stunden) bei Normoxie und Dunkelheit vorinkubiert, damit sie sich beruhigen und an die Bedingungen akklimatisieren konnten. Das Vorinkubationsbecken entsprach in seinem Aufbau dem Versuchsbecken.

### 2.4.2.1 Normoxie

Für die Versuche unter normoxischen Bedingungen wurde das Versuchstier, nach Abnahme der Hämolympheprobe zum Zeitpunkt  $t_0$ , aus dem Vorinkubationsbecken in ein mit Luft begastetes Becken gesetzt. Von diesem Zeitpunkt an gerechnet, wurden Proben nach ein, zwei, drei oder vier Stunden genommen. Gewebe wurde dagegen nur zum Zeitpunkt  $t_0$  oder

24 Stunden später entnommen und diente als Kontrollprobe für alle Gewebeversuche zur Hypoxie.

### 2.4.2.2 Hyperoxie

Unter hyperoxischer Inkubationsbedingung wurde nur die Konzentration von Urat in der Hämolymphe bestimmt. Das Wasser des Versuchsbeckens wurde dazu mit Sauerstoff und Stickstoff über eine Gasmischpumpe begast, so daß der  $PO_2$  im moderat hyperoxischen Bereich (28 kPa bis maximal 37 kPa) lag. Nach Abnahme des Kontrollwertes ( $t_0$ ) wurde das Versuchstier aus dem normoxisch begasten Vorinkubationsbecken in das Becken mit hyperoxischen Bedingungen gesetzt. Hämolympfproben wurden stündlich über einen Zeitraum von insgesamt vier Stunden entnommen.

### 2.4.2.3 Biotopbedingte Hypoxie

Nach Einsetzen des Versuchstieres in die hypoxische Umgebung ( $PO_2 < 4$  kPa) wurden die Hämolympfproben zuerst stündlich, ab  $t_{4h}$  bis  $t_{20h}$  alle vier Stunden abgezapft.

Uratakkumulationsversuche wurden über 48 Stunden durchgeführt, die Proben jeweils im Abstand von vier Stunden entnommen. Untersucht wurde die Akkumulationsrate bei verschiedenen  $PO_2$ -Werten, die sowohl einen moderat hypoxischen Bereich (13,6 kPa) als auch einen stark hypoxischen Bereich (1,07 kPa) umfaßten.

Im Gegensatz zu den Hämolympfproben wurden die Gewebeproben nach 6, 12, 18 und 24 Stunden genommen.

### 2.4.2.4 Funktionelle Hypoxie

Die Versuche zur funktionellen Hypoxie wurden im Vorinkubationsbecken unter fortwährender Begasung mit Luft durchgeführt.

Hämolympfproben wurden seriell über einen Zeitraum von zwei Stunden zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 12, 30, 60 und 120 Minuten abgenommen. Nach Abnahme der Kontrollprobe ( $t_0$ ), wurde das Tier für zwei Minuten ( $t_1$ - $t_2$ ) zum Schwanzschlagen animiert. Für die Probennahme während der nachfolgenden Erholungszeit ( $t_3$ - $t_{120}$ ) wurde das Tier wieder auf der Halterung fixiert und abgedeckt.

Für die Gewebeversuche wurde das Tier ebenfalls zum Schwanzschlagen angeregt und nach ein bzw. zwei Minuten Aktivität Gewebe entnommen. Proben aus der Erholungsphase konnten 1, 5 bzw. 10 Minuten nach Beendigung der Aktivitätsphase (maximal zwei Minuten) gewonnen werden.

### 2.4.3 Probenentnahme

#### 2.4.3.1 Hämolympheproben

Für die Hämolympheabnahme mußten die Tiere im Vorfeld präpariert werden. Dazu wurde nach hypothermaler Anaesthetie auf Eis der Cephalothorax mit dem Zahnarztbohrer auf der dorsalen Seite oberhalb des Pericards bis auf die Hypodermis perforiert und darauf ein Stück Neopren geklebt. So konnte z.T. mehrmals mit einer Kanüle (0,6 · 30 mm; Nr. 14) durch die Perforation ins Pericard gestochen werden, ohne daß Hämolymphe auslaufen bzw. Wasser aus der Umgebung eindringen konnte.

#### 2.4.3.2 Gewebeprobe

Zur Gewebeentnahme wurde das Versuchstier durch Decapitieren möglichst schnell getötet und dabei das Suboesophagealganglion in Höhe der Nackenfurche durchtrennt. Sofort wurden der Schwanz und dann die linke Schere abgetrennt, im Anschluß daran der Cephalothorax dorsal eröffnet und der Hepatopankreas entnommen. Schwanz- und Scherenmuskel wurden herauspräpariert, kurz in Ringer-Lösung abgespült und abgetupft. Mit Hilfe einer Kühlzange wurden alle drei Gewebestücke in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Wollenberger et al. 1960) und in diesem bis zur Extraktion aufbewahrt. Das Schockgefrieren der Gewebestücke erfolgte in gleicher Reihenfolge wie die Entnahme und dauerte ab Decapitieren maximal  $97 \pm 8$  s.

### 2.4.4 Extraktion der Purinderivate

Eine tabellarische Übersicht über Extraktion und Messung der Purinderivate Adenosin, Inosin und Urat befindet sich im Anhang (Tab. 7.1, S.115).

#### 2.4.4.1 Extraktion der Purinderivate aus der Hämolymphe

Die Hämolymphe wurde in eine vorgekühlte Spritze, die mit  $0,6 \text{ mol L}^{-1}$  eisgekühlter PCA ( $\text{HClO}_4$ ) gefüllt war, aufgezogen und beides sofort miteinander vermischt. Die abgenommene Menge Hämolymphe wurde im Anschluß durch Differenzwägung ermittelt. Adenosin und Inosin konnten aus einer Hämolympheprobe bestimmt werden, für die es ausreichte, die gleiche Menge PCA vorzulegen, wie Hämolymphe aufgezogen werden sollte. Für die Bestimmung des Urats mußte mindestens die drei- bis vierfache Menge PCA vorgelegt werden, damit bei der Proteinfällung so wenig Urat wie möglich mitgerissen wurde. Vor der ersten Zentrifugation (20 min,  $4^\circ\text{C}$ , 47807 RCF) in einer Kühlzentrifuge (Sorvall RC 28 S, Kendro Laboratory Products, Hanau) war es nur bei den Uratproben notwendig, die ausgefällten Pro-

teine zu homogenisieren, um das bei der Denaturierung eingeschlossene Urat möglichst ganz freizusetzen. Nach der Zentrifugation wurde der saure Überstand der Uratproben sofort bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur Messung eingefroren, wohingegen der Überstand der Adenosin- und Inosinproben mit  $0,75\text{ mol L}^{-1}\text{ K}_2\text{HPO}_4$  auf einen pH-Wert zwischen 6 und 7 (Kontrolle mit Universalindikatorpapier, Merck, Darmstadt) eingestellt wurde. Das ausgefallene Perchlorat ( $\text{ClO}_4^-$ ) wurde in einem erneuten Zentrifugationsschritt (20 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 47807 RCF) pelletiert und der Überstand aliquotiert. Ein Aliquot wurde für die Inosinbestimmung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren, der überwiegende Teil des Überstandes aber für die Adenosinbestimmung genutzt und in einer nachfolgenden Festphasenextraktion (SPE; s. 2.4.5) konzentriert.

### 2.4.4.2 Extraktion der Purinderivate aus dem Gewebe

Aus den verschiedenen Gewebestücken wurden die Purinderivate in Anlehnung an Beis und Newsholme (1975) extrahiert. Dazu wurden die gefrorenen Gewebestücke im Mörser mit flüssigem Stickstoff pulverisiert, in eisgekühlte  $0,6\text{ mol L}^{-1}\text{ PCA}$  (mind. 3,5faches Volumen) eingewogen und im Anschluß  $3 \cdot 60\text{ min}$  bei maximaler Geschwindigkeit im Ultra-Turrax (IKA, Janke und Kunkel, Staufen i.Br.) unter Kühlung homogenisiert. Das pulverisierte Gewebe taute auf diese Weise langsam in der kalten PCA auf, so daß alle Enzyme sofort denaturiert wurden. Die nachfolgenden Extraktionsschritte sind mit den unter 2.4.4.1 für die Hämolymphe beschriebenen identisch. Einzige Ausnahme ist die Neutralisation des sauren Überstandes für die Adenosin- und Inosinbestimmung mit  $1\text{ mol L}^{-1}\text{ K}_2\text{HPO}_4$ .

### 2.4.5 Konzentrierung der Extrakte mittels Festphasenextraktion (SPE)

Im Gegensatz zu Inosin und Urat war Adenosin in wesentlich geringeren Konzentration in den Proben enthalten und mußte für die HPLC-Messung konzentriert werden. Die Anreicherung des Adenosins erfolgte über eine Festphasenextraktion, einem physikalischen Extraktionsprozeß, der zwischen einer flüssigen und festen Phase stattfindet (Van Horne 1993). Für die Festphasenextraktion wurden Sep-Pak<sup>®</sup> Classic Cartridges (Waters GmbH, Eschborn) verwendet, deren Sorbens aus oberflächenmodifiziertem Silicagel bestand, dessen verbliebene Silanolgruppen deaktiviert (endcapped) waren und Octadecylsilane (C18) gebunden hatte. Ähnlich den Eigenschaften der RP-HPLC-Säulen, absorbiert dieses stark hydrophobe Sorbens schwach hydrophobe Isolate aus wässrigen Lösungen (Van Horne 1993).

Die Festphasenextraktion wurde in einem umgebauten Exsikkator durchgeführt, in dem die Proben mit Hilfe eines Vakuums von einem Reservoir (Plastikspritzen) über die Sep-Pak<sup>®</sup> Classic Cartridges geleitet und das Isolat (angereichertes Adenosin) aufgefangen wurde. Im ersten Extraktionsschritt, der Solvatisierung, wurde das Sorbens mit  $2\text{ mL } 70\% \text{ Methanol}$

benetzt, wodurch sich die am Sorbens gebundenen C18-Ketten aufrichteten. Im Anschluß wurde das Sorbens in einem weiteren Vorkonditionierungsschritt mit 2 mL einer 5 mmol L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (pH 6,5) äquilibriert. Sowohl Solvatisierung als auch Äquilibrierung ermöglichen eine optimale Retention des Adenosins an dieser vorbereiteten stationären Phase (Van Horne 1993). Danach wurden 4 bis 14 mL Probe aufgetragen und langsam über das Sorbens geleitet. Ebenfalls zurückgehaltene Interferenzen wurden mit 6 mL einer 5 mmol L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung (pH 6,5) ausgewaschen. Erst im letzten Schritt erfolgte die Elution des Adenosins mit 3 mL 70 % Methanol, das die Wechselwirkung zwischen stationärer Phase und Adenosin effizient aufhob. Das aufgefangene Eluat wurde über Nacht in einem Speed Vac Concentrator (Savant/Saur, Reutlingen) eingetrocknet und für die Konzentrationsbestimmung (2.4.6) verwendet.

#### **2.4.6 Bestimmung der Purinkonzentrationen mittels RP-HPLC**

Das Prinzip der RP-HPLC beruht auf einem Umkehrphasensystem, bei dem die stationäre Phase unpolar und die mobile Phase polar ist. Charakteristisch für diese Art von Adsorptions-Chromatographie ist die Verzögerung von Substanzen mit zunehmend hydrophobem Charakter. Die verwendeten RP-Säulen (Merck, Darmstadt) bestehen wie die unter 2.4.5 beschriebenen Sep-Pak<sup>®</sup> Classic Cartridges aus oberflächenmodifiziertem Silicagel mit gebundenen C18-Ketten (Unger 1989).

Zur Bestimmung der Purinderivate wurden zwei HPLC-Anlagen der Firma Merck/Hitachi (Darmstadt/Tokyo) verwendet, die jeweils aus einer Niederdruckgradientenpumpe (L-6200 bzw. L-6200A Intelligent Pump), einem Autosampler (AS-2000 bzw. L-7200 LaChrom) und einem UV-Detektor (L-4250 bzw. L-7400 LaChrom) bestanden. Die Datenaufnahme und Umwandlung übernahmen ein D-6000 Interface bzw. ein AID. Die Chromatogramme wurden anfänglich mit dem Software-Programm D-6000 HSM (Merck/Hitachi), später mit einer neueren HSM-Version (D-7000, Merck/Hitachi) als Spannungen [mV] pro Zeiteinheit [min] aufgezeichnet und ausgewertet. Die Peakidentifizierung der zu bestimmenden Purinderivate erfolgte durch Abbau dieser mit den entsprechenden Enzymen (Adenosin: ADA, Inosin: PNP, Urat: Uricase). Quantifiziert wurden die gemessenen Purinderivate mit Hilfe eines Standardgemisches, mit dem regelmäßig eine Kalibrierung durchgeführt wurde.

##### **2.4.6.1 Bestimmung der Konzentrationen von Adenosin und Inosin**

Die eingetrockneten Adenosinproben wurden in maximal 600 µL Laufmittelgemisch resuspendiert und gelöst, während die Inosinproben direkt im Anschluß an die Extraktion gemessen werden konnten. Die Proben wurden auf einer LiChrospher<sup>®</sup> RP-18 Säule (250 · 4 mm,

5 $\mu$ m, ec) mit Vorsäule gleichen Materials (4 · 4 mm, 5 $\mu$ m, ec) aufgetrennt. Nach einer Methode von Deussen et al. (1988) dienten ein Gemisch aus 0,03 mol L<sup>-1</sup> Ammoniumacetat mit 0,025 mmol L<sup>-1</sup> EDTA Na<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O und 5 % Methanol, pH 6,2 (LM A) sowie ein Methanol-Wasser-Gemisch im Verhältnis 2:1 (LM B) als Laufmittel für die Retention und Elution der Purinderivate in den Proben. Die Analyse erfolgte bei einer Durchflußrate von 1 mL min<sup>-1</sup> und dem in Tab. 2.1 dargestellten Gradienten. Detektiert wurde Adenosin bei 259 nm und Inosin bei 248 nm.

Tab. 2.1: Gradient der Laufmittel A und B [%] über die gesamte Analysezeit von 40 min zur Bestimmung von Adenosin und Inosin mittels RP-HPLC

t [min]	0	22	27	30,5	32	40
LM A [%]	95	82	0	0	95	95
LM B [%]	5	18	100	100	5	5

Trotz bestmöglicher Modifikation der Meßmethode konnte der Adenosinpeak in der chromatographischen Auftrennung nur selten als Einzelpeak eluiert werden. Daher wurde im Falle des Adenosins die Berechnung der Peakfläche über die Differenz vor und nach Abbau des Purinderivats mit Adenosindesaminase (ADA) (4 $\mu$ L einer 1:200 Verdünnung) in ein und derselben Probe durchgeführt und konnte so exakt bestimmt werden (Abb. 2.5).

#### 2.4.6.2 Bestimmung der Konzentration von Urat

Die Uratkonzentration wurde in Anlehnung an Wynants et al. (1987) aus dem sauren Extraktionsüberstand bestimmt. Eine LiChrospher® RP-select B Säule (125 · 4 mm, 5 $\mu$ m) mit Vorsäule gleichen Materials (4 · 4 mm, 5 $\mu$ m) diente zur Auftrennung. Als Laufmittel wurde 0,3 mol L<sup>-1</sup> Ammoniumdihydrogenphosphatlösung mit 1 % Methanol, pH 2,2, verwendet, das mit einer Durchflußrate von 0,7 mL min<sup>-1</sup> isokratisch durch die Anlage gepumpt wurde. Die Analysezeit betrug 13 min und die Detektion des Urats erfolgte bei 293 nm.

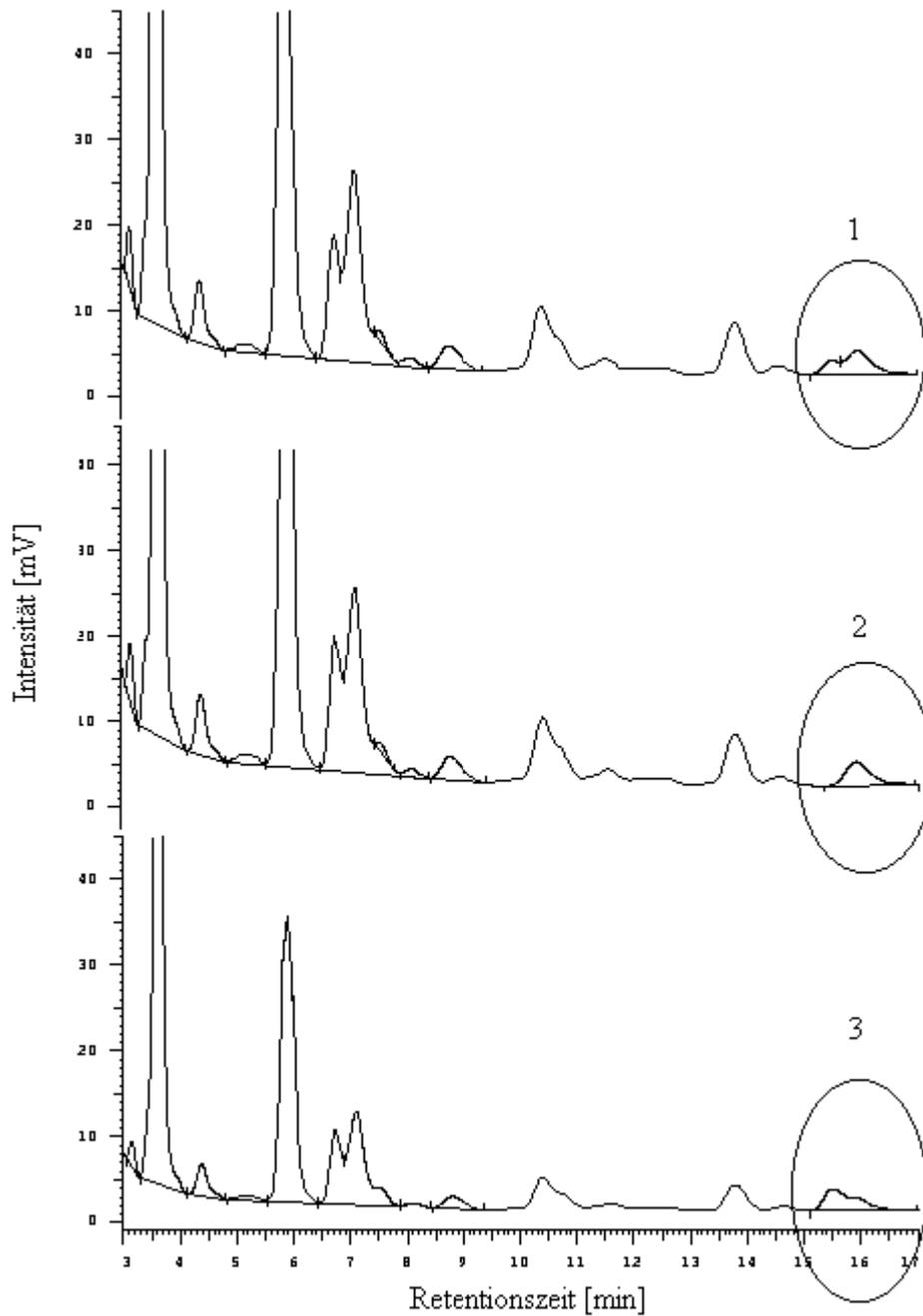


Abb. 2.5: Bestimmung von Adenosin mittels RP-HPLC. Die Chromatogramme zeigen die Auftrennung einer Probe aus Hepatopancreasgewebe nach 12 h biotopbedingter Hypoxie. Einkreist ist der Zeitpunkt, zu dem Adenosin eluiert. 1. Gewebeprobe unbehandelt 2. Gewebeprobe nach Behandlung mit 4  $\mu\text{L}$  einer 1:200 verdünnten ADA-Lösung, durch die Adenosin abgebaut wurde 3. Gewebeprobe mit 5  $\mu\text{M}$  Adenosin-Standard im Verhältnis 1:1 versetzt.

## 2.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten hinsichtlich statistischer Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms Sigma Stat der Firma Sigma (Jandel Scientific, Erkrath). Alle Werte wurden auf Normalverteilung und Varianzgleichheit geprüft.

Die Ergebnisse der Dopplermessungen wurden mit Hilfe des One Way Repeated Measures ANOVA bzw. dem Friedman Repeated Measures ANOVA on Ranks getestet. Als Kontrollwerte dienten die ersten zehn Meßwerte ( $t_1 - t_{10}$ ), die jeweils gegen alle anderen Meßwerte der Versuchsreihe getestet wurden. Signifikante Änderungen wurden mit Hilfe der parametrischen bzw. der unparametrischen Variante der SNK-Methode oder, bei ungleicher Stichprobengröße, mit der Dunn's Methode ermittelt.

Die Ergebnisse der Hämolyphmessungen wurden je nach Versuchsanordnung wahlweise einem unpaarigen t-Test oder einem One Way Repeated Measures ANOVA unterzogen. Lagen Normalverteilung und Varianzgleichheit vor, wurde bei statistischer Signifikanz gegen einen Kontrollwert ( $t_0$ ) nach der Dunnett's Methode bzw. paarweise nach der parametrischen Variante der SNK-Methode getestet. Bei fehlender Normalverteilung und/oder Varianzgleichheit wurden Rangvarianzanalysen, wie der Mann-Whitney Rank Sum Test oder der Friedman Repeated Measures ANOVA on Ranks, durchgeführt.

Die Ergebnisse der Gewebemessungen wurden einerseits mittels unpaarigem t-Test (Normoxie), andererseits mittels One Way ANOVA (Hypoxie) untersucht. Lag statistische Signifikanz vor, wurde bei Normalverteilung und Varianzgleichheit wie bei den Hämolyphproben getestet, jedoch dienten hier der Mann-Whitney Rank Sum Test und der Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks als Rangvarianzanalysen. Im letztgenannten Test wurde bei statistischer Signifikanz die Dunn's Methode im Vergleich gegen einen Kontrollwert bzw. bei paarweisem Vergleich durchgeführt, da nur ungleiche Stichprobengrößen vorlagen.

Zwei Mittelwerte wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant voneinander angesehen. Mittelwerte, die voneinander statistisch signifikant verschieden sind, werden in den Dopplerexperimenten mit einem \* (signifikante Erhöhung) bzw. mit einem ‡ (signifikante Erniedrigung) gekennzeichnet. Die Zeichen \*—\* bzw. ‡—‡ stehen für einen größeren Signifikanzbereich. In den Hämolyph- und Gewebeversuchen wird statistische Signifikanz der Mittelwerte mit einem \* (zum Kontrollwert  $t_0$ ) oder mit einem # (zum Vorwert) markiert.

### 3. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern Purinderivate die Sauerstoffversorgung von *Astacus leptodactylus* beeinflussen könnten. Von besonderem Interesse waren vor allem die Purinderivate Adenosin und Urat, von denen aus bisheriger Literatur Effekte auf Ebene des Herzkreislaufs bzw. auf Ebene der respiratorischen Pigmente in Crustaceen bekannt sind. Es sollte geklärt werden, ob diese Purinderivate während normoxischer und hypoxischer Bedingungen die Herzkreislaufparameter so verändern, daß die Sauerstoffversorgung des Tieres gewährleistet wird. Zudem sollten ebenfalls in Abhängigkeit von der Sauerstoffverfügbarkeit die Konzentrationen dieser Substanzen in Hämolymphe und Gewebe von *Astacus leptodactylus* untersucht werden, um Aufschluß über die Wirkungsebene der einzelnen Purinderivate zu bekommen.

#### 3.1 Die Wiederfindung der Purinderivate in Hämolymphe und Gewebe

Zur Konzentrationsbestimmung der Purinderivate aus der Hämolymphe und den Geweben<sup>1</sup> von *Astacus leptodactylus* mußte im Vorfeld untersucht werden, ob durch die Proben-gewinnung und deren Aufbereitung Verluste bei der Quantifizierung auftreten. Sowohl für die Hämolymphe als auch für das Gewebe, stellvertretend für alle am Schwanzmuskel untersucht, wurden Proben mit standardversetzter PCA gewonnen und bis zur Analyse nach entsprechenden Extraktionsmethoden aufbereitet. Durch die Modifikation der ursprünglichen Methoden konnten die Purinderivate Adenosin, Inosin und Urat in der Hämolymphe zwischen 96 und 103 % wiedergefunden werden, wie Tab. 3.1 zu entnehmen ist. Im Gewebe lag die prozentuale Wiederfindung für Adenosin und Inosin ebenfalls über 100 %, wohingegen Urat nur mit  $85 \pm 12$  % gefunden wurde.

Tab. 3.1: Prozentuale Wiederfindung der Purinderivate Adenosin, Inosin und Urat in Hämolymphe und Gewebe ( $X \pm SD$ ; n = die Ziffern in den Klammern geben die Anzahl der Tiere an)

	Wiederfindung [%]		
	Adenosin	Inosin	Urat
Hämolymphe	$103 \pm 2$ (8)	$97 \pm 3$ (4)	$96 \pm 9$ (5)
Gewebe	$105 \pm 3$ (7)	$103 \pm 14$ (7)	$85 \pm 12$ (7)

<sup>1</sup> Die Konzentrationsangaben für die Metabolite im Gewebe sind auf das gesamte Gewebewasser bezogen. Dabei wird von einem Gewebewasseranteil ausgegangen, der 80 % des gesamten Gewebes beträgt. Eine Metabolitkonzentration von  $100 \text{ nmol mL}^{-1}$  im Gewebewasser entspricht somit einem Gehalt von  $80 \text{ nmol g}^{-1}$  FG im Gewebe.

### **3.2 Die Effekte von Purinderivaten auf Herzkreislaufparameter und deren Konzentration in Hämolymphe und Gewebe unter normoxischen Inkubationsbedingungen**

#### **3.2.1 Messung der arteriellen Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe sowie der Herzfrequenz mit Hilfe der Pulsed-Doppler-Flowmetrie**

##### **3.2.1.1 Einfluß des Infusionsvolumens**

Zu Beginn der Purinderivatinfusionen in das Herzkreislaufsystem von *Astacus leptodactylus* mußte überprüft werden, welches Flüssigkeitsvolumen infundiert werden kann, ohne mögliche baroreflektorische Effekte hervorzurufen. Solche Reaktionen beschrieben Burggren et al. (1990) für *Cardisoma guanhumi*, die durch bolusartige und zu große Infusionsvolumina ausgelöst worden waren. Daher wurde hier die Auswirkung dreier unterschiedlicher Infusionsgeschwindigkeiten und die damit verbundenen Infusionsvolumina getestet, in denen Ringer-Lösung, die in allen anderen Versuchen als Basis für die Purinderivatlösungen diente, über 10 Minuten infundiert wurde (Abb. 3.1). Sowohl ein Infusionsvolumen von  $0,015 \text{ mL min}^{-1}$  (a), als auch ein Volumen von  $0,046 \text{ mL min}^{-1}$  (b) Ringer-Lösung, das  $150 \text{ }\mu\text{L}$  bzw.  $460 \text{ }\mu\text{L}$  über den gesamten Infusionszeitraum entspricht, führte weder in der A. posterior (I), noch in der A. descendens (II) zu einer statistisch signifikanten Änderung der Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe im Vergleich zu den Vorlaufwerten  $t_1$ - $t_{10}$ . Im Gegensatz dazu sank die Fließgeschwindigkeit in beiden Gefäßen signifikant, wenn das Infusionsvolumen  $0,088 \text{ mL min}^{-1}$  betrug ( $880 \text{ }\mu\text{L}$  in 10 min). Während in der A. descendens schon beim Infundieren ( $t_{14} 14,8 \pm 15,9$  und  $t_{16} 16,0 \pm 18,2 \text{ mm s}^{-1}$ ) signifikante Werte zum Vorlauf ( $t_1$ - $t_{10}$ , MW  $18,1 \pm 19,1 \text{ mm s}^{-1}$ ) auftraten und bis zum Ende der Erholungsphase bestehen blieben, verringerte sich in der A. posterior die Fließgeschwindigkeit erst in der Erholungsphase signifikant (ab  $t_{24}$  mit  $6,8 \pm 6,3 \text{ mm s}^{-1}$ ; MW<sub>Vorlauf</sub>:  $9,8 \pm 7,0 \text{ mm s}^{-1}$ ). Die Herzfrequenz blieb bei allen infundierten Volumina innerhalb der natürlichen Schwankungsbreite. Auffällig ist jedoch, daß unabhängig vom Infusionsvolumen in jeder Versuchsreihe mit Beginn der Infusion die Herzfrequenz zum Zeitpunkt  $t_{11}$ , wenn auch nicht signifikant, abnahm. Durch die Ergebnisse dieser Versuchsreihe wurde die Infusionsgeschwindigkeit der Lösungen so festgelegt, daß bei jedem Versuchstier  $0,046 \text{ mL min}^{-1}$  infundiert wurden. Damit das Infusionsvolumen konstant blieb, mußten die Konzentrationen der Purinderivatlösungen für jedes Tier über entsprechende Stammlösungen eingestellt werden.

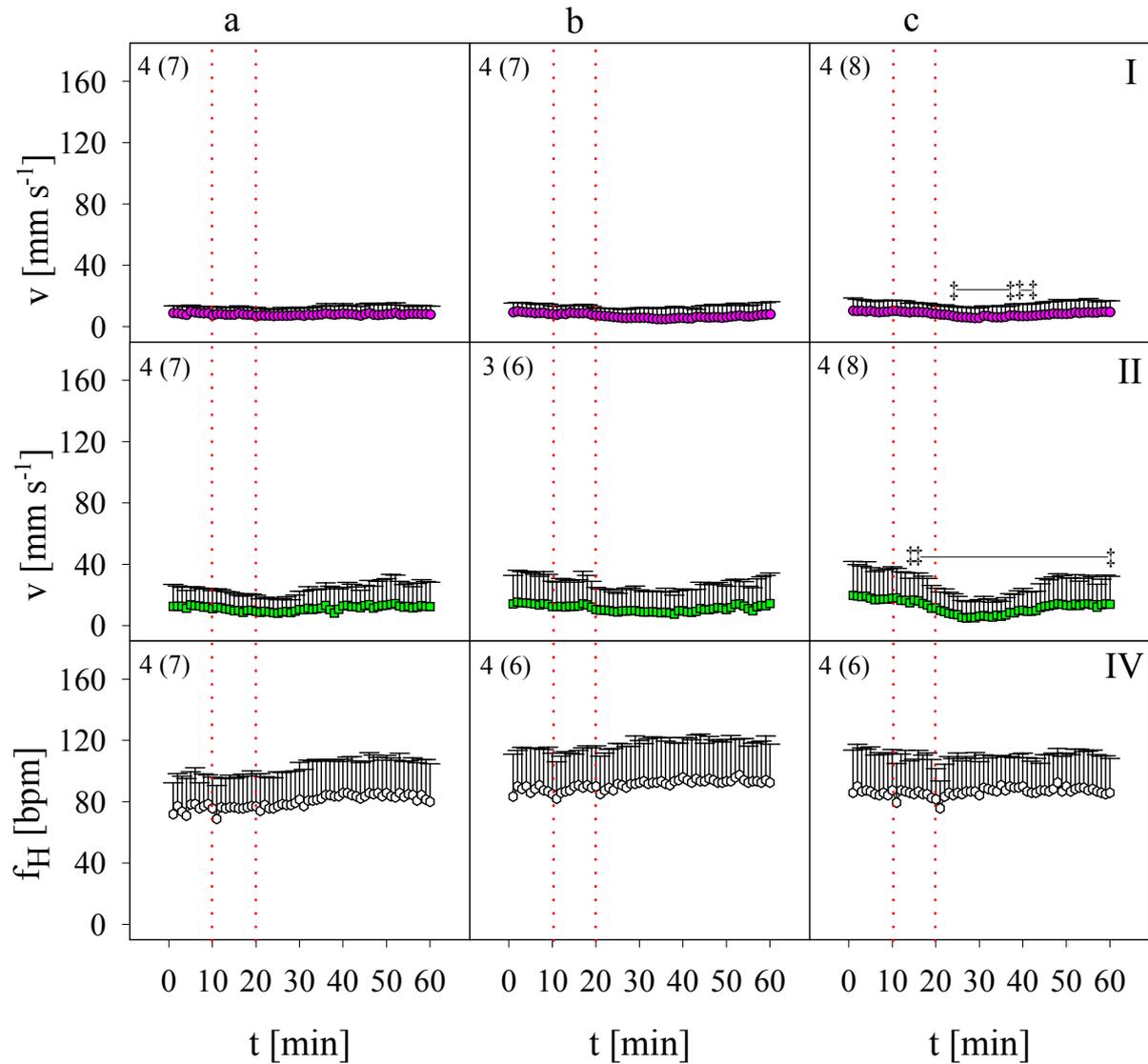


Abb. 3.1: Der Einfluß des Infusionsvolumens auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in der A. posterior (I) und der A. descendens (II) sowie auf die Herzfrequenz (IV) [bpm] bei *Astacus leptodactylus*. Nach einem zehnmütigen Vorlauf ( $t_1-t_{10}$ ) wurde jeweils für weitere 10 Minuten Ringer-Lösung mit einem Volumen von a:  $0,015 \text{ mL min}^{-1}$ , b:  $0,046 \text{ mL min}^{-1}$ , c:  $0,088 \text{ mL min}^{-1}$  infundiert. ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der linken oberen Ecke jeder Graphik: Anzahl der Tiere (n) ohne Klammern; Anzahl der Versuche (N) in Klammern). ‡ = signifikant erniedrigt zu allen zehn Werten des Vorlaufs.

### 3.2.1.2 Purinderivatkonzentration der Infusionen

Weiterhin mußte nach einer geeigneten Purinderivatkonzentration für die Infusionen gesucht werden, die bei  $0,046 \text{ mL min}^{-1}$  Infusionsvolumen maximale Effekte auf das Herzkreislaufsystem von *Astacus leptodactylus* zeigt. Dafür wurden am Beispiel des Adenosins fünf verschiedene Konzentrationen dieses Purinderivats im Bereich von  $0,44$  und  $7,0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$  für 10 Minuten infundiert. Abb. 3.2 zeigt zur besseren Übersicht nur die Ergebnisse für die A. descendens und die Herzfrequenz, wohingegen der gesamte Versuch dem Anhang (Abb. 7.1, S. 116) zu entnehmen ist. Mit zunehmender Konzentration des infundier-

ten Adenosins erhöhte sich der geschwindigkeitssteigernde Effekt in allen Gefäßen. Die Infusion niedriger Adenosinkonzentrationen (0,44 (a), 0,88 (b) und 1,75 (c)  $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$ ) veränderte die Fließgeschwindigkeit in der A. posterior (I) und der A. lateralis (III) nur minimal, wohingegen in der A. descendens (II) insgesamt stärkere Erhöhungen zu beobachten waren.

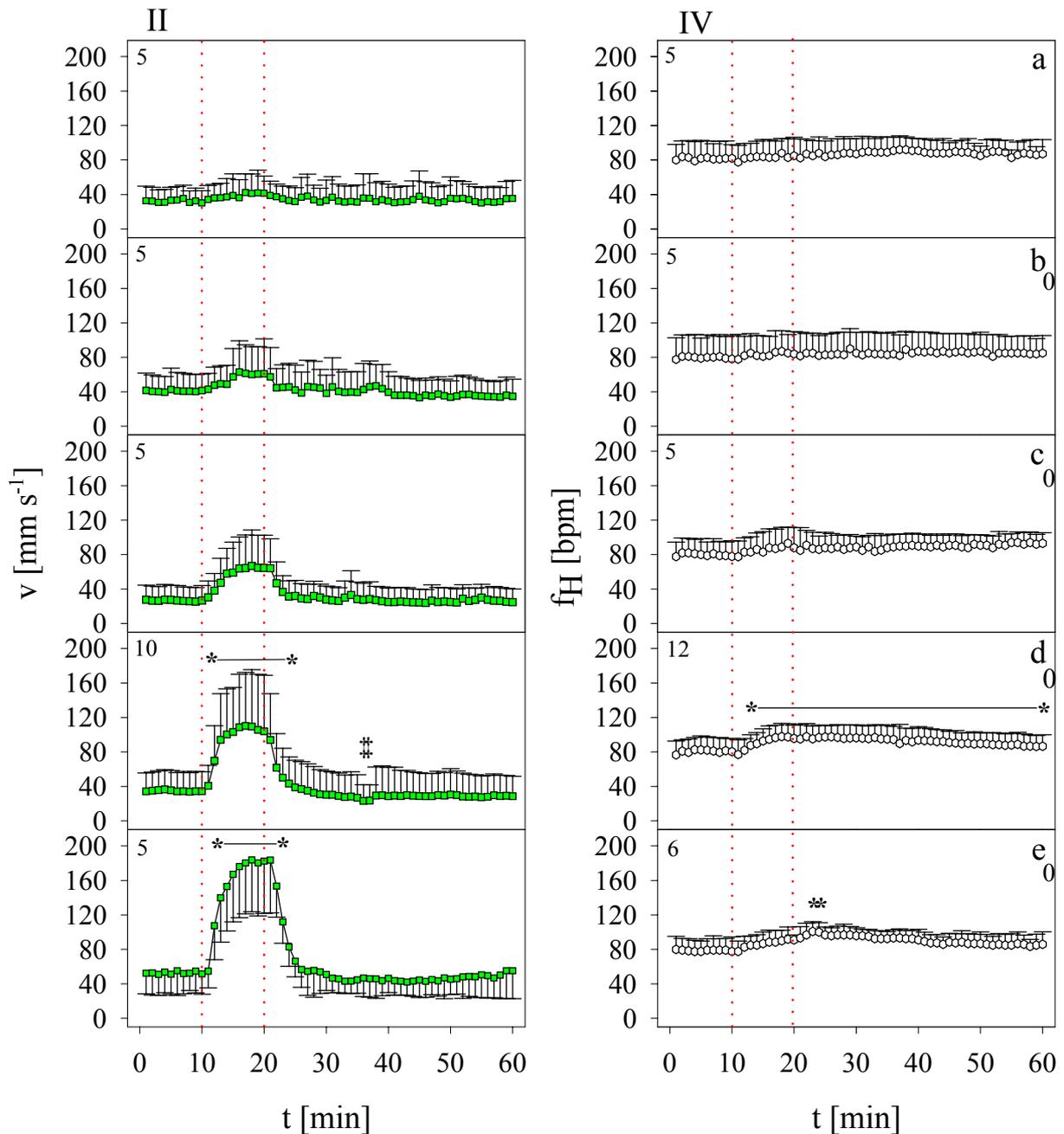


Abb. 3.2: Der Einfluß unterschiedlich konzentrierter Adenosinlösung auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in der A. descendens (II) und auf die Herzfrequenz (IV) [bpm] bei *Astacus leptodactylus*. Nach einem zehnmütigen Vorlauf ( $t_1-t_{10}$ ) wurde Adenosin in den Konzentrationen a: 0,44; b: 0,88; c: 1,75; d: 3,5 und e: 7,0  $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$  über einen Zeitraum von 10 Minuten infundiert. ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der linken oberen Ecke jeder Graphik geben die Anzahl der Tiere ( $n$ ) an). \* = signifikant erhöht zu allen zehn Werten des Vorlaufs; † = signifikant erniedrigt zu allen zehn Werten des Vorlaufs.

Erst bei  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosin (d) war der Effekt durch das infundierte Purinderivat so hoch, daß die Fließgeschwindigkeit ab  $t_{12}$  signifikant gegenüber den zehn Vorlaufwerten erhöht wurde. Die maximalen Geschwindigkeiten waren hierbei um die Faktoren 2,8 (I), 3,2 (II), 2,6 (III) gegenüber den Mittelwerten der jeweiligen Vorläufe ( $12,6 \pm 8,3 \text{ mm s}^{-1}$ ,  $34,7 \pm 21 \text{ mm s}^{-1}$ ,  $10,1 \pm 8,4 \text{ mm s}^{-1}$ ; gleiche Reihenfolge) gestiegen. Dagegen brachte eine Verdopplung der Adenosinkonzentration auf  $7,0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG (e) keine gesteigerten Effekte. Lediglich in der A. descendens ließ sich die Fließgeschwindigkeit nochmals geringfügig und signifikant (Faktor 3,5) gegenüber dem Vorlauf erhöhen. Bei der Herzfrequenz (IV) zeigten sich äquivalente Wirkungen. Hier nahm die Frequenz erst ab einer Konzentration von  $1,75 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG geringfügig zu, die jedoch nur bei Infusion von  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosin von  $t_{11}$  bis  $t_{60}$  signifikant verschieden zu den Vorlaufwerten war. Ebenfalls führte eine Verdopplung der Adenosinkonzentration nicht zu einer weiteren Erhöhung des Herzschlages, betrug der Faktor in beiden Fällen 1,2 ( $3,5$  und  $7,0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG).

Da mit  $7,0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosin keine stärkeren Effekte bei den gemessenen Herzkreislaufparametern erzielt werden konnten als mit der halbkonzentrierten Lösung, wurden die Infusionen der Purinderivatlösungen mit einer Konzentration von  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG durchgeführt.

### 3.2.1.3 Dauer der Infusionen

Die Versuche zum Infusionsvolumen (3.2.1.1) zeigen deutlich, daß die Geschwindigkeit der Infusion die Herzkreislaufparameter beeinflusste. Die letztendlich für alle weiteren Versuche gewählte Infusionsgeschwindigkeit, die einem Infusionsvolumen von  $0,046 \text{ mL min}^{-1}$  entspricht, wurde bisher in Anlehnung an Stegen und Grieshaber (2001) über einen Zeitraum von 10 Minuten durchgeführt. Nun sollte im Speziellen untersucht werden, ob längere Infusionszeiten stärkere Effekte auf den Herzkreislauf hervorrufen, diese über eine längere Infusionsphase bestehen bleiben und wiederholt in gleicher Stärke auftreten. Hierzu wurden in fünf aufeinanderfolgenden Versuchsreihen nach einem zehnminütigen Vorlauf  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosin über 5 (a), 10 (b), 15 (c), 20 (d) und 25 (e) Minuten infundiert. Abb. 3.3 zeigt wieder repräsentativ für alle Gefäße (Abb. 7.2, S. 117) die Ergebnisse für die A. descendens und die Herzfrequenz. Unabhängig von der Dauer der Adenosininfusion wird die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe in allen Gefäßen sowie die Herzfrequenz erhöht. Signifikante Änderungen zum Vorlauf traten in der A. posterior (I) bei jeder Infusion auf, in der A. descendens (II) und bei der Herzfrequenz (IV) erst ab einer Infusionszeit von 10 Minuten, in der A. lateralis (III) dagegen gar nicht. Interessanterweise fanden sich maximale

Fließgeschwindigkeiten in allen Versuchen innerhalb der dritten bis zehnten Minute einer jeden Infusion (Tab. 3.2), unabhängig davon, daß die Infusionszeit z.T. über die doppelte Zeit hinausging.

Tab. 3.2: Übersicht a) der Werte  $t_{\max}$  [min]: Zeiten, zu denen die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe und die Herzschlagfrequenz nach Beginn der jeweiligen Adenosininfusion maximal erhöht war; b) der Werte  $F_{\text{Erhöhung}}$ : Faktoren, um die sich die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe und die Herzschlagfrequenz gegenüber dem jeweiligen mittleren Vorlaufwert maximal durch die Adenosininfusion erhöht hat. Dargestellt ist jeder Wert für die Infusionszeiten fünf (a), 10 (b), 15 (c), 20 (d), 25 (e) Minuten in den Gefäßen A. posterior, A. descendens und A. lateralis sowie für das Herz.

	A. posterior		A. descendens		A. lateralis		Herz	
	$t_{\max}$ [min]	$F_{\text{Erhöhung}}$						
<b>a</b>	7	1,1	6	2,1	6	1,6	8	1,2
<b>b</b>	6	1,5	5	3,2	6	2,2	13	1,2
<b>c</b>	4	1,98	7	4,1	3	2,4	14	1,3
<b>d</b>	10	2,2	6	4,9	6	1,9	23	1,3
<b>e</b>	8	2,0	10	4,0	3	1,6	24	1,3

Das Maximum der Herzfrequenz verschob sich mit zunehmender Infusionszeit zu späteren Zeitpunkten (bis  $t_{24}$ ). Betrachtet man in Tab. 3.2 die Faktoren, um die sich die gemessenen Parameter maximal gegenüber der mittleren Vorlaufwerte erhöht haben, fällt auf, daß die maximale Änderung der Herzfrequenz ( $F_{\text{Erhöhung}}$  1,2 - 1,3) unabhängig von der Infusionsdauer war. Dagegen stieg die Fließgeschwindigkeit in der A. descendens mit länger andauernder Infusion um den Faktor 2,0 (a) bis 4,9 (d), auch wenn sich die maximalen Geschwindigkeiten in diesem Gefäß von  $167 \pm 49$  (a) auf  $151 \pm 40$   $\text{mm s}^{-1}$  (d) reduzierten. Nahm die Fließgeschwindigkeit in der A. posterior und in der A. lateralis anfänglich ebenfalls mit der Infusionslänge zu, zeigte sich in jedem Gefäß eine geringere Erhöhung nach 25 Minuten Infusion im Vergleich zu 20 Minuten Infusion.

Da die maximalen Effekte auf die Herzkreislaufparameter innerhalb der ersten 10 Infusionsminuten auftraten, wurde die Infusionszeit für die nachfolgenden Versuche auf 10 Minuten festgelegt, unabhängig davon, daß die Fließgeschwindigkeit in den Arterien mit zunehmender Infusionsdauer tendenziell gestiegen waren.

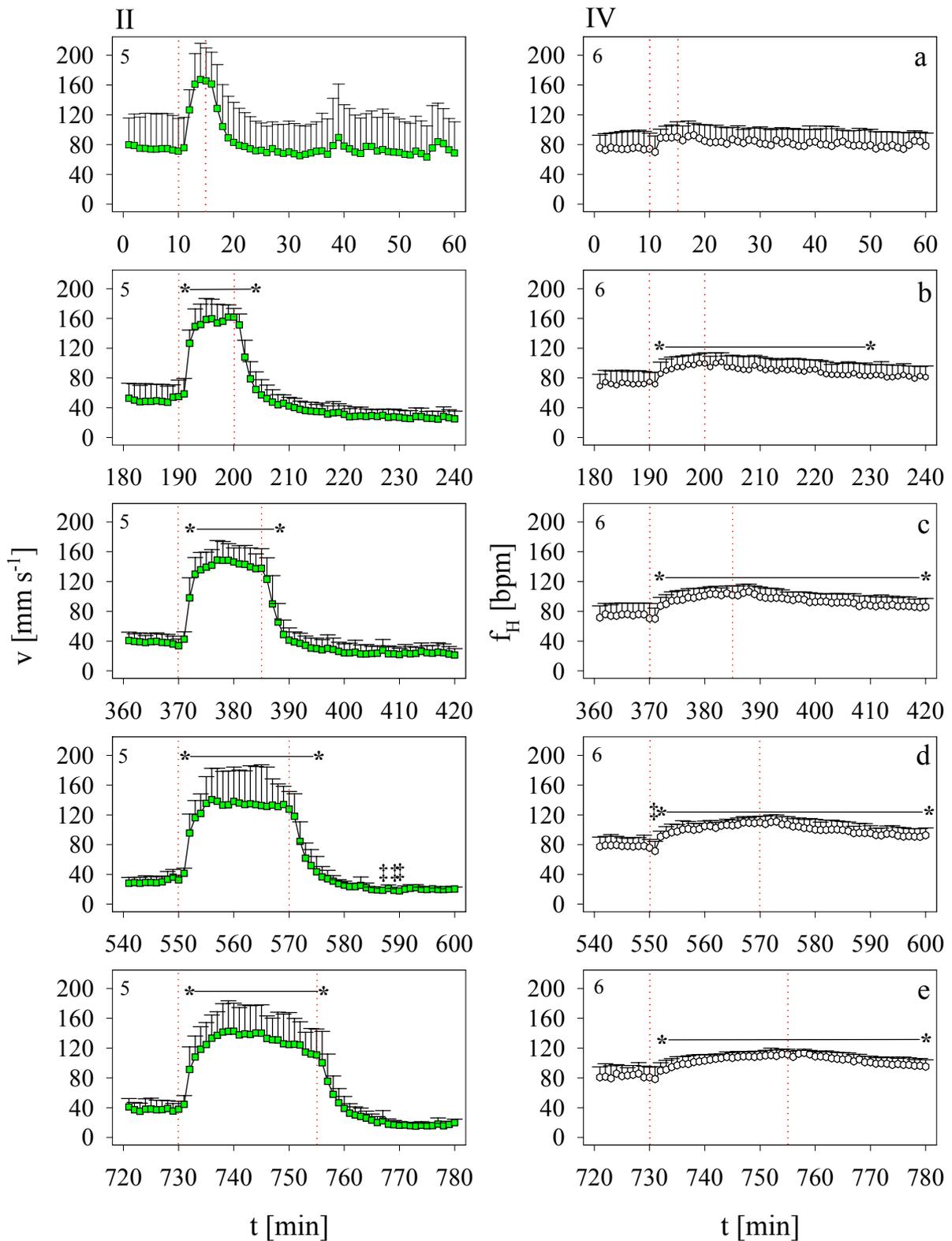


Abb. 3.3: Der Einfluß von  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosinlösung auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in der A. descendens (II) und auf die Herzfrequenz (IV) [bpm] bei *Astacus leptodactylus* nach unterschiedlich langer Infusion. In dieser, aus fünf Einzelversuchen bestehenden Versuchsreihe (a - e), wurde nach einem jeweils zehnminütigen Vorlauf Adenosin über a: 5, b: 10, c: 15, d: 20 und e: 25 Minuten infundiert. Die Erholungszeit vom Ende einer Infusion bis zum Beginn der nächsten Infusion betrug zwischen 175 Minuten (a) und 155 Minuten (e). ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der linken oberen Ecke jeder Graphik geben die Anzahl der Tiere (n) an). \* = signifikant erhöht zu allen zehn Werten des Vorlaufs; ‡ = signifikant erniedrigt zu allen zehn Werten des Vorlaufs.

### 3.2.1.4 Kumulation der Infusionen

Die Einflüsse der Infusionsdauer (3.2.1.3) wurden in einer Versuchsserie untersucht, die aus fünf einzelnen Versuchen bestand, zwischen denen eine längere Erholungszeit für die wiederverwendeten Tiere lag. Zwischen dem Ende der vorherigen und dem Beginn der neuen Infusion lagen je nach Infusionsdauer zwischen 175 (a) und 155 (e) Minuten. Wie würde sich eine verkürzte Erholungsphase zwischen den Adenosininfusionen auf die Herzkreislaufparameter auswirken? Um eine Kumulation von Adenosininfusionen zu untersuchen, wurden wiederum fünf Versuchsserien hintereinander durchgeführt, wobei die Erholungsphasen zwischen den Infusionen nur 55 Minuten betragen. Zur übersichtlicheren Darstellung wurde auch in Abb. 3.4 nur die A. descendens und die Herzfrequenz dargestellt (Abb. 7.3, S.118). Die wiederholte Applikation von  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosin führte in allen Arterien zu einer Änderung der Fließgeschwindigkeit, die in der A. descendens (II) bei den Versuchen a bis d, bzw. in der A. posterior (I) bei Versuch e statistisch signifikant verschieden zu den jeweiligen zehn Vorlaufwerten war. Bei allen fünf Versuchen blieb die maximale Erhöhung der Fließgeschwindigkeit in der A. posterior gegenüber den Mittelwerten der Vorläufe sehr ähnlich ( $33,3 \pm 20,2$  bis  $40,9 \pm 16,7 \text{ mm s}^{-1}$ ), so auch bei der Herzfrequenz (IV) ( $88,7 \pm 17,0$  bis  $95,0 \pm 13,2$  bpm). Einen stärkeren Einfluß konnte auf die A. descendens und die A. lateralis (III) beobachtet werden: Hier wurden die maximalen Erhöhungen während der aufeinanderfolgenden Infusionsphasen a bis e nicht wieder erreicht, erhöhten sich die Fließgeschwindigkeiten in der A. descendens in Versuch a um 59,1 auf  $84,3 \pm 45,4 \text{ mm s}^{-1}$  (Faktor 3,3) und in Versuch e nur noch um 42,5 auf  $49,7 \pm 50,4 \text{ mm s}^{-1}$  (Faktor 6,8). Bei der A. lateralis stiegen die Werte in Versuch a um 13,8 auf  $15,0 \pm 7,1 \text{ mm s}^{-1}$  (Faktor 12) und in Versuch e nur noch um 5,3 auf  $5,6 \pm 3,4 \text{ mm s}^{-1}$  (Faktor 18,7) im Vergleich zu den jeweils mittleren Vorlaufwerten. Im Gegensatz zu den Versuchen von 3.2.1.3 scheint die verkürzte Erholungszeit die Aktivierung der Herzkreislaufparameter stärker zu beeinflussen, da mit Ausnahme der A. posterior und der Herzfrequenz die Differenzen zwischen Vorlaufmittelwert und maximaler Erhöhung durch die Infusion mit Häufigkeit der Versuche abnahmen, auch wenn die Faktoren der Erhöhung in allen Parametern angestiegen waren. Daher sollte in den nachfolgenden Versuchen auf eine ausreichend lange Erholungsphase zwischen verschiedenen Infusionen bei einem Tier geachtet werden.

Mögliche baroreflektorische Einflüsse aufgrund des erhöhten Gesamtinfusionsvolumens wurden durch eine Kontrollversuchsserie mit reiner Ringer-Lösung ausgeschlossen. In dieser Versuchsserie (Abb. 7.4, S. 119) traten keine statistisch signifikanten Änderungen auf.

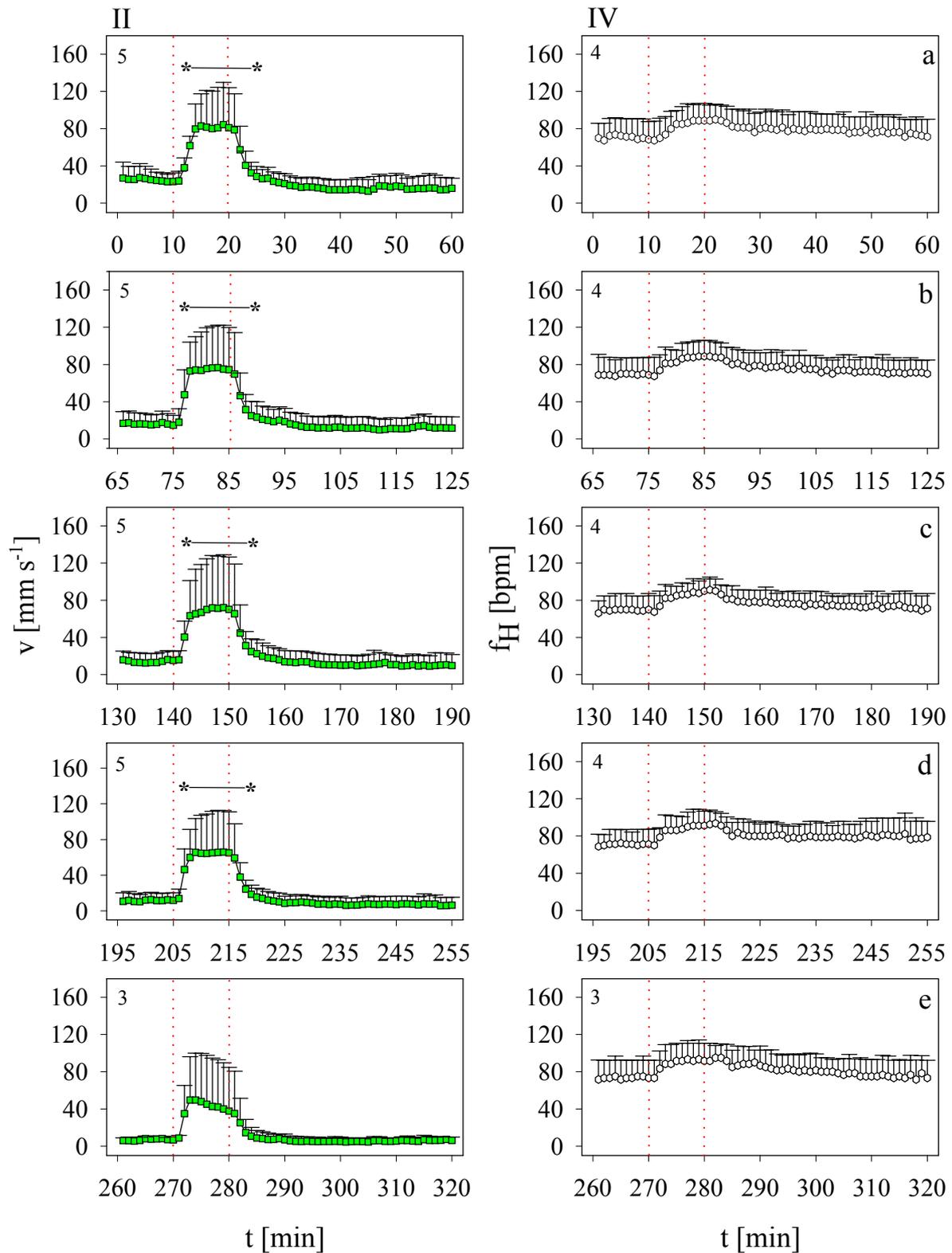


Abb. 3.4: Der Einfluß von 3,5 nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> FG Adenosinlösung auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [mm s<sup>-1</sup>] in der A. descendens (II) und auf die Herzfrequenz (IV) [bpm] bei *Astacus leptodactylus* nach vermehrter Infusion. In dieser, aus fünf Einzelversuchen bestehenden Versuchsreihe (a - e), wurde jeweils nach einem zehnmütigen Vorlauf für 10 Minuten Adenosin infundiert. Die Erholungszeit vom Ende einer Infusion bis zum Beginn der nächsten Infusion betrug immer 55 Minuten. ( $X \pm SD$ ; die Ziffern in der linken oberen Ecke jeder Graphik geben die Anzahl der Tiere ( $n$ )). \* = signifikant erhöht zu allen zehn Werten des Vorlaufs.

### 3.2.1.5 Infusion verschiedener Purinderivate des ATP-Katabolismus

Der Abbau des ATP bis zum primären Endprodukt Urat verläuft über mehrere Metabolitstufen. Neben den bekannten kreislaufaktivierenden Purinderivaten ATP, ADP, AMP und Adenosin (Stegen und Grieshaber 2001) sollten zudem IMP, Inosin, Hypoxanthin und Urat unter normoxischen Inkubationsbedingungen hinsichtlich ihrer Wirkungen auf das Herzkreislaufsystem bei *Astacus leptodactylus* untersucht werden. Aufgrund der vorherigen Experimente wurden in den nachfolgenden Versuchen (A bis H in den Abb. 3.5 bis Abb. 3.8) die einzelnen Purinderivate des ATP-Katabolismus nach einem Vorlauf ( $t_1$ - $t_{10}$ ) für jeweils 10 Minuten in das Kreislaufsystem von *Astacus leptodactylus* infundiert. Die Konzentration der infundierten Substanzen betrug 3,5 bzw. 0,5 nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> FG im Falle des Urats und des Hypoxanthins, aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit in Ringer-Lösung. Ein separates Kontrollexperiment mit reiner Ringer-Lösung (Anhang Abb. 7.5, S. 120) führte zu keinerlei signifikanten Änderungen der Fließgeschwindigkeit in den Gefäßen und der Herzfrequenz.

Abb. 3.5 zeigt die Änderung der Herzkreislaufparameter durch die Infusion von ATP (A) und ADP (B). Beide Substanzen bewirkten in allen Gefäßen (I - III) einen signifikanten Anstieg der Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe, als auch eine signifikante Erhöhung der Herzfrequenz (IV). So stieg die Fließgeschwindigkeit durch ATP innerhalb der Infusionszeit gegenüber dem jeweils mittleren Vorlaufwert auf  $64,4 \pm 13,7$  (I),  $202,4 \pm 38,3$  (II) und  $42,2 \pm 8,6$  mm s<sup>-1</sup> (III) an (Faktor 3,0 (I), 2,6 (II), 0,7 (III)). Ähnliche Werte konnten durch die Infusion von ADP erzielt werden: Hier erhöhte sich die Fließgeschwindigkeit auf  $71,1 \pm 16,8$  (I),  $215,5 \pm 55,4$  (II) und  $41,9 \pm 10,2$  mm s<sup>-1</sup> (III) um die Faktoren 3,4 (I), 2,4 (II) und 2,1 (III). Auffällig war in beiden Versuchen der rapide Anstieg der Fließgeschwindigkeit in der A. descendens zu Beginn der Infusion, dem ein relativ schneller und kontinuierlicher Abfall schon während der Infusion nach Erreichen der Maximalgeschwindigkeit (ATP  $t_{14}$ , ADP  $t_{15}$ ) folgte. Sowohl in der A. posterior als auch in der A. lateralis bewirkten die Metabolitinfusionen eine langsamere Erhöhung der Fließgeschwindigkeit und einen verzögerten Abfall dieser gegen Ende der Infusion bis zum Zeitpunkt  $t_{60}$ , wobei die Geschwindigkeit in der A. posterior nach der ADP-Infusion erst ca. 20 Minuten nach Infusionsende zu sinken begann. Insgesamt betrachtet wurde die Ausgangsgeschwindigkeit zum Ende der Versuche nur in der A. lateralis nach ATP-Infusion wieder erreicht. Im Gegensatz zur Fließgeschwindigkeit in der A. lateralis sank auch die Herzfrequenz nicht wieder auf das Ausgangsniveau zurück, erreichte maximale Schläge erst in der Erholungsphase zu den Zeitpunkten  $t_{49}$  (ATP) und  $t_{43}$  (ADP), die um 34,3 bpm auf  $104,5 \pm 5,6$  bpm (ATP) bzw. um 33,1 bpm auf  $100 \pm 12,6$  bpm (ADP) angestiegen waren.

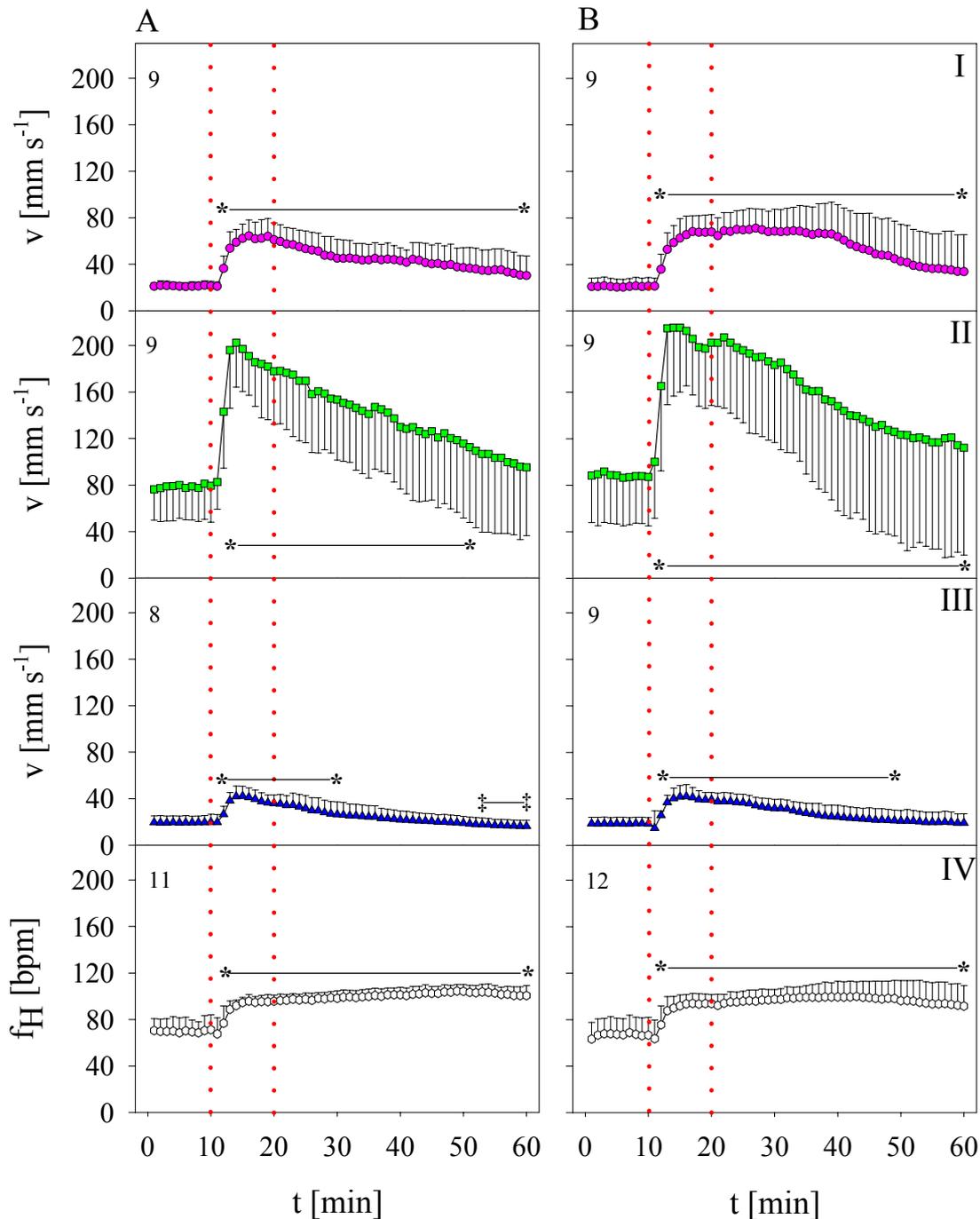


Abb. 3.5: Der Einfluß von ATP- und ADP-Lösung auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in der A. posterior (I), der A. descendens (II) und der A. lateralis (III) sowie auf die Herzfrequenz (IV) [bpm] bei *Astacus leptodactylus*. Nach einem zehnmütigen Vorlauf ( $t_1-t_{10}$ ) wurden  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG ATP-Lösung (A) bzw. ADP-Lösung (B) über einen Zeitraum von 10 Minuten infundiert. ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der linken oberen Ecke jeder Graphik geben die Anzahl der Tiere (n) an). \* = signifikant erhöht zu allen zehn Werten des Vorlaufs.

Die Infusionen von AMP (C) und Adenosin (D) sind in Abb. 3.6 dargestellt. Sowohl AMP als auch Adenosin erhöhten wie ATP und ADP (Abb. 3.5) die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe in der A. posterior (I), der A. descendens (II) und der A. lateralis (III), als auch die Herzfrequenz (IV) signifikant gegenüber allen zehn Werten des jeweiligen Vorlaufs.

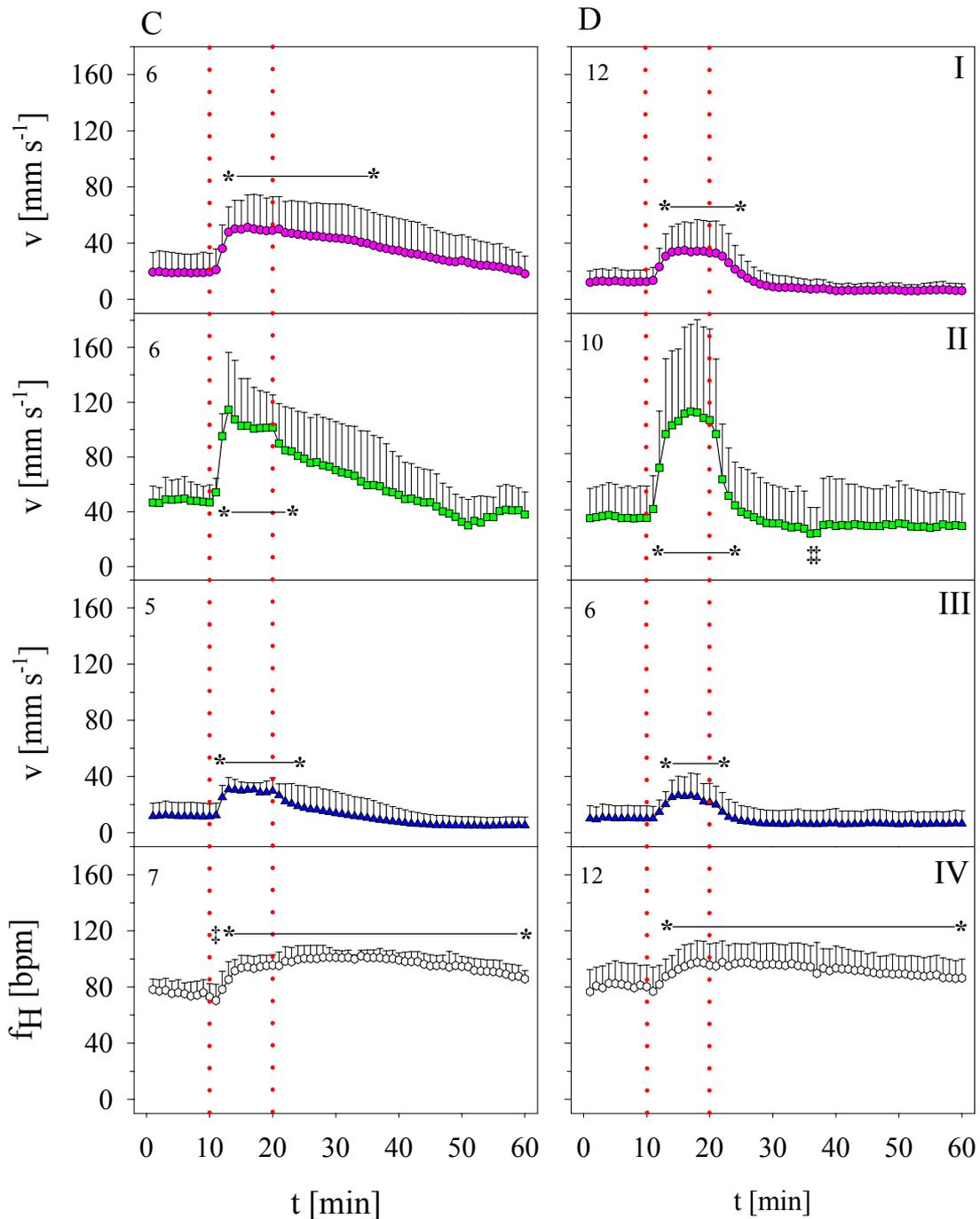


Abb. 3.6: Der Einfluß von AMP- und Adenosinlösung auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in der A. posterior (I), der A. descendens (II) und der A. lateralis (III) sowie auf die Herzfrequenz (IV) [bpm] bei *Astacus leptodactylus*. Nach einem zehnmütigen Vorlauf ( $t_1-t_{10}$ ) wurden  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG AMP-Lösung (C) bzw. Adenosinlösung (D) über einen Zeitraum von 10 Minuten infundiert. ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der linken oberen Ecke jeder Graphik geben die Anzahl der Tiere (n) an). \* = signifikant erhöht zu allen zehn Werten des Vorlaufs; ‡ = signifikant erniedrigt zu allen zehn Werten des Vorlaufs.

Ähnlich den Änderungen der Herzkreislaufparameter nach ATP- und ADP-Infusion, bewirkte AMP ebenso kurz nach Infusionsbeginn eine maximale Erhöhung der Hämolympffließgeschwindigkeit in allen Arterien (um  $32,1$  (I),  $55,0$  (II) und  $19,1$  (III)  $\text{mm s}^{-1}$  auf  $51,1 \pm 23,3$

(I),  $102,9 \pm 34,4$  (II) und  $30,8 \pm 8,6$  (III)  $\text{mm s}^{-1}$ ), die auch während der Infusion kontinuierlich zu sinken begann. Gegen Ende des Versuches ( $t_{60}$ ) wurden die Fließgeschwindigkeiten des Vorlaufs erreicht, was allerdings nicht für die Herzschläge galt, die immer noch oberhalb der Ruhfrequenzen lagen. Im Gegensatz zu ATP und ADP wurde die Maximalfrequenz von  $102,1 \pm 3,9$  bpm (Erhöhung um 26,4 bpm) durch AMP-Einfluß knapp 10 Minuten früher ( $t_{34}$ ) erreicht, weshalb die Herzfrequenz bis zum Ende der Erholungsphase ( $t_{60}$ ) stärker abfiel. Vergleicht man nun die Einflüsse des Adenosins mit denen der drei anderen Infusionen, fallen stark verkürzte Effekte auf (Abb. 3.6 D). Insgesamt wurden durch Adenosin überwiegend niedrigere maximale Geschwindigkeiten erreicht ( $34,9 \pm 20,3$  (I),  $110,1 \pm 62,0$  (II),  $26,5 \pm 13,6$  (III)  $\text{mm s}^{-1}$ ) und zudem die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe meist geringfügiger erhöht ( $22,3$  (I),  $75,4$  (II),  $16,4$  (III)  $\text{mm s}^{-1}$ ). Nach Infusionsende fiel die Geschwindigkeit in allen drei Gefäßen innerhalb der ersten 10 Minuten der Erholungsphase ( $t_{21}$ - $t_{30}$ ) unter den jeweils mittleren Vorlaufwert zurück, dagegen blieb die Herzfrequenz bis  $t_{60}$  signifikant erhöht. Nach der Adenosininfusion wurde die maximale Herzfrequenz, die um 17,1 auf  $97,7 \pm 15,3$  bpm gestiegen war, noch früher ( $t_{18}$ ) als bei der AMP-Infusion erreicht.

Da die Adenylate und das Adenosin den Herzkreislauf bei *Astacus leptodactylus* aktivieren, stellte sich die Frage, ob weitere Purinderivate des ATP-Katabolismus, wie z.B. IMP und Inosin, ebenfalls wirksam sind. Der Weg vom AMP über das IMP zum Inosin stellt eine zweite Möglichkeit zum äquivalenten Weg über Adenosin dar. Wäre der Weg über IMP eine mögliche Alternative zu Adenosin für den Fall, daß es auch cardioaktiv wirkt? Und wie könnte dann Inosin wirken, das sowohl aus IMP als auch aus Adenosin gebildet werden kann? Spielt die schnelle Desaminierung des Adenosins zu Inosin für die Wirkung beider Metabolite eine Rolle? Zur Klärung möglicher cardioaktiver Effekte wurden sowohl IMP als auch Inosin für 10 Minuten in das Kreislaufsystem von *Astacus leptodactylus* infundiert. Abb. 3.7 zeigt deutlich, daß weder IMP (E) noch Inosin (F) die Fließgeschwindigkeit in den drei gemessenen Gefäßen erhöhte. Auch die Herzfrequenz wurde nicht beeinflusst, wie es durch ATP, ADP, AMP und Adenosin der Fall gewesen war. Durch die Infusion von IMP wurde in allen drei Gefäßen die Fließgeschwindigkeit während der Erholungsphase gegenüber dem Vorlauf ( $t_1$ - $t_{10}$ ) erniedrigt, wenn auch nicht signifikant.

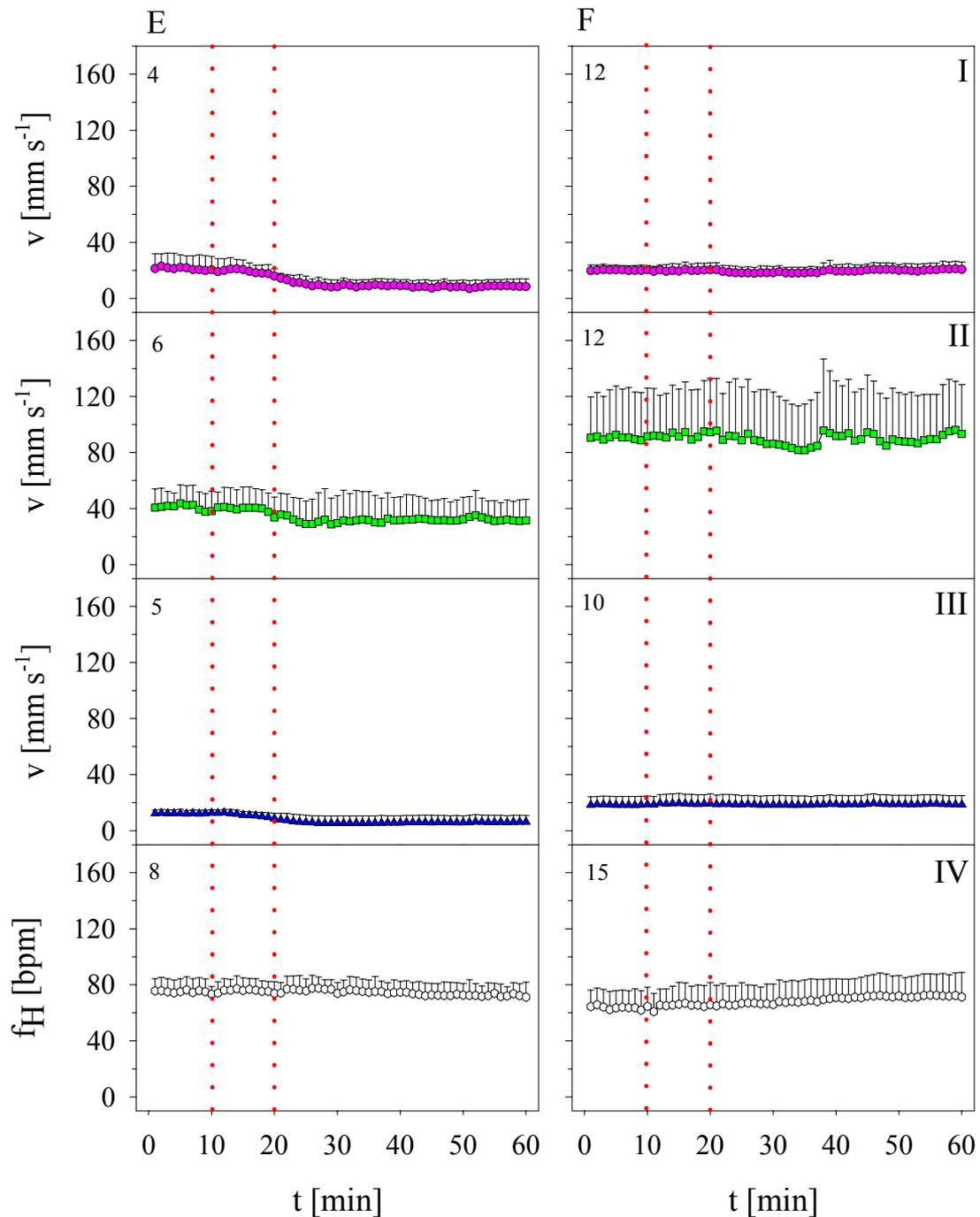


Abb. 3.7: Der Einfluß von IMP- und Inosinlösung auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in der A. posterior (I), der A. descendens (II) und der A. lateralis (III) sowie auf die Herzfrequenz (IV) [bpm] bei *Astacus leptodactylus*. Nach einem zehnminütigen Vorlauf ( $t_1$ - $t_{10}$ ) wurden  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG IMP-Lösung (E) bzw. Inosinlösung (F) über einen Zeitraum von 10 Minuten infundiert. ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der linken oberen Ecke jeder Graphik geben die Anzahl der Tiere (n) an).

Aufgrund der Ergebnisse der IMP- und Inosininfusionen scheint es eher unwahrscheinlich, daß weitere Purinderivate wie Hypoxanthin und Urat das Herz-Kreislaufsystem von *Astacus leptodactylus* aktivierend beeinflussen. Eine Bestätigung dieser Vermutung ist der Abb. 3.8 zu entnehmen.

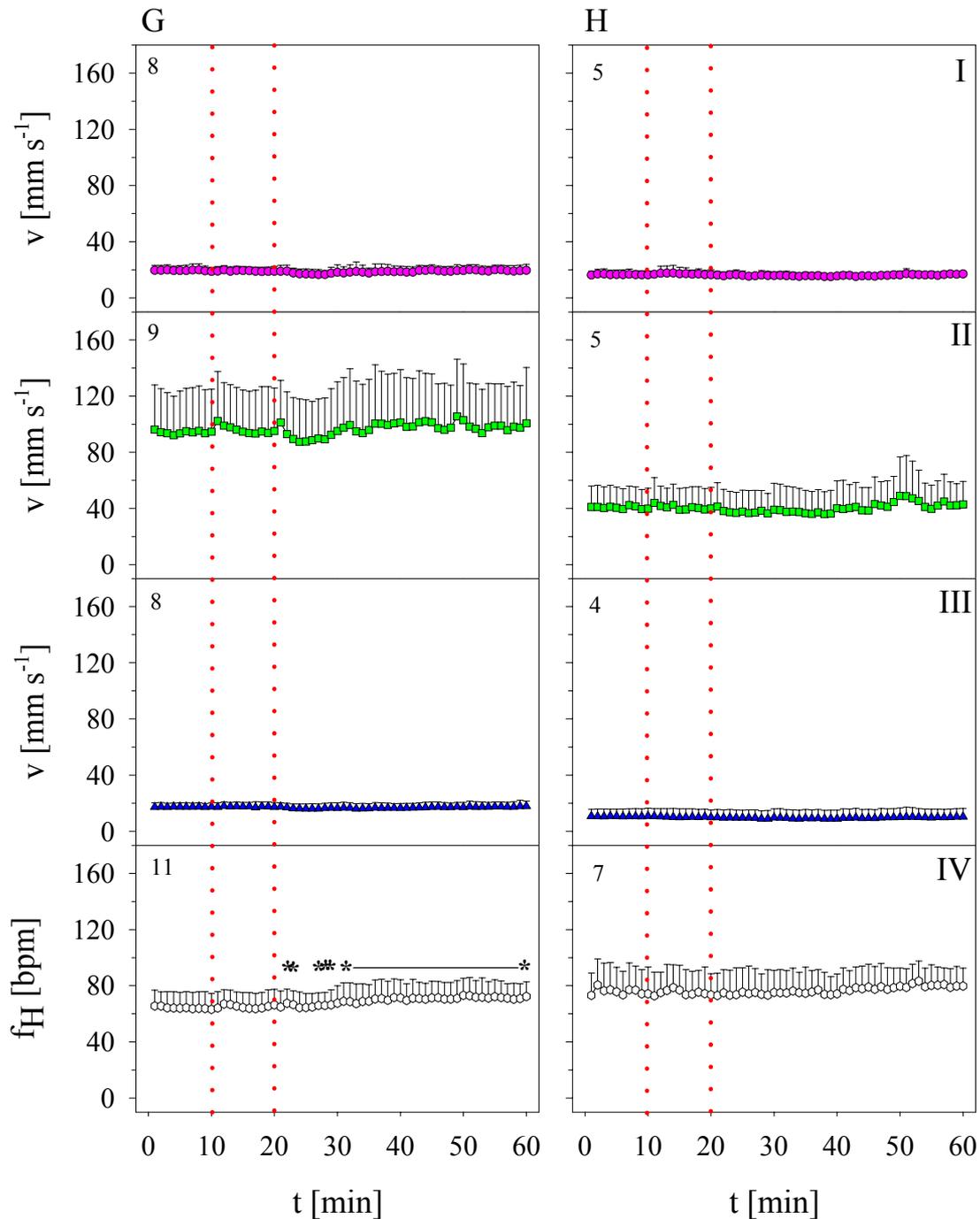


Abb. 3.8: Der Einfluß von Hypoxanthin- und Uratlösung auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in der A. posterior (I), der A. descendens (II) und der A. lateralis (III) sowie auf die Herzfrequenz (IV) [bpm] bei *Astacus leptodactylus*. Nach einem zehnmütigen Vorlauf ( $t_1-t_{10}$ ) wurden  $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Hypoxanthinlösung (G) bzw. Uratlösung (H) über einen Zeitraum von 10 Minuten infundiert. ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der linken oberen Ecke jeder Graphik geben die Anzahl der Tiere (n) an). \* = signifikant erhöht zu allen zehn Werten des Vorlaufs.

Hier wurde wie in allen vorherigen Versuchen Hypoxanthin (G) und Urat (H) für 10 Minuten infundiert. Die niedrigere Konzentration von  $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG wurde aufgrund geringerer Löslichkeit beider Purinderivate in Ringer-Lösung gewählt. Während Urat keinerlei Wirkung auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe und die Herzfrequenz zeigte, er-

höhte sich durch Hypoxanthin die Herzfrequenz in der Erholungsphase signifikant und erreichte zum Zeitpunkt  $t_{50}$  maximale Frequenzen, die um 8,9 auf  $73,2 \pm 12,1$  bpm gegenüber dem mittleren Vorlaufwert gestiegen waren. Die arterielle Fließgeschwindigkeit dagegen veränderte sich auch durch Hypoxanthin nicht.

### 3.2.2 Bestimmung der Konzentration von Adenosin, Inosin und Urat in der Hämolymphe

Mit Hilfe der Dopplerversuche konnte gezeigt werden, daß die infundierten, verschiedenen Purinderivate des ATP-Katabolismus auf die gemessenen Herzkreislaufparameter bei *Astacus leptodactylus* unterschiedlich wirkten. Daher stellt sich die Frage, wie hoch die *in vivo* Konzentrationen der Purinderivate bei *Astacus leptodactylus* unter gleichen Bedingungen sind? Um das zu klären, wurden die Konzentrationen von Adenosin, Inosin und Urat sowohl in der Hämolymphe, als auch im Gewebe (3.2.3) von *Astacus leptodactylus* bestimmt. Ausgewählt wurden: a) Adenosin, da es einerseits das nach AMP letzte cardioaktive Purinderivat ist und andererseits seine vielfältigen Effekte auf biologische Funktionen, besonders auf cardiovascularer Ebene, bekannt sind (Fredholm 1980); b) Inosin, da es das direkte Abbauprodukt des Adenosins ist und somit ein Indikator für vorhanden gewesenes Adenosin sein könnte; c) Urat, da es das primäre Endprodukt des ATP-Katabolismus ist und unter hypoxischen Bedingungen die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins bei Crustaceen moduliert (Morris et al. 1985; Zeis et al. 1992).

Unter normoxischen Inkubationsbedingungen konnte in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* keine signifikante Änderung der Purinderivatkonzentrationen über einen Zeitraum von vier Stunden gemessen werden (Abb. 3.9). Im Verlauf der vier Stunden nahm die Adenosinkonzentration tendenziell zu, die Inosinkonzentration im Gegensatz dazu ab. Für die Uratkonzentration konnte keine eindeutige Tendenz gezeigt werden. Während die Konzentration von Adenosin zwischen  $13,8 \pm 3,2$  ( $t_0$ ) und  $19,4 \pm 7,5$   $\text{nmol L}^{-1}$  ( $t_4$ ) lag, konnten für Inosin und Urat Konzentrationen im  $\mu\text{molaren}$  Bereich gemessen werden. Dabei war Urat mit  $91,7 \pm 76,3$  ( $t_3$ ) bis  $141,5 \pm 133,9$   $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $t_1$ ) z.T. über 20fach höher konzentriert als Inosin ( $3,0 \pm 0,9$  ( $t_4$ ) bis  $5,3 \pm 1,5$  ( $t_1$ )  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

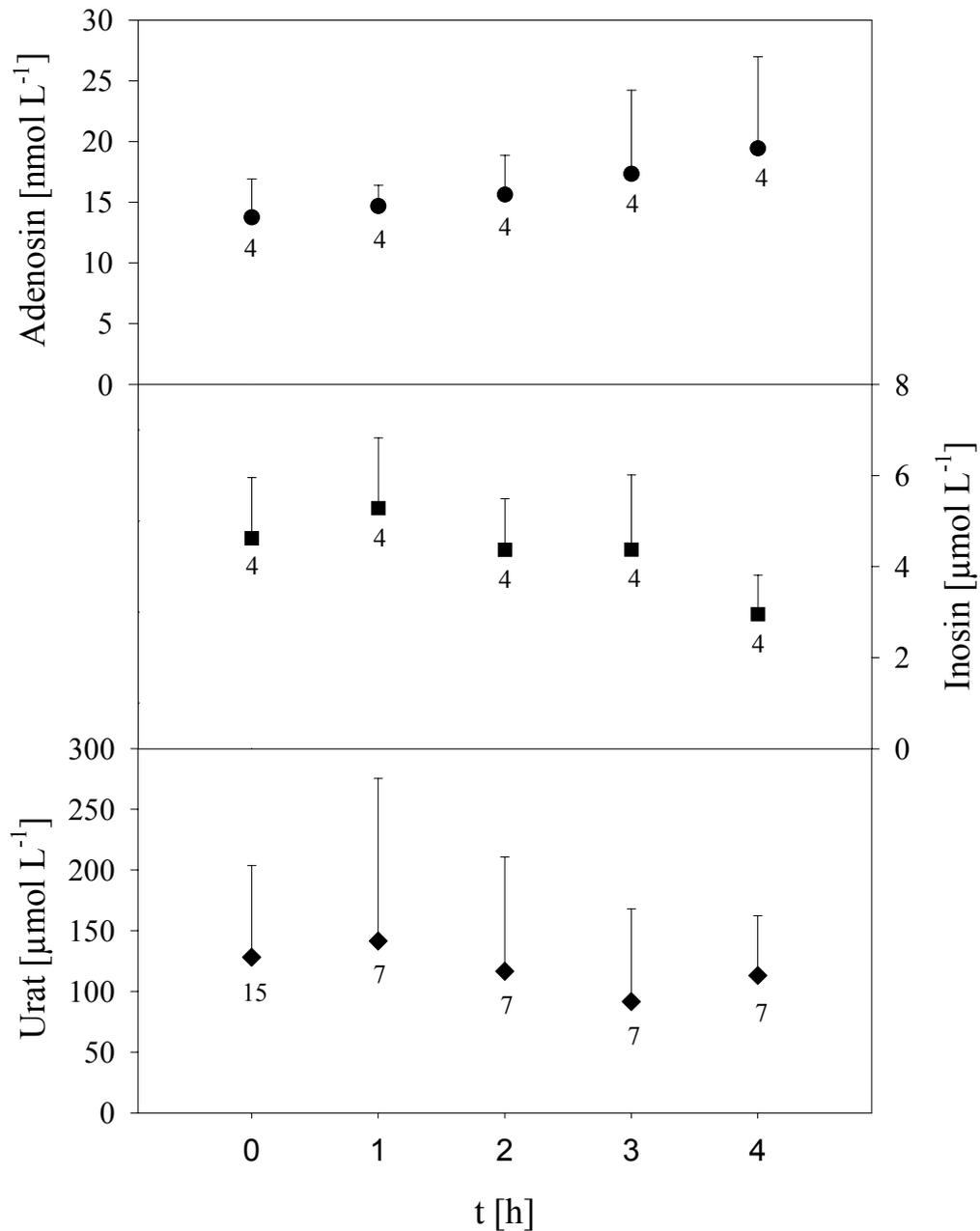


Abb. 3.9: Konzentrationen von Adenosin ● [nmol L<sup>-1</sup>], Inosin ■ und Urat ◆ [μmol L<sup>-1</sup>] in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* während einer vierstündigen normoxischen Inkubation ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der Abbildung geben die Anzahl der Tiere (n) an).

### 3.2.3 Bestimmung der Konzentration von Adenosin, Inosin und Urat in verschiedenen Geweben

Zum Vergleich wurden die Konzentrationen von Adenosin, Inosin und Urat nicht nur in der Hämolymphe, sondern auch im Muskelgewebe von Schwanz (P) und Schere (C) sowie im Hepatopancreasgewebe (H) von *Astacus leptodactylus* bestimmt. Abb. 3.10 zeigt, daß sich die Konzentrationen der drei Purinderivate innerhalb von 24 Stunden (A) unter normoxischen Inkubationsbedingungen nicht signifikant änderten. Ähnlich den Ergebnissen der Hämolymphe

lymphversuche war die Konzentration von Adenosin auch im Gewebe mit Werten unter  $0,5 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  sehr viel niedriger, als die von Inosin ( $> 1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$ ) und Urat, wobei Urat mit bis zu  $40,5 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  wieder in den höchsten Mengen vorzufinden war. Innerhalb der einzelnen Gewebe lagen die Konzentrationen aller Purinderivate im Scherenmuskel und im Hepatopankreas über denen im Schwanzmuskel.

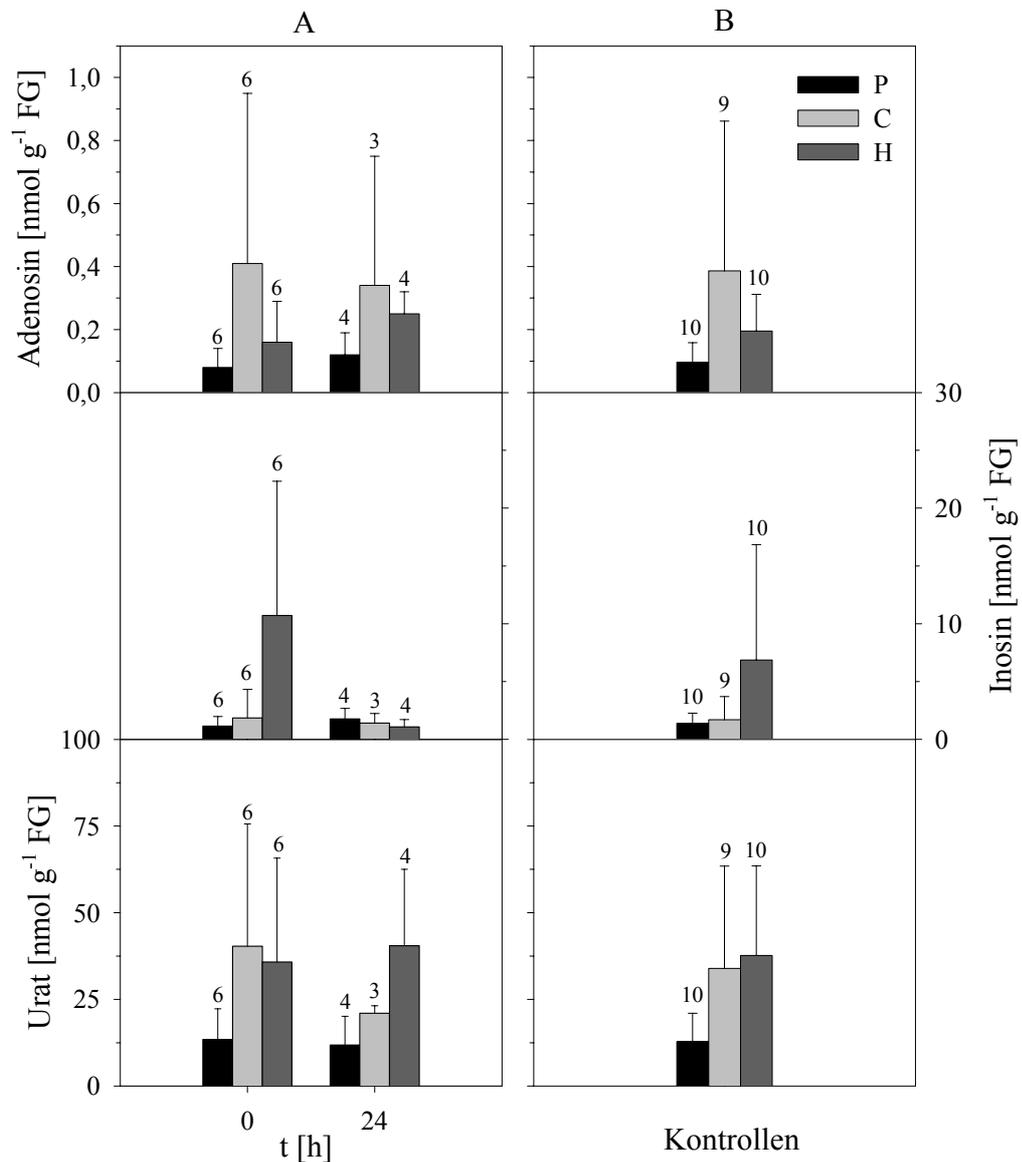


Abb. 3.10: Konzentration von Adenosin, Inosin und Urat [ $\text{nmol g}^{-1} \text{ FG}$ ] im Schwanzmuskel (P), Scherenmuskel (C) und Hepatopankreas (H) von *Astacus leptodactylus* während normoxischer Inkubation. A: 0 h und 24 h Normoxie, B: gemittelte Kontrollen aus den in A dargestellten Konzentrationen zu 0 h und 24 h Normoxie ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der Abbildung geben die Anzahl der Tiere (n) an).

Nach 24 Stunden erhöhten sich die Konzentrationen von Adenosin und Inosin im Schwanzmuskel um  $0,04$  und  $0,6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  auf  $0,12 \pm 0,07$  bzw.  $1,8 \pm 0,9 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$ . Die Uratkonzentration sank dagegen geringfügig von  $13,4 \pm 8,9$  auf  $11,8 \pm 8,3 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$ . Im

Scherenmuskel erniedrigten sich die Konzentrationen aller Purine, die des Urats um 52 % auf  $21,0 \pm 2,2 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$ . Auffällig ist, daß nur die Inosinkonzentration im Hepatopancreas sehr stark um  $9,6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  auf  $1,08 \pm 0,6 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  abfiel, was sich aber mit Hilfe der Einzeldaten durch zwei sehr hohe Einzelwerte erklären läßt. Da sich innerhalb von 24 Stunden keine signifikanten Änderungen der Purinderivatkonzentrationen feststellen ließen, wurden, wie in Teil B der Abb. 3.10 gezeigt, die Konzentrationen für Schwanz-, Scherenmuskel und Hepatopancreas zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden gemittelt. In allen nachfolgenden Gewebeversuchen wurden diese Mittelwerte als Kontrollen verwendet.

### 3.3 Die Uratkonzentration in der Hämolymphe unter moderater Hyperoxie

Wie bereits erwähnt, akkumuliert Urat unter hypoxischen Bedingungen in Crustaceen und moduliert die Sauerstoffaffinität der Hämolymphe (Morris et al. 1985; Zeis et al. 1992). Unter normoxischen Bedingungen lag die Konzentration von Urat in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* (Abb. 3.9) meist über  $110 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Da bei *Astacus leptodactylus* (Czytrich 1990) und *Homarus americanus* (Zeis et al. 1992) niedrigere Uratkonzentrationen in der Hämolymphe ermittelt worden waren, sollte anhand einer moderat hyperoxischen Inkubation festgestellt werden, ob die höheren Uratkonzentrationen der normoxischen Inkubation dieser Arbeit nicht auf akkumuliertes Urat zurückzuführen sind.

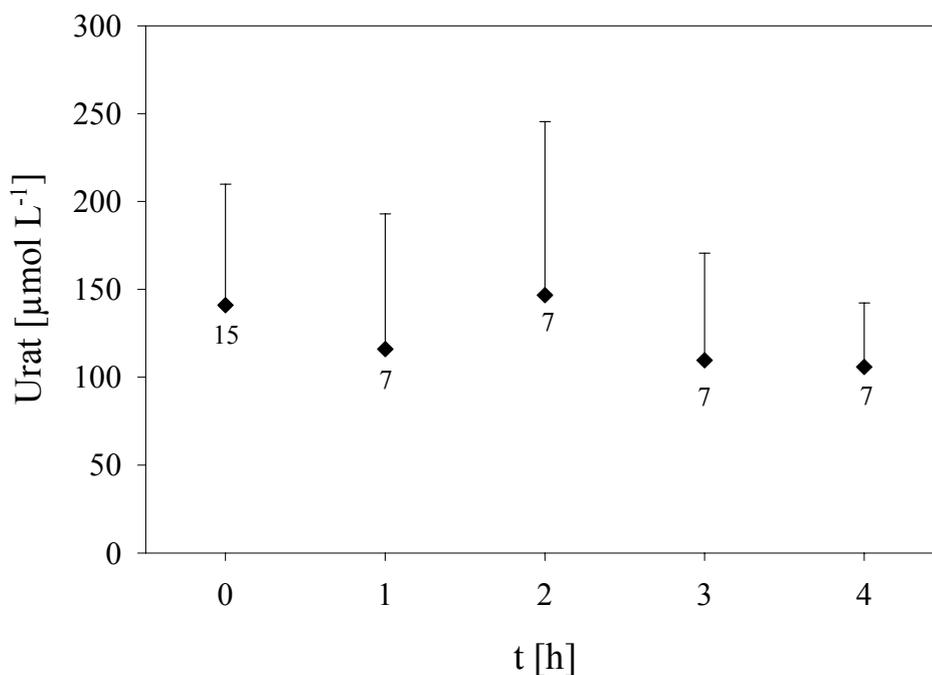


Abb. 3.11: Uratkonzentration [ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ] in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* während einer hyperoxischen Inkubation ( $\text{PO}_2 = 28 - 36,7 \text{ kPa}$ ) über 240 Minuten ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der Abbildung geben die Anzahl der Tiere (n) an).

Zur Überprüfung wurde *Astacus leptodactylus* vier Stunden lang in einer moderat hyperoxischen Umgebung mit einem Sauerstoffpartialdruck zwischen 28 und 36,7 kPa inkubiert. Abb. 3.11 zeigt, daß in der Hämolymphe innerhalb dieses Zeitraums die Konzentration des Urats tendenziell jedoch nicht signifikant abnahm. Sie schwankte zwischen  $141,0 \pm 68,8$  und  $105,9 \pm 36,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  nach vier Stunden. Unter moderat hyperoxischen Inkubationsbedingungen lag Urat in Konzentrationen vor, die denen der normoxischen Inkubation entsprachen. Demnach war unter normoxischen Bedingungen kein Urat akkumuliert.

### **3.4 Die Auswirkung einer biotopbedingten Hypoxie auf die Herzkreislaufparameter und die Purinkonzentrationen in Hämolymphe und Gewebe**

Viele Crustaceen können auch bei einer starken Absenkung des Sauerstoffangebotes in ihrem Biotop leben. So verträgt *Astacus leptodactylus* eine Erniedrigung des Sauerstoffgehaltes im Wasser bis zu  $3,97 \text{ mg L}^{-1}$  (8,9 kPa bei 20 °C) (Köksal 1988) und *Austropotamobius pallipes* verweilt noch bis zu einem  $\text{PO}_2$  von  $42 \pm 5$  Torr ( $5,6 \pm 0,67$  kPa) im Wasser, erst unterhalb dieses Grenzwertes geht er an Land (Taylor und Wheatley 1980). Wie können die Tiere dennoch die Sauerstoffversorgung ihres Organismus mit Absinken des  $\text{PO}_2$  aufrecht erhalten? Aus der Literatur (Morris et al. 1985; Zeis et al. 1992) ist bekannt, daß unter Sauerstoffmangel in der Hämolymphe von Crustaceen Urat akkumuliert wird. Urat moduliert auf der Ebene des Hämocyanins, indem es die Sauerstoffaffinität des respiratorischen Pigments erhöht. Damit kann auch bei einem niedrigen  $\text{PO}_2$  im Lebensraum das Hämocyanin verstärkt mit Sauerstoff beladen werden. Es sollte daher untersucht werden, ob eine Erniedrigung des  $\text{PO}_2$  die Konzentrationen der verschiedenen Purinderivate in Hämolymphe und Gewebe von *Astacus leptodactylus* verändert, wobei besonders Adenosin von Interesse ist, da es den Herzkreislauf aktivierend beeinflusst (Abb. 3.6 D in dieser Arbeit; Stegen und Grieshaber 2001). Die Akkumulation von Urat in Abhängigkeit vom  $\text{PO}_2$ , als auch die direkte Wirkung einer akut hypoxischen Situation auf die Herzkreislaufparameter sollten ebenfalls für eine komplexere Gesamtdarstellung untersucht werden.

#### **3.4.1 Messung der arteriellen Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe und der Herzfrequenz mit Hilfe der Pulsed-Doppler-Flowmetrie**

Zur Messung der Herzkreislaufparameter unter hypoxischen Bedingungen wurden die Tiere im ersten Teil des Experiments (Abb. 3.12 A) nach einer zehnmütigen, normoxischen Vorlaufphase mit Stickstoff begast. Der  $\text{PO}_2$  (V) fiel innerhalb der ersten 10 Minuten nach Beginn der Begasung unter 4 kPa und betrug bis zum Ende der hypoxischen Phase maximal 2

kPa. Im zweiten Teil des Experiments wurde zum Zeitpunkt  $t_{120}$  anstelle von Stickstoff Luft zur Reoxygenierung in das Versuchsbecken eingeleitet (Abb. 3.12 B), so daß nach weiteren 30 Minuten annähernd ein normoxischer Sauerstoffpartialdruck von  $18,8 \pm 0,9$  kPa ( $t_{150}$ ) erreicht wurde. Die Wirkung von  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosin auf die arterielle Fließgeschwindigkeit und die Herzfrequenz wurde sowohl während hypoxischer (A1) als auch normoxischer (B1) Phase getestet.

Anhand der Ergebnisse sollten verschiedene Fragestellungen geklärt werden:

- Wie verändert sich die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe in den drei Arterien und die Herzfrequenz in Abhängigkeit vom  $\text{PO}_2$ ?
- Werden durch die Reoxygenierung wieder ähnliche Fließgeschwindigkeiten der Hämolymphe und eine ähnliche Herzfrequenz im Vergleich zur normoxischen Kontrolle K1 (Abb. 3.12;  $t_1$ - $t_{10}$ ) erreicht?
- Sind die Effekte einer Adenosininfusion auf den Herzkreislauf unter Sauerstoffmangel sowie nach Reoxygenierung (Abb. 3.12; A1 und B1) mit denen unter normoxischen Bedingungen (Abb. 3.6 D, S. 40) vergleichbar?

Ein Vergleich der normoxischen Kontrolle K1 ( $t_1$ - $t_{10}$ ) mit der Begasungsphase A ( $t_{11}$ - $t_{80}$ ) in Abb. 3.12 zeigt, daß mit dem Eintreten der Hypoxie die Herzfrequenz (IV) signifikant vom mittleren Kontrollwert mit  $82,8 \pm 10,1$  auf  $29,6 \pm 5,8$  bpm in der 80. Minute sank. Entsprechend verringerte sich die Hämolymphefließgeschwindigkeit in der A. descendens (II) ab  $t_{61}$  signifikant und war bei  $t_{80}$  im Vergleich zur Kontrolle um  $17,4$  auf  $37,4 \pm 12,4 \text{ mm s}^{-1}$  gesunken. Die Fließgeschwindigkeiten in der A. posterior (I) und der A. lateralis (III) erniedrigten sich geringfügig, jedoch keinesfalls signifikant.

Die Reoxygenierung (Abb. 3.12 B) des Wassers auf einen normoxischen  $\text{PO}_2$  erhöhte die Herzfrequenz und die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe in allen Gefäßen. Im Vergleich zur Kontrolle (K1) waren die Herzfrequenz (IV) und die Fließgeschwindigkeit in der A. posterior (I) bei  $t_{180}$  geringfügig um  $9,7$  auf  $92,5 \pm 6,6$  bpm (IV), bzw. um  $3,1$  auf  $22,0 \pm 8,1 \text{ mm s}^{-1}$  (I) über die Ausgangswerte angestiegen. Dagegen blieben zu diesem Zeitpunkt die Fließgeschwindigkeiten in der A. descendens (II) um  $15,3 \text{ mm s}^{-1}$  und der A. lateralis (III) um  $8,9 \text{ mm s}^{-1}$  unterhalb der mittleren Kontrollwerte ( $54,8 \pm 19,2 \text{ mm s}^{-1}$  (II) und  $24,3 \pm 11,4 \text{ mm s}^{-1}$  (III)).

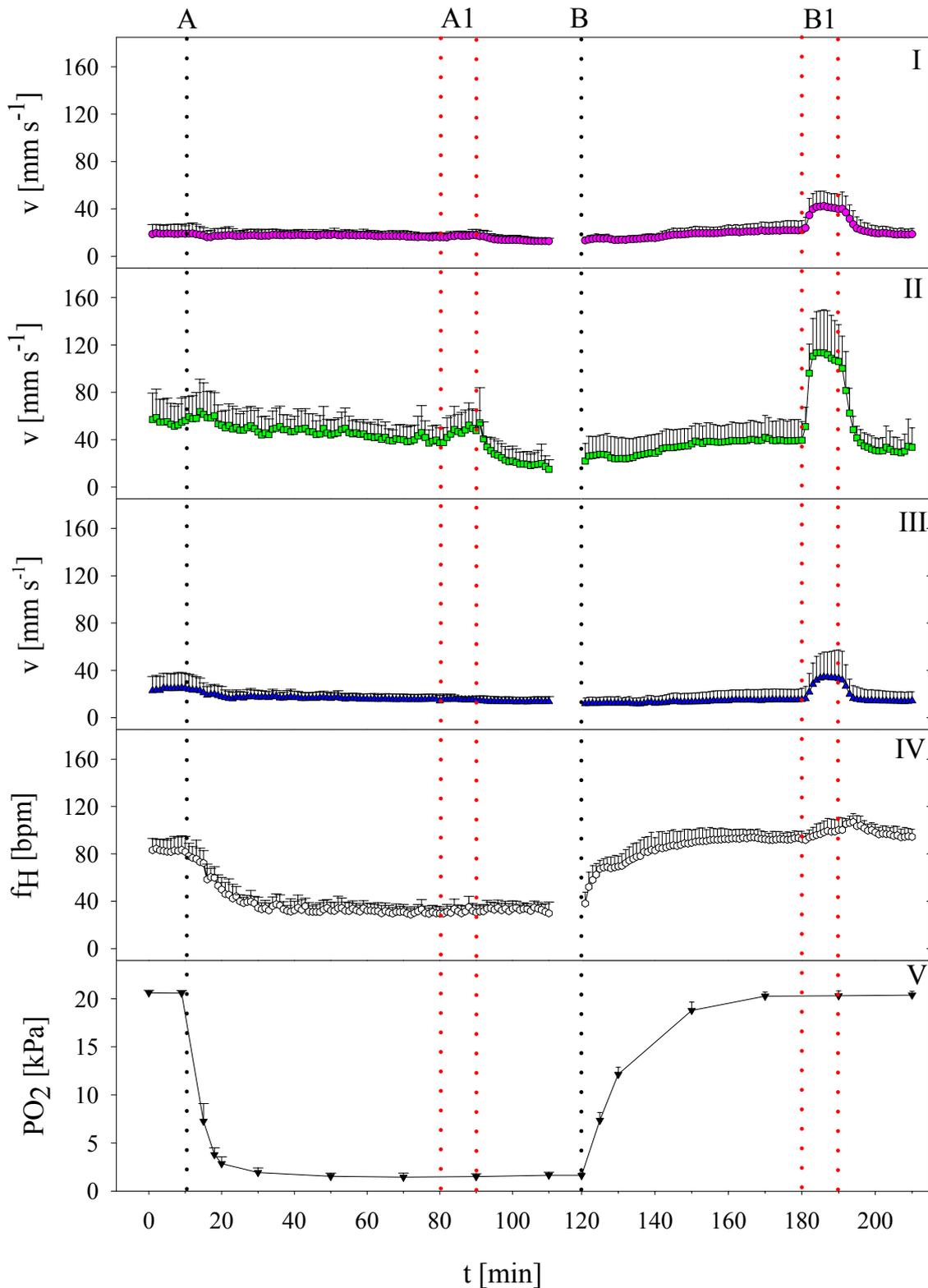


Abb. 3.12:  $PO_2$ -abhängige Änderung der Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [ $mm\ s^{-1}$ ] in der A. posterior (I), der A. descendens (II) und der A. lateralis (III) sowie der Herzfrequenz (IV) [bpm] bei *Astacus leptodactylus* über einen Zeitraum von 210 Minuten. Die hypoxische Phase A beginnt zum Zeitpunkt  $t_{10}$  mit dem Einleiten von  $N_2$ , woran sich ab  $t_{120}$  die Reoxigenierungsphase B durch Begasen mit Luft anschließt. Die über den gesamten Zeitraum gemessenen Sauerstoffpartialdrücke [kPa] sind unter V in der Abbildung dargestellt. Die Intervalle A1 und B1 kennzeichnen die jeweils zehnmütige Infusion von  $3,5\ nmol\ min^{-1}\ g^{-1}$  FG Adenosinlösung. Aus technischen Gründen wurden die Herzkreislaufparameter im Zeitraum  $t_{110}$ - $t_{120}$  nicht aufgezeichnet. Signifikante Änderungen sind in Tab. 3.3 aufgeführt. ( $X \pm SD$ ; die Anzahl der Tiere bei A:  $n = 9$  (I), 11 (II), 5 bzw. 4 bei  $t_{80}$  (III), 8 (IV), 13 (V) und bei B:  $n = 6$  (I), 8 (II), 5 (III), 8 (IV), 13 (V)).

Tab. 3.3: Tabellarische Übersicht der Zeitpunkte aus Abb. 3.12, zu denen sich die Fließgeschwindigkeit in den gemessenen Gefäßen und die Herzfrequenz im Vergleich zu den drei Kontrollbereichen (K1-K3) signifikant erniedrigt (*kursiv*) bzw. signifikant erhöht (**fett**) hatte. Es wurden die angegebenen Zeitintervalle gegen jeden Wert aus dem Kontrollbereich (K) getestet: K1 =  $t_1-t_{10}$ , K2 =  $t_{71}-t_{80}$ , K3 =  $t_{171}-t_{180}$ .

Vergleich von Kontrollen mit Zeitintervallen	Gefäße			
	I A. posterior	II A. descendens	III A. lateralis	IV Herz
K1 mit $t_{11}-t_{80}$	–	<i><math>t_{61}-t_{80}</math></i>	–	<i><math>t_{14}-t_{80}</math></i>
K2 mit $t_{81}-t_{110}$	<i><math>t_{94}-t_{110}</math></i>	<b><math>t_{83}-t_{91}</math></b> <i><math>t_{94}-t_{110}</math></i>	–	–
K1 mit $t_{121}-t_{180}$	–	<i><math>t_{121} \&amp; t_{131}-t_{138}</math></i>	–	<i><math>t_{121}-t_{136}</math></i>
K3 mit K1	–	–	–	–
K3 mit $t_{181}-t_{210}$	<b><math>t_{181}-t_{194}</math></b>	<b><math>t_{181}-t_{194}</math></b>	<b><math>t_{183}-t_{192}</math></b>	<b><math>t_{190}-t_{196}</math></b>

Unter Sauerstoffmangel war der cardioaktivierende Effekt, der durch die Infusion von Adenosin unter normoxischen Bedingungen (Abb. 3.6 D) beobachtet werden konnte, vermindert. Bei einem Sauerstoffpartialdruck unter 4 kPa änderte sich die Herzfrequenz (IV) durch die Applikation von Adenosin nicht. Trotzdem erhöhte sich die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe in der A. descendens (II) signifikant von  $40,1 \pm 14,1 \text{ mm s}^{-1}$  (Mittelwert der Kontrolle K2,  $t_{71}-t_{80}$ ) auf  $54,2 \pm 29,6 \text{ mm s}^{-1}$  in der 91. Minute. In der A. posterior (I) und in der A. lateralis (III) stiegen die Fließgeschwindigkeiten geringfügig, aber nicht signifikant an.

Nach vollständiger Reoxigenierung ( $PO_2 > 20 \text{ kPa}$ ) konnte in allen drei Arterien die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe sowie die Herzfrequenz durch Adenosin wieder signifikant gegenüber der Kontrolle (K3,  $t_{171}-t_{180}$ ) erhöht werden. Die Fließgeschwindigkeiten stiegen um 20,6 (I), 74,1 (II), 10,1 (III)  $\text{mm s}^{-1}$  auf  $42,4 \pm 12,6$  (I),  $113,5 \pm 35,4$  (II),  $34,5 \pm 21,2$  (III)  $\text{mm s}^{-1}$ . Gegenüber der Kontrolle war die Herzfrequenz erst nach Infusionsende ( $t_{194}$ ) maximal um 14,6 auf  $107,0 \pm 7,0 \text{ bpm}$  erhöht. Diese Werte sind in Tab. 3.4 den Erhöhungen der Herzkreislaufparameter nach einer Adenosininfusion unter normoxischen Bedingungen aus Abb. 3.6 D (3.2.1.5, S.40) gegenübergestellt. Der Vergleich zeigt, daß die Fließgeschwindigkeiten der Hämolymphe und die Herzfrequenzen durch Adenosin in beiden Fällen um ähnliche Geschwindigkeiten bzw. Frequenzen erhöht wurden. Nach einer Reoxigenierung ist es möglich, durch die Applikation von Adenosin wieder positiv chronotrope Effekte bei *Astacus leptodactylus* hervorzurufen und den Kreislauf zu aktivieren.

Tab. 3.4: Übersicht der Differenzen der Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe in der A. posterior, der A. descendens, der A. lateralis [ $\text{mm s}^{-1}$ ] und der Herzfrequenz [bpm], die aus dem Mittelwert des zehnmütigen Vorlaufs mit dem, durch Infusion von  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosin erreichten Maximalwert gebildet wurden. Vergleichend dargestellt sind die Differenzen aus Abschnitt 3.4.1 Abb. 3.12 und aus Abschnitt 3.2.1.5 Abb. 3.6.

	A. posterior [ $\text{mm s}^{-1}$ ]	A. descendens [ $\text{mm s}^{-1}$ ]	A. lateralis [ $\text{mm s}^{-1}$ ]	Herz [bpm]
$\Delta$ Erhöhung Adenosininfusion aus 3.4.1	20,6	74,1	10,1	14,6
$\Delta$ Erhöhung Adenosininfusion aus 3.2.1.5	22,3	75,4	16,4	17,4

### 3.4.2 Bestimmung der Konzentration von Adenosin, Inosin und Urat in der Hämolymphe

#### 3.4.2.1 Biotopbedingte Hypoxie über vier und über 20 Stunden

Abb. 3.13 A zeigt die Änderungen der Purinderivatkonzentrationen in der Hämolymphe während einer vierstündigen hypoxischen Inkubation bei einem  $\text{PO}_2 < 2,67 \text{ kPa}$ . Die Adenosinkonzentration sank nach einer Stunde von  $24,3 \pm 34,5$  auf  $9,6 \pm 19,2 \text{ nmol L}^{-1}$ . Noch niedrigere Konzentrationen lagen nach vier Stunden mit  $6,0 \pm 8,8 \text{ nmol L}^{-1}$  vor, wobei zwischen der zweiten und vierten Stunde der Inkubation maximale Konzentrationen von  $31,4 \pm 36,4 \text{ nmol L}^{-1}$  erreicht wurden. Die Konzentrationsunterschiede beim Inosin schwankten nicht so stark, sie betragen zwischen  $7,9 \pm 3,7$  ( $t_0$ ) und  $13,9 \pm 4,9$  ( $t_3$ )  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Die Uratkonzentration erhöhte sich innerhalb der vier Stunden um 55,5 auf  $147,6 \pm 46,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ , auch wenn nach zwei Stunden ein Minimum von  $88,1 \pm 45,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  gemessen wurde. Keine der Konzentrationsänderungen war jedoch statistisch signifikant verschieden zum jeweiligen Kontrollwert  $t_0$ . Da Czytrich (1990) in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* erst nach acht Stunden signifikante Uratkonzentrationen messen konnte, wurde in einem zweiten Experiment untersucht, ob die drei Purinderivate erst nach länger andauernder Hypoxie ( $\text{PO}_2 < 2,67 \text{ kPa}$ ) akkumulieren. Abb. 3.13 B gibt die Ergebnisse für eine 20stündige hypoxische Inkubation wieder. Auch innerhalb dieser Zeit wurde Adenosin nicht signifikant erhöht und die Konzentrationen schwankten ohne eindeutige Tendenz um ähnliche Werte zwischen  $16,0 \pm 9,2$  und  $39,8 \pm 51,5 \text{ nmol L}^{-1}$ .

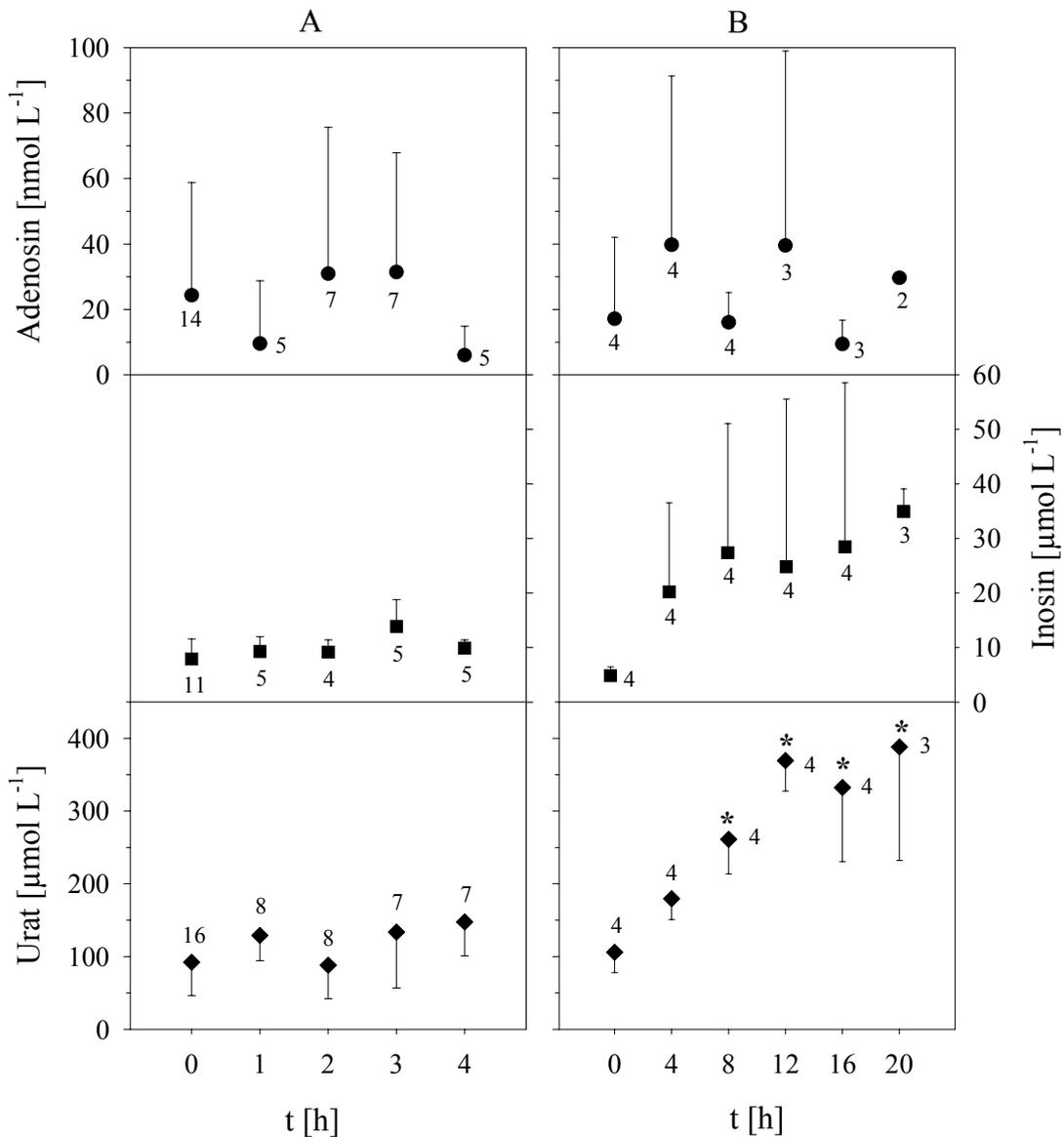


Abb. 3.13: Konzentration von Adenosin • [nmol L<sup>-1</sup>], Inosin ■ und Urat ♦ [μmol l<sup>-1</sup>] in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* nach hypoxischer Inkubation (PO<sub>2</sub> < 2,67 kPa) über 4 h (A) und über 20 h (B). (X ± SD; die Ziffern in der Abbildung geben die Anzahl der Tiere (n) an). \* = signifikant verschieden vom jeweiligen t<sub>0</sub>-Wert.

Die Inosinkonzentration war in diesem Experiment nach vier Stunden mit  $20,2 \pm 16,3$  μmol L<sup>-1</sup> um  $15,3$  μmol L<sup>-1</sup> höher gegenüber t<sub>0</sub>. Mit zunehmender Zeit stieg die Inosinkonzentration weiter an und erreichte nach 20 Stunden die höchsten Werte ( $35,0 \pm 4,1$  μmol L<sup>-1</sup>) für diesen Zeitraum. Die einzigen statistisch signifikanten Änderungen in der Konzentration konnte bei Urat nach acht Stunden beobachtet werden. Innerhalb der ersten 12 Stunden stieg die Uratkonzentration von  $105,9 \pm 28,0$  μmol L<sup>-1</sup> fast linear auf  $369,5 \pm 41,9$  μmol L<sup>-1</sup> an und nahm in den folgenden acht Stunden nur noch um  $18,7$  μmol L<sup>-1</sup> zu.

### 3.4.2.2 Die Akkumulation von Urat in Abhängigkeit von unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken

Nachdem allein Urat in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* innerhalb von 20 Stunden hypoxischer Inkubation signifikant akkumulierte, sollte untersucht werden, welchen Einfluß der Sauerstoffpartialdruck auf die Uratbildung hat. Dazu wurde bei fünf verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken (Abb. 3.14: a)  $13,6 \pm 1,1$  kPa; b)  $6,9 \pm 0,5$  kPa; c)  $3,6 \pm 0,7$  kPa; d)  $2,4 \pm 0,8$  kPa; e)  $1,1 \pm 0,3$  kPa) die Uratproduktion in der Hämolymphe über 48 Stunden bei 20 °C bestimmt. Das Ergebnis zeigt, daß eine Abhängigkeit der Uratkonzentration vom  $PO_2$  besteht. Während bei 13,6 kPa keine eindeutige Tendenz zu beobachten war und die Uratkonzentrationen zwischen  $130,8 \pm 79,3$  und  $142,4 \pm 56,7$   $\mu\text{mol L}^{-1}$  schwankten, konnte bei einem halb so hohen Partialdruck (6,9 kPa) eine leichte Zunahme von 117,6 auf  $271,0 \pm 249,8$   $\mu\text{mol L}^{-1}$  über den gesamten Zeitraum ( $t_0$  bis  $t_{48}$ ) festgestellt werden. Bei 3,6 kPa traten erste signifikante Änderungen in der Uratakkumulation auf. Nach 16 Stunden Inkubation war die Konzentration von  $155,1 \pm 135,2$  auf  $387,6 \pm 209,5$   $\mu\text{mol L}^{-1}$  gestiegen. Insgesamt erhöhte sich Urat nach 48 Stunden um 294,4 auf  $449,4 \pm 491,6$   $\mu\text{mol L}^{-1}$ , wobei noch höhere Werte von  $501,0 \pm 319,6$   $\mu\text{mol L}^{-1}$  zum Zeitpunkt  $t_{40}$  erreicht wurden. Die Uratkonzentrationen von Tieren, die bei 3,6 kPa inkubiert worden waren, schwankten auffällig, was sich in den hohen Standardabweichungen widerspiegelt. Signifikante Konzentrationsänderungen konnten nach 16 Stunden hypoxischer Exposition gemessen werden. In den nachfolgenden hypoxischen Versuchen (d und e) sind die Abweichungen geringer. Es wurden auch in einem kürzeren Zeitraum noch höhere, signifikante Uratkonzentrationen erreicht. So stieg bei 2,4 kPa innerhalb von 32 Stunden die Uratkonzentration um 437,5 auf  $553,7$   $\mu\text{mol L}^{-1}$ , bei 1,1 kPa um 332,8 auf  $431,5$   $\mu\text{mol L}^{-1}$  an. Zum Vergleich lag die Konzentration zur gleichen Zeit bei  $350,9 \pm 246,1$  (3,6 kPa),  $166,8 \pm 42,1$  (6,9 kPa) bzw.  $112,9 \pm 80,0$  (13,6 kPa)  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Sauerstoffpartialdrücke unter 2,4 kPa schafften eine für *Astacus leptodactylus* stark hypoxische Umgebung, in der die verwendeten Tiere ähnliche und vor allem sehr hohe und signifikante Uratkonzentrationen akkumulierten, die Werte von über 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  erreichten. Der Sauerstoffanteil war so gering, daß mit zunehmender Versuchszeit immer mehr Tiere während des Versuches starben, wodurch sich die Zeitpunkte mit  $n = 1$  erklären lassen und die Tiere nicht länger als 32 Stunden inkubiert wurden.

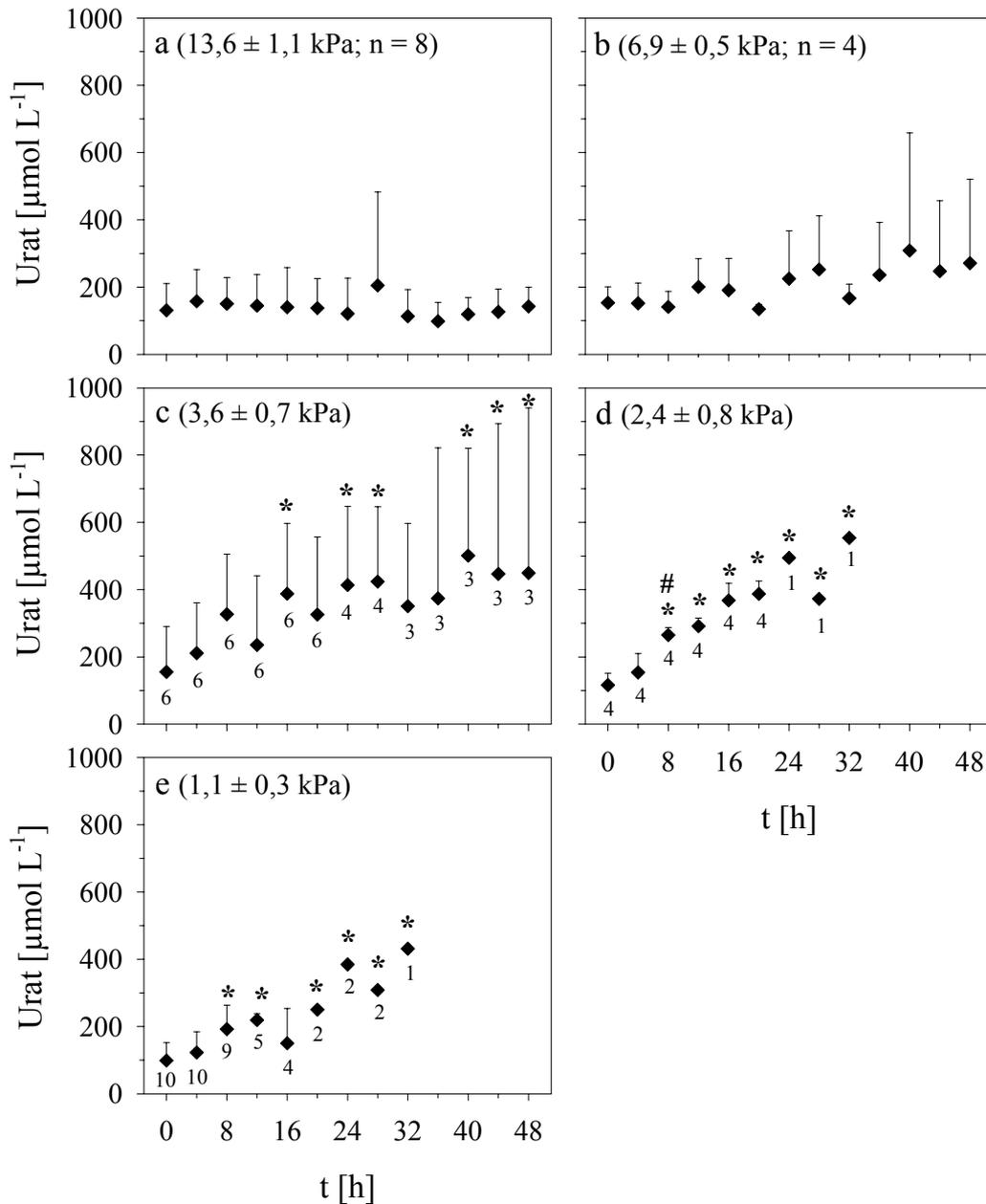


Abb. 3.14: Uratkonzentration [ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ] in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* nach maximal 48 h hypoxischer Inkubation bei verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken [kPa]. Der  $\text{PO}_2$  betrug bei a:  $13,6 \pm 1,1$  kPa; b:  $6,9 \pm 0,5$  kPa; c:  $3,6 \pm 0,7$  kPa; d:  $2,4 \pm 0,8$  kPa; e:  $1,1 \pm 0,3$  kPa. ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der Abbildung, bzw. bei a und b in Klammern, geben die Anzahl der Tiere (n) an). \* = signifikant verschieden vom jeweiligen  $t_0$ -Wert. # = signifikant verschieden vom vorherigen Wert.

### 3.4.3 Die Konzentration von Adenosin, Inosin und Urat in verschiedenen Geweben nach 24 Stunden biotopbedingter Hypoxie

Aufgrund der Ergebnisse der Hämolympheversuche stellt sich nun die Frage, wie sich die Purinderivatkonzentrationen im Gewebe ändern, wenn die Tiere hypoxisch inkubiert werden. Kommt es zu einer ähnlichen Verteilung wie in der Hämolymphe? Außerdem stellt sich die Frage, ob die Konzentrationen im Gewebe über denen in der Hämolymphe liegen.

Während einer 24stündigen biotopbedingten Hypoxie ( $PO_2 < 3,73$  kPa) stieg die Konzentration von Adenosin in allen drei untersuchten Geweben statistisch signifikant an (Abb. 3.15). Im Schwanzmuskel war Adenosin bis zur 18. Stunde maximal um den Faktor 3,2 erhöht, stieg dann innerhalb der nächsten sechs Stunden signifikant auf  $1,2 \pm 1,5$  nmol g<sup>-1</sup> FG, den 12,7fachen Wert der Kontrolle, an. Die höchsten Adenosinkonzentrationen konnten im Scherenmuskel gemessen werden. Dort erhöhte sich die Konzentration kontinuierlich über 24 Stunden signifikant zur Kontrolle um den Faktor 7,4 auf  $2,9 \pm 3,3$  nmol g<sup>-1</sup> FG. Im Hepatopancreasgewebe wurden die niedrigsten Adenosinkonzentrationen gemessen. Nach 12 Stunden konnte diesem Gewebe  $1,0 \pm 0,7$  nmol g<sup>-1</sup> FG Adenosin nachgewiesen werden, das gegenüber der Kontrolle um das 5,1fache signifikant erhöht war. Innerhalb der folgenden 12 Stunden fiel die Konzentration wieder auf  $0,7 \pm 0,4$  nmol g<sup>-1</sup> FG ab, war aber noch signifikant verschieden zur Kontrolle.

Die Inosinkonzentration war innerhalb der ersten 12 Stunden in den Muskeln und im Hepatopancreas sehr niedrig. Nach 18 Stunden konnte eine stärkere Zunahme der Konzentration in allen Geweben gemessen werden. Im Schwanzmuskel war die Inosinkonzentration nach 24 Stunden signifikant um das 61,3fache gegenüber der Ausgangskonzentration von  $1,4 \pm 0,9$  nmol g<sup>-1</sup> FG angestiegen. Dagegen konnte im Scherenmuskel bereits nach 18 Stunden eine signifikante Erhöhung der Konzentration auf  $60,6 \pm 73,9$  nmol g<sup>-1</sup> FG nachgewiesen werden, die sich zu diesem Zeitpunkt um den Faktor 36 von der Kontrolle unterschied. Nach 24 Stunden war die Konzentration weiter signifikant angestiegen und lag um Faktor 51,9 über der Kontrolle ( $1,7 \pm 2,0$  nmol g<sup>-1</sup> FG). Verglichen mit den Muskelgeweben war Inosin im Hepatopancreasgewebe während der gesamten Versuchsdauer nicht signifikant angestiegen. Die höchsten Konzentrationen gegenüber der Kontrolle ( $6,9$  nmol g<sup>-1</sup> FG) wurden nach 18 und 24 Stunden mit  $30,2 \pm 27,2$  bzw.  $25,3 \pm 15,4$  nmol g<sup>-1</sup> FG bestimmt.

Die Uratkonzentration erhöhte sich im Schwanzmuskel signifikant um den Faktor 3,4 auf  $43,5 \pm 17,7$  nmol g<sup>-1</sup> FG ( $t_{24}$ ) gegenüber der Kontrolle, allerdings lag sie unterhalb der Konzentration des Scherenmuskels. Im Scherenmuskel war die Uratkonzentration nach 24 Stunden hypoxischer Inkubation mit  $70,5 \pm 37,2$  nmol g<sup>-1</sup> FG um das 2fache höher als zu Beginn der Begasung. Zu keinem Zeitpunkt war Urat in diesem Gewebe signifikant zur Kontrolle erhöht. Die höchsten Uratkonzentrationen konnten im Hepatopancreasgewebe nachgewiesen werden. Innerhalb von 24 Stunden stieg dort die Konzentration signifikant von  $37,7 \pm 25,8$  auf  $143,7 \pm 73,3$  nmol g<sup>-1</sup> FG gegenüber der Kontrolle an.

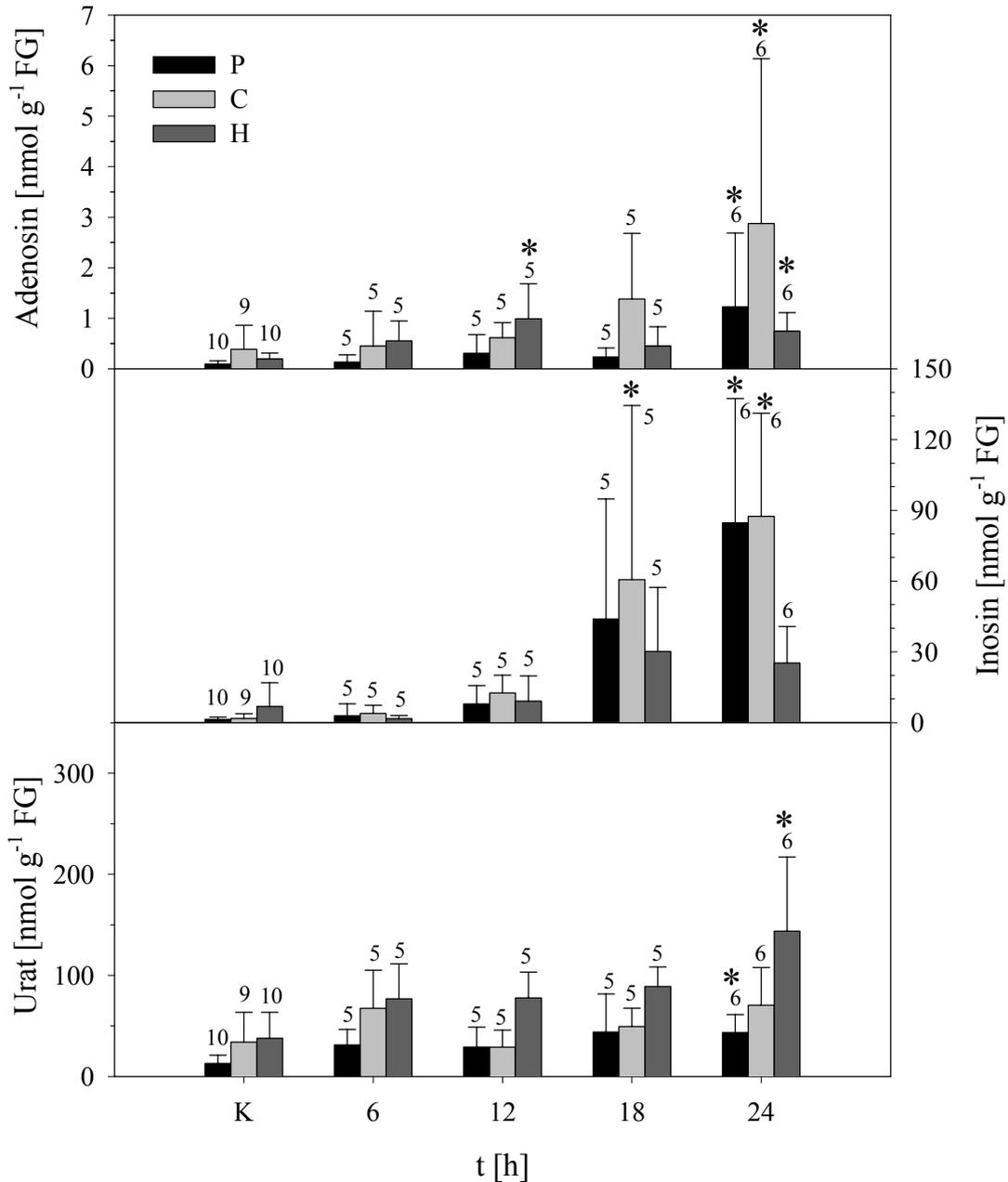


Abb. 3.15: Konzentration der Purine Adenosin, Inosin und Urat [nmol g<sup>-1</sup> FG] im Schwanzmuskel (P), Scherenmuskel (C) und Hepatopancreas (H) von *Astacus leptodactylus* während 24stündiger hypoxischer Inkubation ( $PO_2 \leq 3,73$  kPa). ( $X \pm SD$ ; die Ziffern in der Abbildung geben die Anzahl der Tiere (n) an). \* = signifikant verschieden vom jeweiligen Kontrollwert (K).

### 3.5 Die Auswirkung einer akuten funktionellen Hypoxie auf die Herzkreislaufparameter und die Purinkonzentrationen in Hämolymphe und Gewebe

Eine weitere Sauerstoffmangelsituation für einen Organismus stellt die akute funktionelle Hypoxie dar, die durch extreme Muskelarbeit bedingt ist. Bei *Astacus leptodactylus* tritt exzessive Muskelaktivität durch erhöhtes Schwanzschlagen auf, einem ruckartigen Einschlagen des muskulären Abdomens, wodurch sich der Krebs äußerst schnell rückwärts fortbewegt (Müller 1954). Neben dieser Fluchbewegung reagiert das Tier auch mit Drohgebärden der

Scheren, um sich vor Angriffen zu verteidigen (Stehr 1988). Die nachfolgenden Ergebnisse sollen nun Informationen darüber liefern, inwieweit sich einerseits die Herzkreislaufparameter während einer solchen Situation ändern. Andererseits interessiert, ob die Purinderivate Adenosin und Urat vermehrt in Hämolymphe und Gewebe gebildet werden, um durch ihre spezifischen Einflüsse auf die Hämolympffließgeschwindigkeit, die Herzfrequenz und die Sauerstoffaffinität des respiratorischen Pigments eine bessere Sauerstoffversorgung des Tieres zu gewährleisten.

### **3.5.1 Messung der arteriellen Fließgeschwindigkeit und der Herzfrequenz mit Hilfe der Pulsed-Doppler-Flowmetrie**

In Abb. 3.16 wird deutlich, daß die Änderung der Herzkreislaufparameter von *Astacus leptodactylus* durch extreme muskuläre Aktivität nicht einheitlich ist. Stiegen die Fließgeschwindigkeiten der Hämolymphe in der A. posterior (I) und der A. descendens (II) innerhalb von drei Minuten Aktivität jeweils signifikant um den Faktor 2,7 auf maximal  $61,9 \pm 15,2$  (I) bzw.  $221,4 \pm 72,3$  (II)  $\text{mm s}^{-1}$  zum jeweiligen mittleren Vorlaufwert an, so veränderte sich dagegen die Geschwindigkeit in der A. lateralis (III) kaum. In dieser wurde zum Zeitpunkt  $t_{14}$  eine geringfügige Erhöhung von  $2,8 \text{ mm s}^{-1}$  gegenüber dem mittleren Vorlaufwert von  $22,7 \pm 6,2 \text{ mm s}^{-1}$  gemessen. Die Herzfrequenz stieg sofort nach einer Minute Aktivität signifikant um  $36,0 \text{ bpm}$  auf  $101,1 \pm 11,3 \text{ bpm}$  an. Während der Erholungsphase fiel die Herzfrequenz tendenziell ab und war zum Zeitpunkt  $t_{60}$  noch signifikant gegenüber den Werten des Vorlaufs erhöht.

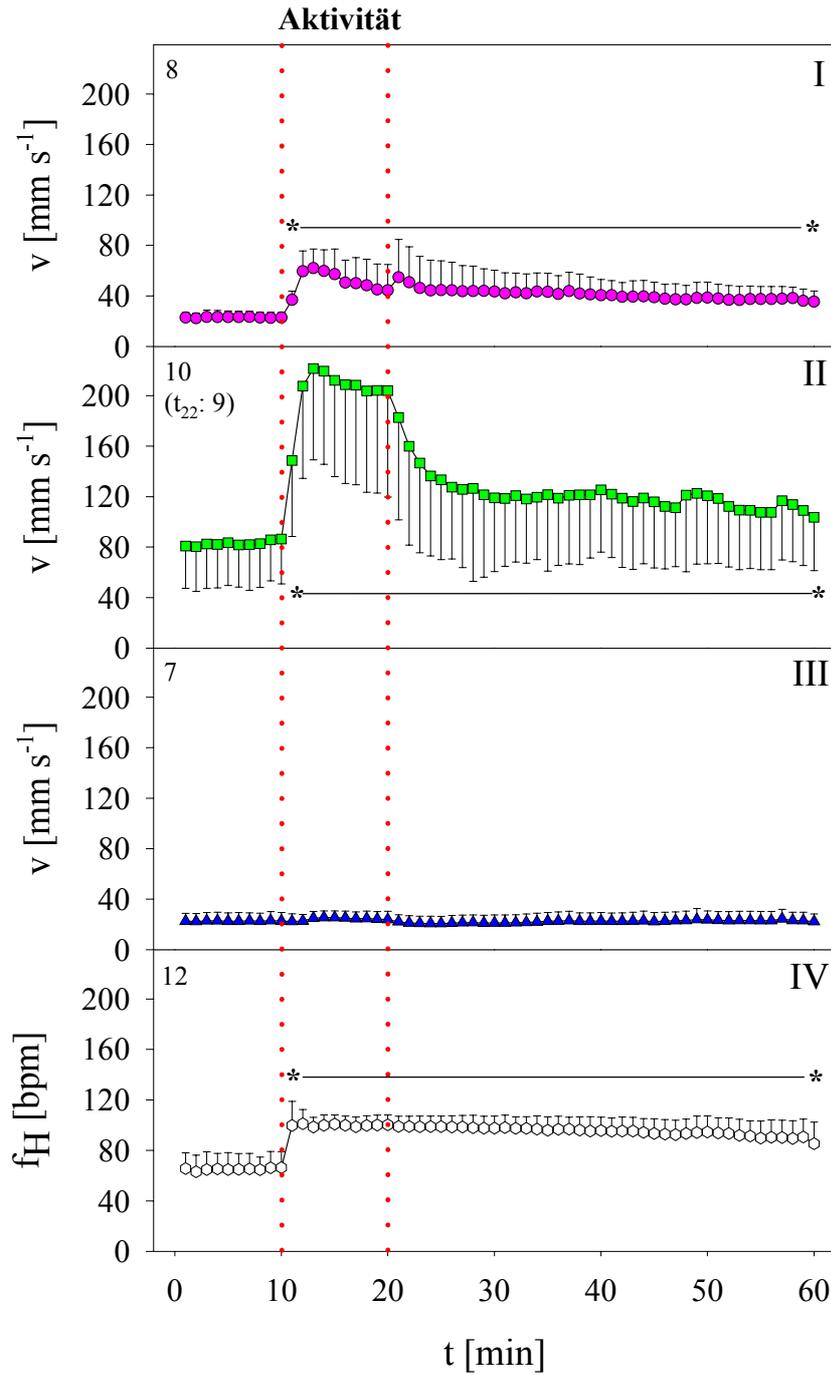


Abb. 3.16: Der Einfluß von muskulärer Aktivität auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in der A. posterior (I), der A. descendens (II) und der A. lateralis (III) sowie auf die Herzfrequenz (IV) [bpm] bei *Astacus leptodactylus*. Nach einem zehnminütigen Vorlauf ( $t_1$ - $t_{10}$ ) wurde *Astacus leptodactylus* für 10 Minuten zum Schwanzschlagen animiert. ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der linken oberen Ecke jeder Graphik geben die Anzahl der Tiere ( $n$ ) an). \* = signifikant erhöht zu allen zehn Werten des Vorlaufs.

### 3.5.2 Bestimmung der Konzentration von Adenosin, Inosin und Urat in der Hämolymphe

In der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* konnten nach einer zweiminütigen Aktivitätsphase keine signifikanten Änderungen in den Konzentrationen von Adenosin, Inosin und Urat im Vergleich zum Kontrollwert ( $t_0$ ) gemessen werden.

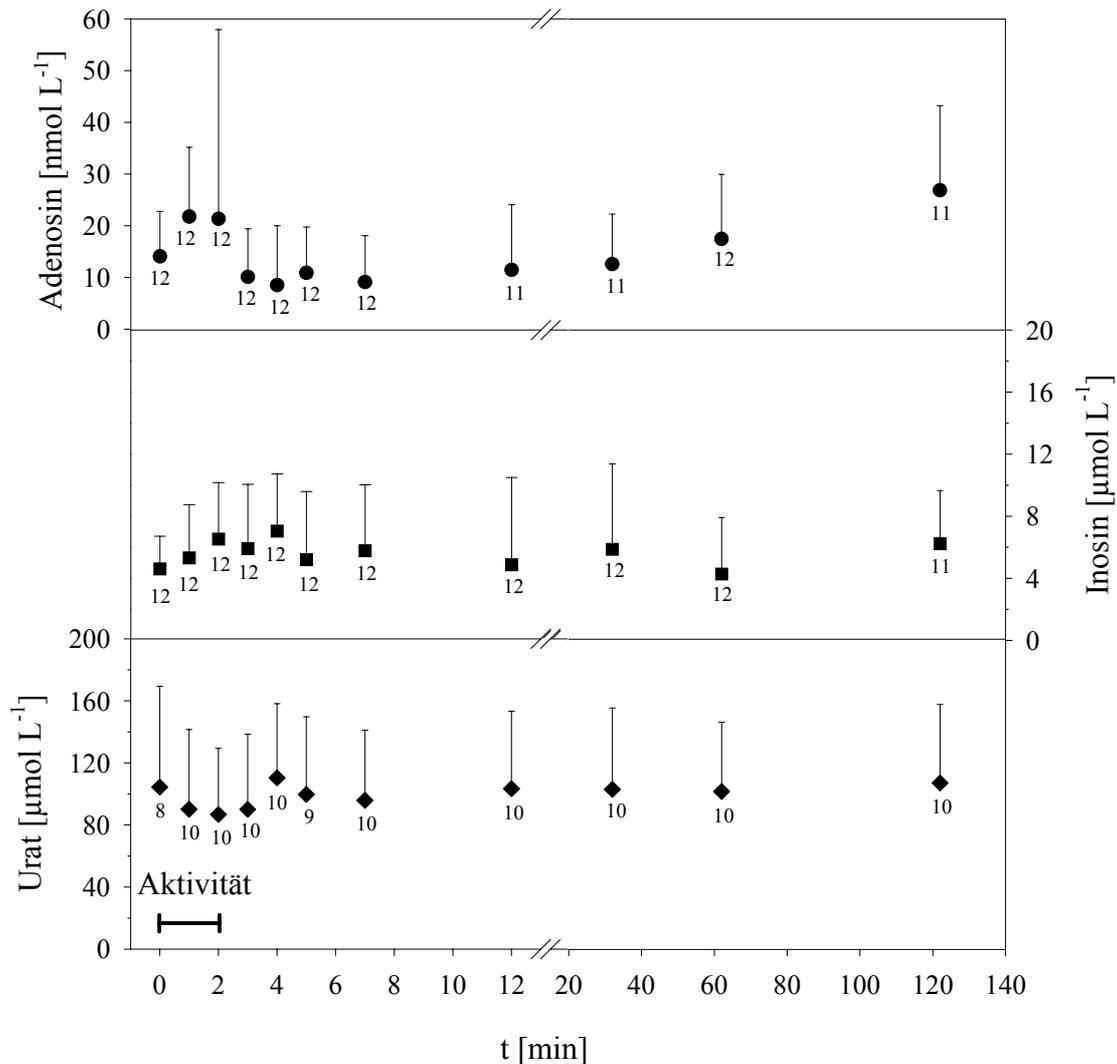


Abb. 3.17: Konzentration der Purine Adenosin ● [nmol L<sup>-1</sup>], Inosin ■ und Urat ◆ [μmol L<sup>-1</sup>] in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* vor ( $t_0$ ), während ( $t_1$ ,  $t_2$ ) und nach ( $t_3 - t_{120}$ ) starker Muskelaktivität durch Schwanzschlagen. ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der Abbildung geben die Anzahl der Tiere (n) an).

Innerhalb der ersten Minute extremer Muskelaktivität erhöhte sich die Adenosinkonzentration um 7,7 auf  $21,7 \pm 13,4 \text{ nmol L}^{-1}$ , die während der zweiten Minute Aktivität mit  $21,3 \pm 36,6 \text{ nmol L}^{-1}$  annähernd konstant blieb. Sofort nach Aktivitätseende sank die Konzentration auf Werte unterhalb der Ausgangskonzentration von  $14,1 \pm 8,7 \text{ nmol L}^{-1}$  und erst nach 62 Minuten wurden wieder höhere Adenosinkonzentrationen gemessen. Auch die Inosinkon-

zentration stieg mit Beginn der Muskelaktivität an, aber im Gegensatz zum Adenosin erhöhte sich hier die Konzentration erst nach Ende der Aktivitätsphase maximal, so daß zum Zeitpunkt  $t_4$   $7,0 \pm 3,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  vorlagen. Eine Minute später sank die Inosinkonzentration auf  $5,2 \pm 4,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  und war gegenüber  $t_0$  noch um  $0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  erhöht. Bis zum Ende des Versuches stieg die Konzentration nicht mehr über  $6,2 \pm 3,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  an. Die Uratkonzentration sank während der Aktivitätsphase innerhalb der ersten Minute um 14,2 auf  $90,2 \pm 51,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  und blieb bis zur dritten Minute etwa gleich niedrig. Danach erreichte Urat jedoch innerhalb einer Minute einen Maximalwert von  $110,4 \pm 47,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $t_4$ ), einem Plus von  $20,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  gegenüber dem Vorwert. Innerhalb der restlichen Versuchszeit pendelte die Konzentration von Urat zwischen  $95,8 \pm 45,2$  und  $107,3 \pm 50,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

### 3.5.3 Bestimmung der Konzentration von Adenosin, Inosin und Urat in verschiedenen Geweben

Abb. 3.18 zeigt die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung der Purinderivate in Muskel- und Hepatopancreasgewebe während funktioneller Hypoxie. Nach einer Minute Aktivität bildeten die Tiere im Schwanzmuskel (P) signifikant Adenosin, das gegenüber der Kontrolle von  $0,1 \pm 0,1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  um  $0,4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  (Faktor 4,8) und nach zwei Minuten Aktivität um  $1,1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  (Faktor 12,1) erhöht war. Nach einer Minute Erholung war die Konzentration wieder auf  $0,3 \pm 0,2 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  abgesunken, sie blieb aber bis zum Ende des Versuches oberhalb der Kontrollwerte. Im Scherenmuskel (C) sank die Adenosinkonzentration von  $0,4 \pm 0,5 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  nach einer Minute auf  $0,1 \pm 0,1 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  und stieg im weiteren Verlauf nicht über die Ausgangswerte an. Auch im Hepatopancreas (H) konnte primär eine Erniedrigung der Adenosinkonzentration beobachtet werden. Im Anschluß an die Aktivitätsphase stieg sie um den Faktor 3,2 gegenüber der Kontrolle auf  $0,6 \pm 0,4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  an, sank jedoch nach fünf und 10 Minuten Erholung wieder geringfügig ab.

Zwar konnte beim Inosin mit Beginn der Aktivität im Schwanzmuskel eine leichte Zunahme der Konzentration von  $1,4 \pm 0,9$  (K) auf  $2,5 \pm 1,0$  (1A)  $\text{nmol g}^{-1} \text{ FG}$  gemessen werden, aber erst nach zwei Minuten muskulärer Arbeit war die Konzentration signifikant um das 7,4fache der Ausgangskonzentration gestiegen und auch nach einer Minute Erholung, im Gegensatz zum Adenosin, immer noch signifikant um das 5,7fache erhöht. Nach 10 Minuten Erholung lag die Inosinkonzentration noch immer über  $5,4 \pm 4,4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$ . Im Scherenmuskel dagegen gab es wie beim Adenosin nur geringfügige Änderungen in der Konzentration, lag sie über den gesamten Meßzeitraum zwischen  $1,0 \pm 0,8$  (1A) und  $1,9 \pm 1,3$  (5E)  $\text{nmol g}^{-1} \text{ FG}$ . Im Hepatopancreas (H) dagegen konnten keine signifikanten Konzentrationsänderungen

gen festgestellt werden, obwohl die Konzentration von Inosin nach zwei Minuten Aktivität um  $6,4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  auf  $0,5 \pm 0,9 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  gesunken war und in der Erholungsphase nach fünf und 10 Minuten sogar auf Werte um  $10 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  stieg. Signifikante Änderungen wären vielleicht aufgetreten, wenn der Kontrollwert im Hepatopancreas, wie unter 3.2.3 beschrieben, durch die „Ausreißer“ weniger hoch gewesen wäre.

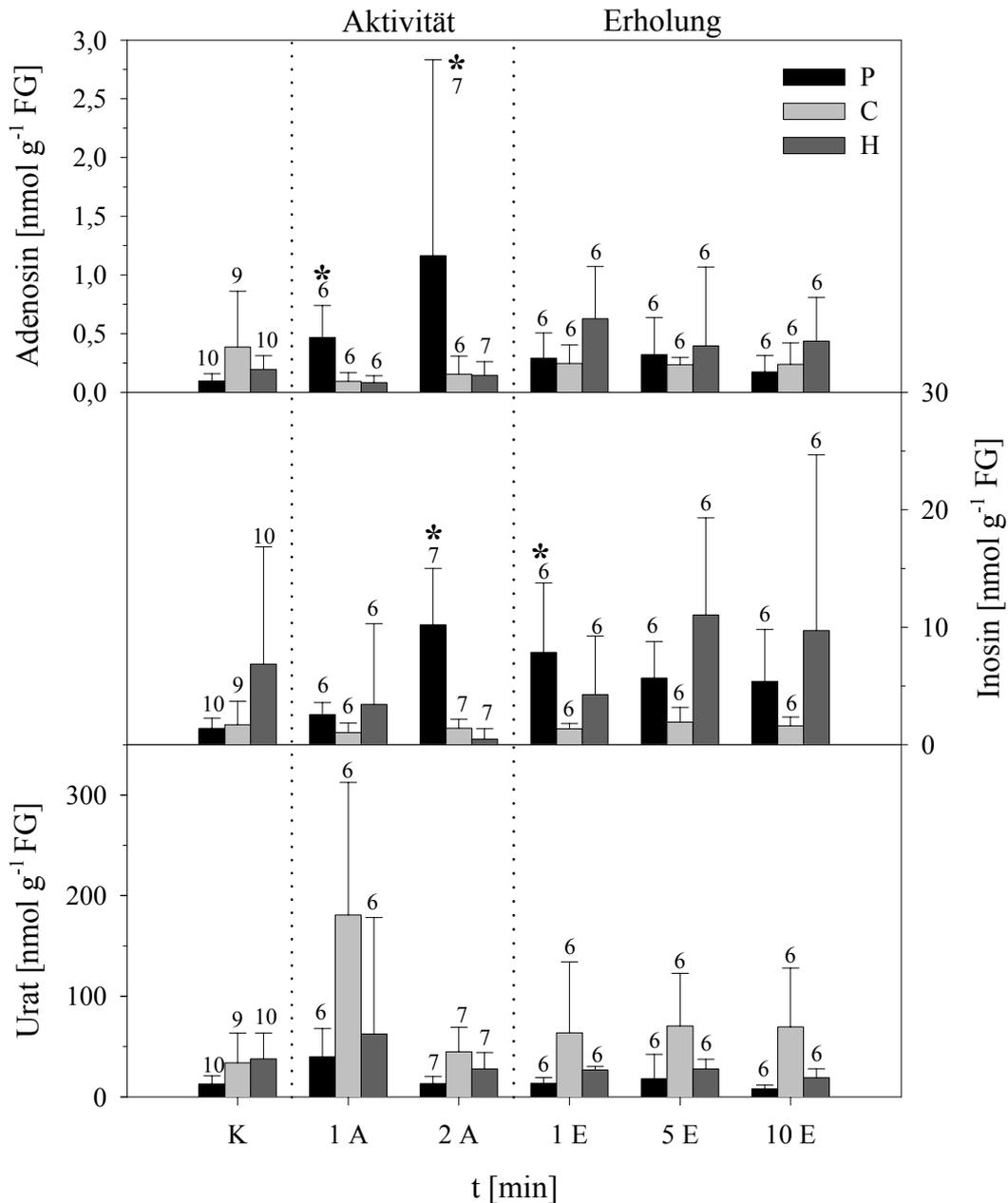


Abb. 3.18: Konzentration der Purine Adenosin, Inosin und Urat [ $\text{nmol g}^{-1} \text{ FG}$ ] im Schwanzmuskel (P), Scherenmuskel (C) und Hepatopancreas (H) von *Astacus leptodactylus* vor (Kontrolle K), während (A) und nach (E) starker Muskelaktivität durch Schwanzschlagen. Die Konzentrationen wurden nach einer (1A) und nach zwei (2A) Minuten Aktivität bestimmt sowie nach einer (1E), nach fünf (5E) und nach 10 Minuten (10E) Erholung. ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der Abbildung geben die Anzahl der Tiere (n) an). \* = signifikant verschieden vom jeweiligen Kontrollwert (K).

Urat war im Scherenmuskel in den höchsten Konzentrationen meßbar. Stieg die Uratkonzentration nach der ersten Minute Aktivität um das 5,3fache des Kontrollwertes auf  $180,8 \pm 131,7 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$ , fiel sie ebenso rasch wieder innerhalb der zweiten Minute Aktivität um  $135,9 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  ab. Während der Erholungsphase lag die Konzentration bei Werten um  $70 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  und war somit um das zwei- bis dreifache höher als im Schwanzmuskel und im Hepatopancreas. In diesen Geweben konnten nur geringe Erhöhungen der Uratkonzentration nach einer Minute Muskelaktivität gemessen werden, stieg sie im Schwanzmuskel um  $27,06 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  und im Hepatopancreas um  $24,8$  auf  $39,8 \pm 28,2 \text{ (T) nmol g}^{-1} \text{ FG}$  bzw. auf  $62,5 \pm 115,8 \text{ (H) an}$ . Schon ab der zweiten Aktivitätsminute (2A) konnte bis zum Versuchsende in beiden Geweben kein Urat über  $18,1 \pm 3,7 \text{ (T) und } 27,9 \pm 9,6 \text{ (H) nmol g}^{-1} \text{ FG}$  gemessen werden.

#### 4. Diskussion

Ursprünglich im Kaspischen und Asowschen Meer beheimatet, drang *Astacus leptodactylus* im Laufe der Zeit ins Schwarze Meer und dessen Zuflüsse bis ins untere Donautal ein. Die Verbreitung von *Astacus leptodactylus* erstreckt sich über zahlreiche und unterschiedliche Habitate. Er kann in tiefen, schattigen Seen, Flüssen, Bächen und sumpfigen Gewässern gedeihen. Nicht umsonst wird diese robuste Spezies auch „Sumpfkrebs“ genannt. Eine schnelle Anpassung an Umweltbedingungen, z.B. in Ästuaren, führten bei *Astacus leptodactylus* zu einer Verträglichkeit extremer Bedingungen. Er toleriert Gewässertiefen bis zu 20 m bei Temperaturen zwischen 4 und 32 °C sowie eine Absenkung des Sauerstoffgehalts auf 3,97 mg L<sup>-1</sup> (8,9 kPa bei 20 °C) (Müller 1954; Hofmann 1980; Köksal 1988; Zeitler 1990). Einem Sauerstoffmangel oder einer zu starken Gewässerverunreinigung können Flußkrebse zeitweise durch Landgang ausweichen (Groß 2002), was Taylor und Wheatly (1980) bei *Austropotamobius pallipes* ab einem kritischen PO<sub>2</sub> von 5,60 ± 0,67 kPa (15 °C) beobachteten. Demnach sind Adaptationsstrategien erforderlich, um einerseits bei biotopbedingter Hypoxie eine verminderte Sauerstoffversorgung kompensieren und andererseits bei exzessiver Muskelaktivität (funktionelle Hypoxie) einen erhöhten Sauerstoffbedarf decken zu können.

Die Anpassung der Sauerstoffversorgung erfolgt auf verschiedenen Ebenen, durch die Veränderung der Ventilation, der Herzkreislaufparameter und der Sauerstoffaffinität der respiratorischen Pigmente. Solche Mechanismen nutzen viele decapode Crustaceen: Sie erhöhen z.B. bei Aktivität die Scaphognathitenfrequenz und damit die Ventilationsrate zur Steigerung des Wasserdurchstroms in den Kiemen (McMahon et al. 1979; Booth et al. 1982; De Wachter und McMahon 1996b) sowie die Herzfrequenz, das Schlagvolumen und die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe (Booth et al. 1982; De Wachter und McMahon 1996b; Stegen und Grieshaber 2001) zum schnelleren Transport der respiratorischen Pigmente. Das respiratorische Atmungspigment, das Hämocyanin, wird durch Metabolite wie L-Lactat (Truchot 1980) und Urat (Morris et al. 1985) sowie durch anorganische Ionen (Mangum 1983) und Neurohormone (z.B. L-Dopamin) (Morris und McMahon 1989) in seinen Affinitätseigenschaften gegenüber Sauerstoff verändert.

Trotz der bisherigen Erkenntnisse über die Atmung der Crustaceen ist die systemische Regulation der Sauerstoffversorgung noch nicht vollständig geklärt. Besonders die herzaktivierenden und gefäßregulierenden Wirkungen des Purinmetabolits Adenosin, dessen Bedeutung Drury und Szent-Györgyi schon 1929 beschrieben und dessen Freisetzung mit hypoxi-

schen Situationen in Zusammenhang gebracht wurde (Bruns 1990), sollten bei *Astacus leptodactylus* neben den Wirkungen des Urats untersucht werden. Zur Klärung wurden mit Hilfe des Doppler-Verfahrens die Herzkreislaufparameter unter normoxischen und extrem hypoxischen Bedingungen gemessen und mit der Verteilung der Purinderivatkonzentrationen aus Hämolymphe und verschiedenen Geweben unter gleichen Bedingungen verglichen. Um einen ersten Eindruck über die herzaktivierende Wirkung der Purinderivate zu erhalten, wurden die einzelnen Metabolite des ATP-Katabolismus in die Krebse infundiert und im Falle des Adenosins spezifiziert.

#### **4.1 Cardiovasculäre Auswirkungen infundierter Purinderivatlösungen bei *Astacus leptodactylus***

##### **4.1.1 Einflüsse durch die Infusion von Flüssigkeit in das Kreislaufsystem**

Die Infusion verschiedener Flüssigkeitsvolumina (Abb. 3.1, S. 31) in das Herzkreislaufsystem von *Astacus leptodactylus* sollte Aufschluß über mögliche baroreflektorische Effekte in diesen Tieren geben. Barorezeptoren werden durch eine Änderung des Blutvolumens, des Herzzeitvolumens, der regionalen Blutverteilung und des arteriellen Blutdrucks erregt. Bei Säugern liegen sie u.a. im Aortenbogen und im Carotissinus und reagieren auf eine Dehnung der Gefäßwände (Busse 2000). In einigen Crustaceen konnten barorezeptorähnliche Reflexe nachgewiesen werden. Die Abweichung des Hämolympfvolumens um 5-10 % führte in der in der Landkrabbe *Cardisoma guanhumi* zu einem Anstieg des Hämolympfdrucks und einer damit verbundenen Abnahme der Herzfrequenz (Burggren et al. 1990). In der Krabbe *Goniopsis cruentata* dagegen spiegelte sich eine Ab- oder Zunahme des Volumens in der Änderung des Hämolympfdrucks im dorsalen Sinus wider, wohingegen sich die Herzfrequenz nur minimal verschob (Wilkins und Young 1992). In dieser Arbeit (Abb. 3.1, S. 31) konnte bei *Astacus leptodactylus* keine signifikante Beeinflussung der Herzfrequenz in Abhängigkeit vom Infusionsvolumen beobachtet werden. Die Absenkung der Frequenz zum Zeitpunkt  $t_{11}$  in jedem Versuch war auf den Start der Infusion zurückzuführen, da innerhalb von einer Minute wieder Vorlaufwerte erreicht wurden, als auch am Ende der Infusion diese Reaktion wiederholt auftrat. Dagegen führte ein Volumen von 2,7 % der Gesamthämolymphe, auf ein mittleres Gewicht von  $109,8 \pm 24,2$  g bezogen, nach zehnminütiger Ringer-Infusion zu einer signifikanten Erniedrigung der Hämolympffließgeschwindigkeit in der A. posterior und der A. descendens. Zwar konnten nach der Infusion von insgesamt 0,15 mL (0,5 %) als auch von 0,46 mL (1,4 %) Änderungen in der Fließgeschwindigkeit beider Gefäße beobachtet werden, die allerdings innerhalb der natürlichen Schwankungsbreite lagen. Zu hohe Infusionsvolumina

fürten bei *Astacus leptodactylus* zu Reflexen, die nicht primär die Herzfrequenz, sondern die Hämolympfließgeschwindigkeit veränderten. Möglich wäre eine Regulation des Herzzeitvolumens (HZV) durch Vergrößerung des Schlagvolumens. Beim Säuger wird ein größeres Schlagvolumen, bedingt durch eine erhöhte diastolische Füllung des Herzens, als Folge einer kardialen Autoregulation (Frank-Starling-Mechanismus) bei zu hoher Volumenbelastung beschrieben (Antoni 2000). Ob ein solcher Mechanismus in diesem Fall auch bei *Astacus leptodactylus* eintritt, ist fraglich, da McMahon (1995a, b) aufgrund von Untersuchungen an isolierten Crustaceenherzen bei diesen Tieren eher von einer untergeordneten Rolle des Frank-Starling-Mechanismus bei der natürlichen Volumenregulation ausgeht. Aufgrund der volumenbedingten Reflexe bei *Astacus leptodactylus* wurde bei den nachfolgenden Infusionsversuchen eine Geschwindigkeit von  $0,046 \text{ mL min}^{-1}$  eingesetzt, deren Gesamtvolumen von  $0,46 \text{ mL}$  keine signifikanten Effekte hervorrief. Daher sind alle möglichen kardiovaskulären Reaktionen in den nachfolgenden Experimenten nicht auf die Ringer-Lösung, sondern auf die zugesetzten Purinderivate zurückzuführen.

#### 4.1.2 Abschätzung der Infusionsbedingungen

Da die herzaktivierende Wirkung des Adenosins bekannt war und entsprechende Effekte durch dessen Applikation bei *Homarus americanus* aufgetreten waren (Stegen und Grieshaber 2001), lag es nahe, die Infusionen dieser Versuche mit einer Adenosinlösung durchzuführen.

##### *Konzentration*

Mit Hilfe fünf verschiedener Adenosinkonzentrationen sollte die geeignetste Konzentration für die Purininfusionen ermittelt werden (Abb. 3.2 u. 7.1, S. 32 u. 116). Die Infusion von  $0,44$  und  $0,88$  sowie  $1,75 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosin führte in allen drei Gefäßen zu einer geringfügigen, nicht signifikanten Erhöhung der Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe, die in der A. descendens am ausgeprägtesten war, wohingegen sich die Herzfrequenz erst ab  $1,75 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosin steigern ließ. Demnach mußten vor Einsetzen der chronotropen Wirkung andere Mechanismen beteiligt sein, die zur Geschwindigkeitserhöhung beitrugen. Unterhalb von  $1,75 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG konnten möglicherweise nicht genügend Adenosinrezeptoren belegt werden, um eine rezeptorvermittelte Antwort hervorzurufen, die sich in einem positiv chronotropen Effekt widerspiegelt hätte. Die lokale Konzentration von Adenosin ist sicherlich entscheidend, da die Rezeptoren, falls verschiedene Subtypen beteiligt sein sollten, unterschiedliche Affinitäten zum Substrat aufweisen (Ralevic und Burnstock 1998). Erst die Konzentration von  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosin bewirkte eine signifikante

Änderung der gemessenen Parameter, die nur durch die Infusion von  $7,0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosin in der A. descendens gesteigert werden konnte. In diesem Gefäß war die Geschwindigkeit nach der Applikation von  $7,0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosin um  $131 \text{ mm s}^{-1}$  gegenüber dem mittleren Vorlaufwert von  $52,6 \text{ mm s}^{-1}$  erhöht und lag  $56 \text{ mm s}^{-1}$  über der maximalen Geschwindigkeit, die durch die Infusion von  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosin erreicht wurde. Wahrscheinlich wurden durch die Infusion von  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosin alle vorhandenen Rezeptoren belegt und infolgedessen schon bei dieser Konzentration eine maximale Antwort hervorgerufen. Ansonsten hätte mit der höheren Substratkonzentration in allen Gefäßen und bei der Herzfrequenz eine weitere Steigerung auftreten müssen. Da sich nur die Hämolympffließgeschwindigkeit in der A. descendens weiter erhöhen ließ, muß dieser Effekt auf andere Faktoren als die Schlagfrequenz alleine zurückgeführt werden. Das könnte sowohl durch eine anhaltende Beeinflussung der cardioarteriellen Klappen (McMahon 1995b), als auch durch ein erhöhtes HZV aufgrund einer tachycardiebedingten Steigerung des Tonus und des Fließwiderstandes in diesem Gefäß (Wilkens 1981) bewirkt worden sein. Aufgrund dieser Ergebnisse schien die Adenosinkonzentration von  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG am besten für die Infusionsexperimente geeignet zu sein.

#### *Infusionsdauer*

Stegen und Grieshaber (2001) infundierten bei *Homarus americanus* verschiedene Purinlösungen in einem Zeitraum von 10 Minuten. Hätte eine längere Infusionsdauer vielleicht zu stärkeren Effekten geführt? Zur Klärung dieser Möglichkeit wurde *Astacus leptodactylus* in fünf verschiedenen Versuchen unterschiedlich lange Adenosin infundiert. Abb. 3.3 und 7.2 (S. 35 u. 117) zeigen die Erhöhung der gemessenen Parameter zu jeder Infusionsdauer. In allen Gefäßen konnte die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe schon durch eine fünfminütige Adenosininfusion gesteigert werden, die aber nur in der A. posterior signifikant war. Unabhängig von einer längeren Infusionsdauer und einer damit verbundenen Zunahme der applizierten Stoffmenge traten in allen fünf Versuchen die maximalen Fließgeschwindigkeiten innerhalb von drei bis zehn Minuten auf, was auf eine schnelle und vollständige Belegung vorhandener Rezeptoren während dieses Zeitraumes schließen läßt. Nur in der A. posterior und der A. descendens konnte die maximale Geschwindigkeitserhöhung während der Infusion mit zunehmender Infusionsdauer verstärkt werden (Tab. 3.2, S. 34). Betrug die Infusionszeit über zehn Minuten, sank in der A. posterior die Fließgeschwindigkeit während der Erholungsphase signifikant unter die Ruhewerte ab und kann als volumenbedingter Effekt interpretiert werden.

Die Herzfrequenz war unabhängig von der Infusionsdauer um annähernd gleiche Faktoren erhöht, wobei die maximalen Steigerungen gegen Ende der Infusionen auftraten. Da die höchsten Fließgeschwindigkeiten während der Infusion erreicht worden waren, konnte die Herzfrequenz nicht der einzige Faktor sein, der für die Geschwindigkeitssteigerung verantwortlich war. Weitere mögliche Faktoren wären inotrope Effekte wie ein erhöhtes Schlagvolumen, oder die Beeinflussung der cardioarteriellen Klappen.

Für die Infusionsversuche wurde eine Infusionsdauer von 10 Minuten ausgewählt, da in dieser Zeit signifikante Effekte auftraten und maximale Fließgeschwindigkeitssteigerungen hervorgerufen werden konnten. Zudem traten in der Erholungsphase keine Volumeneffekte auf.

### *Infusionshäufigkeit*

Um eine Präparation optimal ausnutzen zu können, sollten mehrere Versuche mit einem Versuchstier möglich sein. Die Pausen in der Versuchsreihe zur Infusionsdauer, die zwischen 155 und 175 Minuten betragen, reichten für die Wiederholung eines maximalen Effektes aus. Doch wie reagiert das Herzkreislaufsystem von *Astacus leptodactylus*, wenn die Erholungsphase auf 55 Minuten reduziert wird (Abb. 3.4 und 7.3, S. 37 u. 118)? Skerrett et al. (1995) konnten an isolierten Herzen von *Procambarus clarkii* zeigen, daß bei der Herzfrequenz und der Amplitude mit wiederholter Applikation der FMRFamid-ähnlichen Peptide NF<sub>1</sub> und DF<sub>2</sub> zu jeder Zeit fast die gleichen Antworten hervorgerufen werden konnten. Die Autoren führten das auf einen Erhalt der Sensibilität des Herzens für diese Substanzen zurück. Bei *Astacus leptodactylus* zeigte sich unter kumulierter Adenosinapplikation ein ähnliches Ergebnis. Trotz einer kurzen Erholungsphase von nur 55 Minuten reagierten die Tiere bei jeder Adenosininfusion mit einer Erhöhung der Fließgeschwindigkeit und der Herzfrequenz. Das Herz war in jedem Versuch fähig, in gleicher Weise auf den Purinmetaboliten zu reagieren, wodurch bis auf die A. lateralis die gemessenen Parameter um ähnlich hohe Werte gesteigert werden konnten. Trotzdem ist die verkürzte Erholungsphase nicht ausreichend, wenn man die Geschwindigkeitsmaxima während der Infusionen in der A. descendens und der A. lateralis betrachtet. In beiden Gefäßen sank mit jedem Versuch die maximale Erhöhung, betrug sie beim ersten Versuch in der A. descendens  $84,3 \pm 45,4 \text{ mm s}^{-1}$  und in der A. lateralis  $15,0 \pm 7,1 \text{ mm s}^{-1}$ , im letzten Versuch nur noch  $79,7 \pm 50,4$  bzw.  $5,6 \pm 3,4 \text{ mm s}^{-1}$ . Bei gleichbleibender Steigerung bedeutet das ein Absinken der Ruhewerte vor Versuchsbeginn und zeugt von einer Erschöpfung des Herzkreislaufsystems. Demnach muß auf eine ausreichende Erholungsphase zwischen mehreren Versuchen geachtet werden.

### 4.1.3 Infusion der Adenylate ATP, ADP, AMP und Adenosin

#### *Effekte der infundierten Purinmetabolite*

An Untersuchungen zur Wirkung verschiedener Purinmetabolite bei Wirbeltieren zeigte Gillespie (1934), daß die Applikationen von ATP, AMP und Adenosin Effekte auf den Blutdruck als auch auf die Herzfrequenz hervorriefen. Dabei beobachtete er einen Zusammenhang zwischen der Entfernung der Phosphatgruppen und einer dadurch zunehmenden Fähigkeit, Vasodilatation und Hypotonie hervorzurufen. Die Entfernung des Phosphats vom Molekül beeinflusste nicht nur dessen Potenz, sondern auch die Art der Antwort. Vergleicht man damit die Infusionen von ATP und ADP (Abb. 3.5 A, B, S. 39) sowie von AMP und Adenosin (Abb. 3.6 C, D, S. 40) in das Hämolympsystem von *Astacus leptodactylus*, erhöhten alle Purinderivate die Herzfrequenz und die Fließgeschwindigkeit in den drei Gefäßen signifikant, jedoch war die Dauer der Wirkung unterschiedlich. Die Erhöhungen der Herz-Kreislaufparameter traten jeweils ein bis zwei Minuten nach Infusionsbeginn auf, ähnlich den Peptidinfusionen von McGaw et al. (1994a), die ebenfalls eine Minute nach Infusionsstart Effekte auf den Blutfluß beobachten konnten. Diese Angaben decken sich mit der Kreislaufzeit von *Palinurus vulgaris*, die 45 bis 110 s beträgt (Schwartzkopff 1953). Mit höherem Phosphorylierungsgrad der Adenylate wurden die Fließgeschwindigkeiten sowie die Herzfrequenz stärker gesteigert und die signifikanten Effekte hielten länger an. Aus Tab. 4.1 ist ersichtlich, daß die Herzfrequenz in allen Fällen bis zur 60. Minute signifikant erhöht blieb, aber die Differenz der maximalen Schläge gegenüber den Ruhewerten in der Reihenfolge Adenosin < AMP < ADP < ATP zunahm. Die Hämolympffließgeschwindigkeiten waren durch die ATP- und ADP-Infusionen je nach Gefäß zwischen der 30. und 60. Minute noch signifikant erhöht, wohingegen nach 22 bis 36 Minuten keine signifikanten Änderungen mehr durch die AMP- und Adenosininfusionen auftraten. Betrachtet man die Differenzen der maximalen Erhöhung, haben auch hier die höher phosphorylierten Adenylate eine stärkere Wirkung erzielt. Auffallend ist der extreme Anstieg in der A. descendens, deren Fließgeschwindigkeit um 124 (ATP) bzw. um 127 (ADP) mm s<sup>-1</sup> gesteigert werden konnte und ungefähr doppelt so hoch war wie die Erhöhung durch AMP und Adenosin.

Tab. 4.1: Vergleich der Differenzen maximaler Erhöhungen der Fließgeschwindigkeit  $\Delta_{\max} E$  [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in drei verschiedenen Gefäßen und der Herzfrequenz [bpm] sowie die Zeiten der letzten signifikanten Erhöhungen  $t_{\max} S$  [min] bedingt durch die Infusion von ATP, ADP, AMP oder Adenosin.

	ATP		ADP		AMP		Adenosin	
	$\Delta_{\max} E$ [ $\text{mm s}^{-1}$ ] [bpm]	$t_{\max} S$ [min]	$\Delta_{\max} E$ [ $\text{mm s}^{-1}$ ] [bpm]	$t_{\max} S$ [min]	$\Delta_{\max} E$ [ $\text{mm s}^{-1}$ ] [bpm]	$t_{\max} S$ [min]	$\Delta_{\max} E$ [ $\text{mm s}^{-1}$ ] [bpm]	$t_{\max} S$ [min]
A. p.	43	60	50	60	32	36	22	25
A. d.	124	51	127	60	55	23	75	24
A. l.	13	30	22	49	19	24	16	22
HF	34	60	33	60	26	60	17	60

Die Variabilität innerhalb verschiedener Tiergattungen kann auch der Grund sein, weshalb Stegen (2001) bei *Homarus americanus* durch die Infusion der gleichen Substanzen komplett gegensätzliche Effekte erzielte. In *Homarus americanus* erhöhte Adenosin die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe in der A. descendens um  $168 \text{ mm s}^{-1}$ , wohingegen AMP, ADP und ATP viel geringere Effekte in diesem Gefäß bewirkten und die Geschwindigkeit nur um  $131$ ,  $79$  und  $71 \text{ mm s}^{-1}$  steigerten (gleiche Reihenfolge). Die von Stegen (2001) mit  $4,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG gewählte Konzentration der infundierten Adenylate ist um  $1,3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG größer als in dieser Arbeit. Der Konzentrationsunterschied würde sich letztendlich nur in der maximalen Wirkung, nicht aber in den beobachteten Unterschieden widerspiegeln und ist daher als Argument zur Klärung des Unterschiedes nicht von Bedeutung. Im Gegensatz zu *Homarus americanus* führten die Infusionen von AMP und Adenosin im besser vergleichbaren amerikanischen Sumpfkrebs *Procambarus clarkii* (Engler 1996) zu ähnlichen Effekten wie bei *Astacus leptodactylus*. Die Werte von *Procambarus clarkii* für AMP und Adenosin (A.p.:  $\Delta 28/30 \text{ mm s}^{-1}$ , A.d.:  $\Delta 76/77 \text{ mm s}^{-1}$ , A.l.:  $\Delta 25/24 \text{ mm s}^{-1}$ , HF:  $\Delta 31/38 \text{ bpm}$ ) unterscheiden sich nur geringfügig voneinander und liegen im Bereich der in Tab. 4.1 aufgelisteten Differenzen für *Astacus leptodactylus*. Die Applikation verschiedener Neurohormone führte bei *Procambarus clarkii*, *Homarus americanus* und *Carcinus maenas* ebenfalls zu unterschiedlichen Reaktionen in der Herzfrequenz (Wilkins 1995) und konnte von Wilkins und Kuramoto (1998) bei *Homarus americanus* und *Panulirus japonicus* zusätzlich für den Hämolymphefluß und den Ventrikeldruck gezeigt werden. Unterstützt wird die Argumentation der Tierspezifität durch die Tatsache, daß Adenosin und AMP auch in anderen Invertebraten, wie *Octopus vulgaris*, positiv chronotrope Effekte bewirkten, wohingegen bei Vertebraten negativ chronotrope Herzreaktionen durch Adenosin bekannt sind (Agnisola et al. 1987). Die Autoren schlossen daher auf unterschiedliche Kontrollmechanismen in der Herzleistung.

### *Frage nach der Wirkungsvermittlung*

Die unterschiedlichen Effekte der Adenylate führt zur Frage nach der Vermittlung ihrer Wirkungen. Über Zelloberflächenrezeptoren, den Purinrezeptoren, werden bei Vertebraten die biologischen Effekte der Adenylate vermittelt, wobei die P1-Rezeptoren spezifisch für Adenosin und die P2-Rezeptoren spezifisch für ATP und andere Nucleotide sind (Ralevic und Burnstock 1998; Illes et al. 2000). Purinrezeptoren sind bei vielen Crustaceen vor allem als Chemorezeptoren olfaktorischer Sinneszellen bekannt, die auf externen Anhängen lokalisiert sind und zur Detektion der Nahrung dienen (Carr und Thompson 1983; Trapido-Rosenthal et al. 1989). Es konnten in *Palaemonetes pugio* P1-ähnliche Rezeptoren nachgewiesen werden (Carr und Thompson 1983) sowie eine entsprechende ecto-Nucleotidaseaktivität in den olfaktorischen Sinneszellen von *Panulirus argus* (Trapido-Rosenthal et al. 1989, 1990). Unter den Invertebraten sind die Purinrezeptoren weit verbreitet und bewirken die verschiedenartigsten Effekte, wie z.B. die Inhibierung der Herzaktion in Krabben (Walker und Holden-Dye 1989; Review von Burnstock 1996). Man kann davon ausgehen, daß in *Astacus leptodactylus* solche Rezeptoren existieren und für die Vermittlung der aufgetretenen Effekte durch die Infusion von ATP, ADP, AMP und Adenosin verantwortlich sind.

Ob nun die Nucleotide eine Reservoir für Adenosin bilden und nur dieses an P1-Rezeptoren bindet, oder ob sie über eigene P2-Rezeptoren wirken, kann hier nicht geklärt werden. Möglich wäre jedenfalls beides, denn für viele Zelltypen wird die Koexistenz von P1- und P2-Rezeptoren beschrieben (Burnstock 1989; Ralevic und Burnstock 1998). Für eine parallele Aktivierung beider Rezeptortypen spräche die weitaus stärkere Reaktion auf die ATP- und ADP-Applikation im Gegensatz zu der von AMP und Adenosin. Diese Theorie könnte auch die gegensätzlichen Ergebnisse von *Astacus leptodactylus* zu *Homarus americanus* erklären, wenn man gattungsspezifische Differenzen in der Anzahl und Lokalisation der Rezeptoren auf den Erfolgsorganen in Betracht zieht. Im Gegensatz dazu spricht für die Annahme eines Adenosinreservoirs die Tatsache, daß extrazelluläres ATP und ADP sehr schnell zu Adenosin abgebaut wird (Ralevic und Burnstock 1998) und nach Illes et al. (2000) AMP nicht als Ligand für die Rezeptoren in Frage kommt. AMP müßte demnach erst zu Adenosin abgebaut werden, um wirken zu können. Zudem toleriert der Adenosinrezeptor nur eine limitierte Masse des Liganden und akzeptiert keine geladenen Gruppen, wie z.B. die negativ geladene Phosphatgruppe (Brunns 1980). Ein weiterer Aspekt für diese Möglichkeit findet sich in der langanhaltenden, langsam abflachenden Wirkung von ATP, ADP und AMP. Die mit Infusionsende weiter im Kreislauf zirkulierenden Metabolite, werden nach und nach zu Adenosin abgebaut und binden erst dann an P1-Rezeptoren, weshalb die cardiovasculären Effekte je

nach Phosphorylierungsgrad länger andauern. Voraussetzung dafür ist eine entsprechende enzymatische Ausstattung der Hämolymphe, mit Kinasen und einer AMP-spezifischen 5'-Nucleotidase. Abbauende Enzyme müssen vorhanden sein, sonst würde Adenosin nicht abgebaut werden und dessen Wirkung nach Infusionsende länger anhalten, was die Ergebnisse jedoch widerlegen. Die enzymatische Ausstattung in Crustaceen wird unterschiedlich gesehen. Während Dingle et al. (1968) im Schwanzmuskel von *Homarus americanus* eine schwache AMP-Dehydrogenaseaktivität, jedoch keine ADA-Aktivität fanden, konnten bei *Homarus vulgaris* in verschiedenen Muskeln und im Cerebralganglion Aktivitäten der ADA und der Adenosinkinase gemessen werden, dafür keine der 5'-Nucleotidasen (Arch und Newsholme 1978). Vielleicht ist die Adenylatwirkung auch ein Gemisch der Aktivierung verschiedener Rezeptoren, so daß letztendlich beide besprochenen Möglichkeiten in Frage kommen.

#### *Mögliche Lokalisation der Rezeptoren*

Bei *Astacus leptodactylus* müssen die Purinrezeptoren zur Vermittlung der cardialen Effekte an Strukturen lokalisiert sein, die direkten Einfluß auf die Herzaktivität und die Hämolympffließgeschwindigkeit nehmen. Einerseits kann die Wirkung über Rezeptoren verlaufen, die auf dem Herzen sitzen, da biogene Amine und Peptide aus dem Pericardialorgan myocardiale Effekte in der Krabbe *Carcinus maenas* hervorriefen (Saver und Wilkens 1998).

Andererseits sind neuronale Effekte auf das Herzganglion und auf die cardioarteriellen Klappen für eine schnelle Änderung von Herzfrequenz und Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe verantwortlich (McMahon 1995a). So konnten Guirguis und Wilkens (1995) an *Homarus americanus* die schnelle Zunahme der Herzfrequenz in Abhängigkeit von der Innervierung der intakten Cardioacceleratoren zeigen. In Vertebraten sind Purinrezeptoren im Nervensystem weit verbreitet und Adenosin fungiert dort als wichtiger Neuromodulator (Ribeiro et al. 1997; Latini und Pedata 2001), wo es u.a. die Freisetzung wichtiger Neurotransmitter, wie Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin, Acetylcholin und GABA hemmt (Julien 1997). Gegen eine neuromodulatorische Rolle von Adenosin in Invertebraten sprechen sich Siebenaller und Murray (1986) aus, da sie u.a. im Nervengewebe von *Cancer magister* und *Aplysia californica* keine Bindung spezifischer A1-Rezeptorliganden feststellen konnten. In *Mytilus spec.* wurden A2-Rezeptoren gefunden, die im Pedalganglion die Transmitterfreisetzung modulierten. Die Aktivität des Suboesophagealganglions von Schnecken ließ sich durch inhibitorische A1- und durch excitatorische A2-Rezeptoren regulieren und die Stimulation von Intestinalneuronen im Hummer ging auf P2-Rezeptoren zurück (Review Burnstock 1996). Demnach könnten sich auch bei *Astacus leptodactylus* Purinrezeptoren im Bereich der cardio regulatori-

schen Nerven (Dorsalnerven) befinden, die über die infundierten Adenylate aktiviert werden und über entsprechende Neurotransmitter, Dopamin (Accelerator) oder GABA (Inhibitor) (Yazawa und Kuwasawa 1992), zu einer Innervation des Herzganglions sowie einer damit verbundenen Änderung der Herzfrequenz führen. Über die cardio regulatorischen Nerven wird auch die Freisetzung von Hormonen aus dem Pericardialorgan stimuliert, die ihrerseits das Herzganglion beeinflussen. Diese Neurohormone wirken sehr unterschiedlich: 5-HT führte z.B. in *Homarus americanus* zum stärksten chronotropen Effekt, während es in *Panulirus japonicus* die schwächste Wirkung zeigte (Wilkins und Kuramoto 1998).

Eine dritte Möglichkeit für die Lokalisation der Purinrezeptoren wären die cardioarteriellen Klappen, die sich am Eingang der Gefäße befinden und für die Regulation des Hämolympflusses zur Kontrolle des HZV zuständig sind, da sie rhythmisch kontrahieren können (McMahon und Burnett 1990; Kuramoto et al. 1995; Wilkins 1995). Sie übernehmen die Verteilung des Hämolympflusses auf die einzelnen Gefäße, denn da bis auf die A. posterior alle Arterien dünne Strukturen ohne Muskelgewebe sind, können die Gefäße selbst die Regulierung nicht steuern (von Buddenbrock-Hettersdorff 1967; Burnett 1984; Wilkins et al. 1997a). Die Kontrolle der cardioarteriellen Klappen erfolgt auf neuronaler, als auch auf hormoneller Ebene. Cardioinhibitorische Nerven führten zu einer Relaxation der Klappen und damit zu einem erhöhten Ausfluß der Hämolymphe in die A. descendens bei *Homarus americanus*. Proctolin dagegen ließ die Klappenmuskulatur kontrahieren und zeigte einen gegenteiligen Effekt (Kuramoto und Ebara 1984; Kuramoto et al. 1995).

Anhand der Ergebnisse der Infusionsversuche ist es nicht möglich, die Lokalisation der Purinrezeptoren genau zu bestimmen und die Rezeptoren selbst näher zu spezifizieren. Die Ausführungen zeigen deutlich, wie sehr neuronale und hormonelle Strukturen ineinandergreifen und die cardialen Effekte mit Sicherheit gemischter Natur sind.

#### *Zielgerichtete Verteilung der Hämolymphe*

Wie wird die Hämolymphe mit Hilfe der cardioarteriellen Klappen auf die Arterien verteilt und welchen Einfluß üben die Adenylate auf die Verteilung aus? Unter Ruhebedingungen war die Fließgeschwindigkeit in der A. descendens mit  $35 - 88 \text{ mm s}^{-1}$  am höchsten, in der A. posterior und der A. lateralis dagegen mit  $13 - 21$  bzw.  $10 - 30 \text{ mm s}^{-1}$  ungefähr  $\frac{1}{3}$  niedriger. McMahon (1995a) gibt für *Homarus americanus* das höchste prozentuale HZV von 64 % für die A. descendens und für die A. posterior den dreifach geringeren Anteil (20 %) an. In *Procambarus clarkii* fließen nur 12,3 % des HZV durch die A. posterior, durch die A. descendens 67,5 % (Reiber 1994). Die A. lateralis dagegen wird offensichtlich sehr unterschied-

lich perfundiert: In *Homarus americanus* beträgt der Anteil 1 % (McMahon 1995a), bzw. liegt die Ruhegeschwindigkeit in diesem Gefäß über der in der A. descendens (Stegen und Grieshaber 2001). Bei *Astacus leptodactylus* liegt die Fließgeschwindigkeit in Ruhe im Bereich der A. posterior (diese Arbeit).

Durch die Infusion der Adenylate erhöhte sich die Fließgeschwindigkeit in allen Arterien, wobei hier die maximale Steigerung in der A. descendens im Vergleich zu den zwei anderen Gefäße auftrat (Tab. 4.1). Über die A. descendens und die davon ventral abzweigenden Subneuralarterien werden wichtige Organstrukturen versorgt, wie ZNS, Thoracal-, Abdominalmuskulatur und Mundwerkzeuge, zu denen die für die Ventilation wichtigen Scaphognathiten gehören (Baumann 1921; Wilkens et al. 1997a). Ein erhöhter Auswurf aus dem Bulbus arteriosus in die A. descendens tritt dann auf, wenn die cardioarterielle Klappe infolge einer inhibitorisch neuronalen Stimulation relaxiert (Kuramoto et al. 1995). Die infundierten Adenylate könnten eine solche Relaxation und die damit verbundene Steigerung der Hämolympffließgeschwindigkeit hervorgerufen haben und diese nicht nur auf die positiv chronotropen Effekte zurückzuführen ist (Fedotov 2002). Eine hormonelle Beteiligung ist unsicher, da Proctolin in *Homarus americanus* zu einer Kontraktion dieser Klappe führte und das Gegenteil bewirkte (Kuramoto et al. 1995).

Vergleicht man die Wirkung der Adenylate auf die A. posterior und die A. lateralis miteinander, sind die Effekte in der A. posterior, trotz ähnlicher Fließgeschwindigkeiten in Ruhe, viel stärker als in der A. lateralis. Während die Geschwindigkeit in der A. lateralis um Werte zwischen 13 und 22 mm s<sup>-1</sup> erhöht wurde, stieg in der A. posterior die Hämolympffließgeschwindigkeit um 22 bis 50 mm s<sup>-1</sup> an. Stegen und Grieshaber (2001) konnten in *Homarus americanus* keine Steigerung der Fließgeschwindigkeit in der A. lateralis nach Adenosininfusion messen. Wie die Unterschiede bei der Adenylatinfusion zwischen *Homarus americanus* und *Astacus leptodactylus* sind auch hier tierspezifische Gründe eine mögliche Ursache. Im Gegensatz zu den Aa. laterales, die für die Versorgung der Kopfanhänge und der Exkretionsorgane zuständig sind, sorgt die A. posterior für die Perfusion der Abdominalmuskulatur, der Pleopoden, der Uropoden und des Telsons. Während der Fluchtreaktion müssen diese Körperteile verstärkt durchblutet werden. Da die A. posterior an ihrer Abzweigungsstelle vom Bulbus arteriosus keine Herzklappe besitzt (Kuramoto et al. 1995), kann die Hämolymphe bei jeder Kontraktion zuerst ungehindert in das Gefäß fließen, so daß der Blutfluß auf einem anderen Weg reguliert werden muß. Erreicht wird das durch diskontinuierliche Blöcke von Muskelzellen an der lateralen Wand der A. posterior, die das Gefäß dilatieren und kontrahieren können (Wilkens et al. 1997a). Dadurch können die infundierten A-

denylate über Rezeptoren an der A. posterior zusätzlich zu den cardialen Effekten auch auf vasculärer Ebene zur Erhöhung der Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe beigetragen haben. Des Weiteren werden die Aa. abdominales laterales, die paarweise in jedem Segment von der A. posterior abzweigen, von muskulären Klappen kontrolliert und von segmentalen Nerven innerviert (Wilkens et al. 1997a). Eine inhibitorische Stimulation dieser Klappen führt zur Relaxation und wiederum zu einer Erhöhung des Hämolympflusses (Davidson et al. 1998). Auch hier könnte über eine Beteiligung der Adenylate spekuliert werden.

#### *Die Erholungsphase*

Die infundierten Adenylate (Abb. 3.5 und 3.6, S. 39 u. 40) bewirkten langanhaltende, positiv chronotrope Effekte auf das Herz, wodurch bis zum Versuchsende die Herzfrequenz signifikant erhöht blieb. Obwohl die Herzfrequenz dauerhaft gesteigert war, sank während der Erholungsphase die Fließgeschwindigkeit in den Gefäßen ab. Worauf ist das zurückzuführen? Einerseits sicher auf ein Nachlassen der Relaxation der Klappen, die eventuell durch die abklingende Adenylatwirkung nicht mehr ausreichend innerviert werden konnten und infolgedessen die Hämolympfließgeschwindigkeit sank. Neben der gesteigerten Frequenz waren hier möglicherweise auch inotrope Effekte, die in diesen Versuchen nicht erfaßt wurden, für die Erhöhung der Fließgeschwindigkeit verantwortlich. Ein Anstieg im Schlagvolumen und in der Kontraktionskraft könnten für die Geschwindigkeitserhöhung mitverantwortlich gewesen sein. In diesem Fall würde mit anhaltender Tachycardie der Ventrikel nicht mehr ausreichend entspannen, sich dadurch das Füllungsvolumen verringern und infolgedessen das Schlagvolumen, als auch der Hämolympfluß reduzieren (Wilkens 1981; Eckert 1993). Ein weiterer Faktor wäre die Änderung des enddiastolischen Volumens, und damit auch des Schlagvolumens, das beim Hummer auf den elastischen Rückstoß in den Ligamenten zurückgeht, die sich während der Systole dehnen und während der Diastole entspannen (Rose et al. 2001). Auch die Kontraktionskraft könnte im Laufe der Erholungsphase abgenommen haben, weil neuronale und hormonelle Impulse durch die nachlassende Adenylatwirkung reduziert wurden. Abschließend können anhand der Ergebnisse nur Aussagen über chronotrope Änderungen gemacht werden, obwohl mit Sicherheit viele verschiedene Faktoren die beobachteten Effekte zusammen hervorgerufen haben werden.

#### 4.1.4 Infusion weiterer ATP-Abbauprodukte

Da die Adenylate starke Effekte auf die Herzfrequenz und die Fließgeschwindigkeit ausübten, sollte in weiteren Versuchen geklärt werden, ob die im ATP-Katabolismus auftretenden Purinmetabolite ebenfalls cardioaktiv sind. Weder die Infusion von IMP und Inosin, noch von Urat beeinflussten die gemessenen Parameter (Abb. 3.7 und 3.8, S. 42 u. 43). Nur Hypoxanthin erhöhte in dieser Arbeit die Herzfrequenz in der Erholungsphase signifikant, obwohl es laut Literatur nicht cardioaktiv ist (Gillespie 1934; Fredholm 1980). Es bestätigt sich, daß mit der Desaminierung der Purinmetabolite (AMP → IMP und Adenosin → Inosin) die Fähigkeit zur cardiovasculären Aktivität verringert wird und die Entfernung der Pentose von der Purinbase zu einem Verlust der biologischen Aktivität dieser führt (Gillespie 1934).

Inosin wird in der Literatur als nicht cardioaktiv angegeben (Fredholm 1980; Böhm 1987), jedoch gibt es Untersuchungen, bei denen Inosin in einigen Mammalia pharmakologische Effekte zeigt (Furshpan et al. 1986; Saito et al. 1993). Unabhängig davon, daß Adenosin durch die ADA innerhalb von 25 Sekunden zu Inosin abgebaut wird (Böhm 1987; Möser et al. 1989; Czytrich 1990), gehen die Effekte der Adenosininfusion (Abb. 3.6 D, S. 40) eindeutig auf das Adenosin und nicht auf das Abbauprodukt Inosin zurück. Häufig wird nicht das Adenosin als Vorläufer des Inosins gesehen, sondern IMP, das ebenfalls aus AMP entstehen kann. Schon Hochachka und Arai (1966) schlugen den Abbauweg vom AMP über IMP vor und Czytrich et al. (1989) schlossen aufgrund von Hemmstoffversuchen in *Astacus leptodactylus* auf diesen Abbauweg. Dingle et al. (1968) konnten noch *post mortem* im Schwanzmuskel von *Homarus americanus* IMP als Zwischenprodukt nachweisen. Wahrscheinlich wird AMP unter normoxischen Bedingungen zu IMP und Inosin abgebaut (Deussen et al. 1999). Treten jedoch Sauerstoffmangelsituationen auf, die eine Aktivierung des Herzkreislaufs erfordern, verläuft der Weg vom AMP zum Inosin über Adenosin. IMP ist eher im Rahmen der *de novo*-Purinsynthese bedeutsam, da sie über dieses Purinderivat verläuft. Die Meinungen zur *de novo*-Synthese in Crustaceen gehen auseinander: Während sie einerseits in vielen Crustaceen vorkommen soll (Linton und Greenaway 1998), bezweifeln andere Autoren diese Möglichkeit (Lallier 1993).

Urat, das primäre Endprodukt des ATP-Katabolismus, zeigte wie die Vorläufersubstanzen ebenfalls keine cardioaktivierende Reaktionen. Die Rolle des Urats ist eher auf die Änderung der sauerstoffbindenden Eigenschaften der respiratorischen Pigmente beschränkt, wie sie von vielen Autoren beschrieben wird (s. Einleitung).

## 4.2 Die Auswirkung einer biotopbedingten Hypoxie auf Herzkreislauf und Purinkonzentrationen von *Astacus leptodactylus*

### 4.2.1 Effekte einer mangelnden Sauerstoffversorgung und gleichzeitiger Adenosininfusion auf den Herzkreislauf

Anpassung oder Regulation des Sauerstoffverbrauchs – zwei mögliche Mechanismen, die bei solchen Tieren vorkommen, deren Habitat von einem Wechsel des Sauerstoffpartialdrucks gekennzeichnet ist. Bei Erniedrigung des Sauerstoffgehaltes kann ein Oxyregulierer während moderater Hypoxie durch physiologische Adaptationen seinen Sauerstoffverbrauch bis zu einem kritischen Sauerstoffpartialdruck ( $P_C$ ) aufrechterhalten, wohingegen ein Oxykonformer seinen Sauerstoffverbrauch in Abhängigkeit vom  $PO_2$  der Umgebung reduziert (Grieshaber et al. 1992). Viele decapode Crustaceen sind gegenüber Hypoxien häufig sehr tolerant und können ihren Sauerstoffverbrauch je nach Sauerstoffgehalt im Wasser regulieren (McMahon 2001). Allerdings geht ihnen als Oxyregulierer (McMahon et al. 1974; Bojsen et al. 1999) diese Fähigkeit ab einem kritischen Sauerstoffpartialdruck verloren, der je nach Literatur mit 4 kPa (McMahon et al. 1974), 5,33 kPa (Wheatly und Taylor 1981; Reiber und McMahon 1998), 8 kPa (Taylor 1976) und 10,66 kPa (Taylor 1976; de Fur und Mangum 1979) unterschiedlich angegeben wird. Unterhalb dieses Druckes kann der benötigte Sauerstoff nicht in dem Maße geliefert werden, um den aeroben Metabolismus weiterzuführen. Daher besitzen manche Crustaceen die Möglichkeit, unter strenger Hypoxie zum anaeroben Metabolismus zu wechseln, infolgedessen sie Lactat in der Hämolymphe akkumulieren (Wheatly und Taylor 1981; Zeis und Grieshaber 1993). Die Absenkung des  $PO_2$  unter den  $P_C$  wird nicht nur durch die Änderung des Stoffwechsels signalisiert, sondern auch durch die verschärfte Abnahme der Ventilationsrate und der Herzfrequenz (McMahon 2001). So kehrt sich die primär bei akuter Hypoxie auftretende Hyperventilation (Larimer 1962; Taylor 1976, 1988) in eine Hypoventilation um, die zusammen mit der gesteigerten Bradycardie in dieser Situation zur Energieerhaltung beiträgt (Taylor 1988; McGaw und McMahon 2003).

*Astacus leptodactylus* reagierte auf eine schnell eintretende, extrem hypoxische Situation mit einer sofortigen Abnahme der Herzfrequenz (Abb. 3.12, S. 50), bei der innerhalb von 10 Minuten der Sauerstoffpartialdruck unter 4 kPa und damit unterhalb des in der Literatur angegebenen  $P_C$  absank. Vier Minuten nach Beginn der hypoxischen Phase war die Herzfrequenz signifikant erniedrigt und lag zum Zeitpunkt  $t_{80}$  noch 53,2 bpm unter dem mittleren Ruhewert. Ob die schnelle Änderung der Herzfrequenz mit Sauerstoffrezeptoren im Bereich der Kiemen und Branchiocardialvenen in Zusammenhang steht und neuronal vermittelt wird (Ishii et al. 1989; Reiber 1995; McMahon 2001), oder ob es ein direkter Effekt auf den Meta-

bolismus des Herzens ist, der die Energieversorgung des Herzmuskels selbst beeinflusst (Larimer 1962), wie die unter Hypoxie hervorgerufene Bradycardie isolierter Crustaceenherzen gedeutet wird (Wilkens 1993; Wilkens et al. 1996), ist noch nicht gänzlich geklärt (McMahon 2001). Die rechte Seite der Abb. 4.1 zeigt in Ausschnitten die Originalaufzeichnung der Messung der Hämolympffließgeschwindigkeit in der A. descendens von *Astacus leptodactylus* zu verschiedenen Zeitpunkten vor und während der Begasung mit Stickstoff. Anhand der abnehmenden Signalanzahl ist die schnelle Abnahme der Herzfrequenz von normoxischen (Abb. 4.1 rechts: a) zu hypoxischen Bedingungen (Abb. 4.1 rechts: c) zu sehen. Daß die Herzfrequenz auch nach 120 Minuten starker Hypoxie während der Reoxigenierung innerhalb kürzester Zeit wieder anstieg (Abb. 4.2 rechts: a-c) und die Frequenzen der Ausgangssituation erreichte (Abb. 3.12, S. 50), verdeutlicht eine enge Kopplung der Hämolympfoxigenierung mit dem Anstieg der Herzaktivität (Reiber 1997).

Infolge einer Bradycardie muß es nicht unweigerlich zu einer Blutflußerniedrigung kommen, da es möglich ist, durch eine Erhöhung des Schlagvolumens die verlangsamte Herzfrequenz zu kompensieren, um so das HZV aufrechtzuerhalten (Wheatly und Taylor 1981; Harper und Reiber 1999). Dabei vergrößert sich das Schlagvolumen durch die Steigerung des enddiastolischen Volumens aufgrund einer erhöhten passiven diastolischen Füllungszeit des Herzens (McMahon und Wilkens 1975). Reiber und McMahon (1998) beschrieben diese Kompensation für *Procambarus clarkii* und *Homarus americanus* als gewöhnlichen Mechanismus decapoder Crustaceen, bei denen Herzfrequenz und Schlagvolumen separat kontrolliert werden (McMahon 2001). Auch bei *Astacus leptodactylus* sank die Fließgeschwindigkeit in den drei Gefäßen während der hypoxischen Phase trotz eingetretener Bradycardie nur geringfügig ab (Abb. 3.12, S. 50) und war in der A. descendens erst 61 Minuten nach Versuchsbeginn signifikant erniedrigt. Obwohl in diesem Versuch nur die chronotropen Effekte anhand der Signalanzahl direkt ermittelt werden konnten, ist es möglich, über die Signalamplitude auf inotrope Reaktionen rückzuschließen (McMahon und Wilkens 1975; Skerrett 1995). Während bei Normoxie die Signalamplituden der A. descendens (Abb. 4.1 rechts: a) maximal 1,5 V erreichten, stiegen die Amplituden in der hypoxischen Phase zum Zeitpunkt  $t_{40}$  auf 2,5 V (Abb. 4.1 rechts: c). Schließt man daraus auf eine Erhöhung des Schlagvolumens, würde das die geringe Abnahme der Hämolympffließgeschwindigkeit trotz verminderter Herzfrequenz erklären. Da sich die Höhe der Amplituden in den Gefäßen (Abb. 4.1 links) zwischen  $t_{40}$  und  $t_{80}$  wieder verringerten, war es *Astacus leptodactylus* bei andauernder Hypoxie nicht möglich, das Schlagvolumen über einen längeren Zeitraum zu erhöhen, um die niedrige Herzfrequenz zu kompensieren.

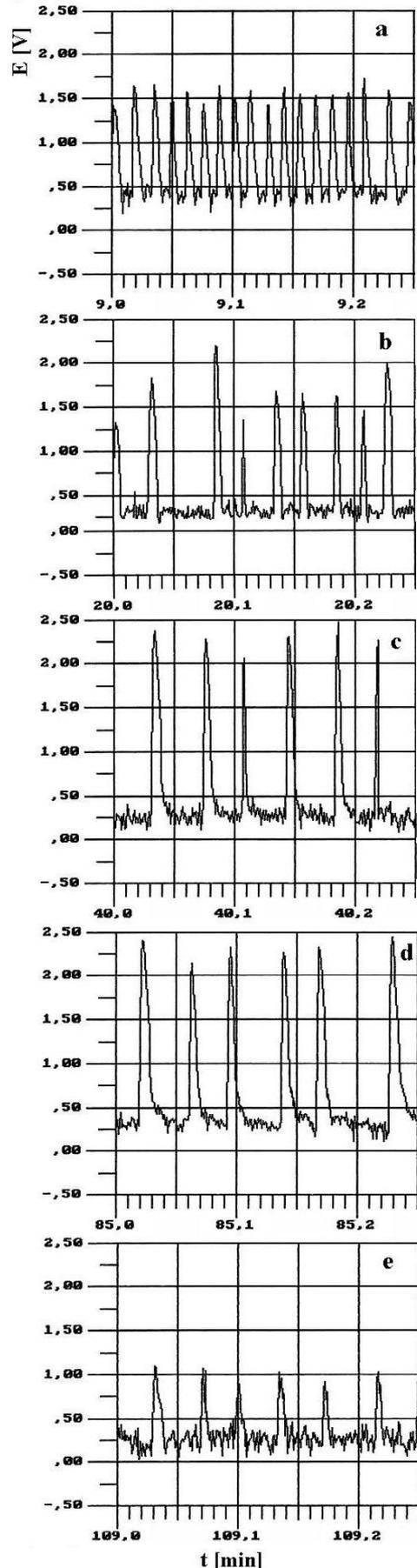
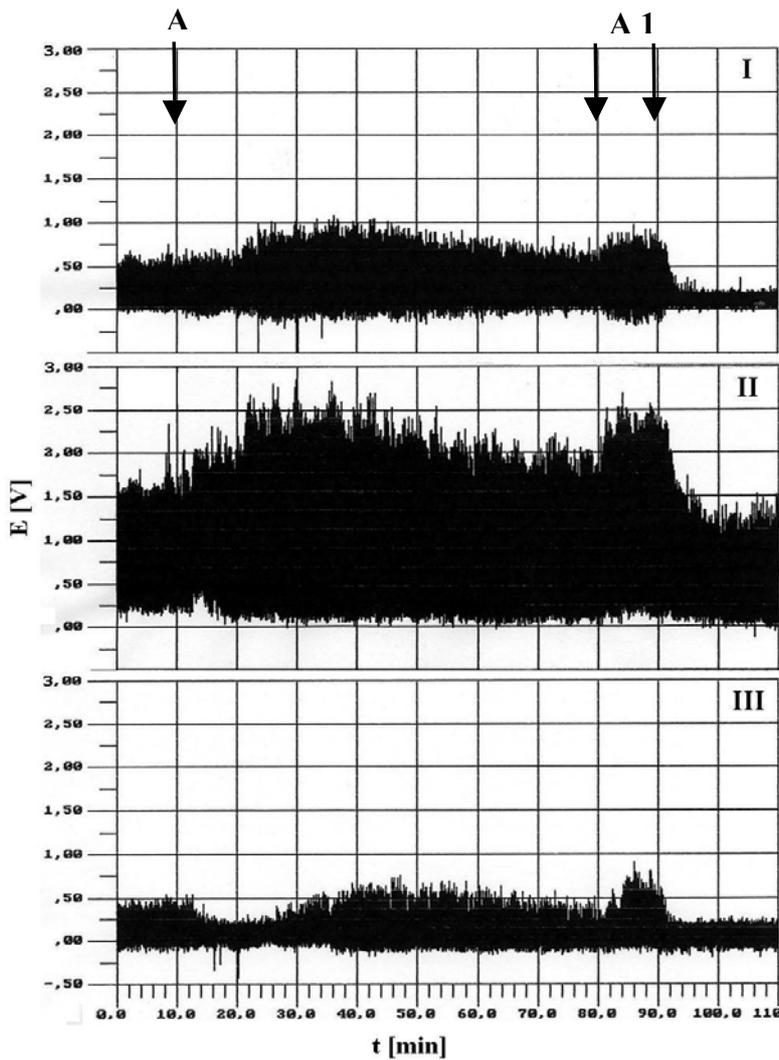


Abb. 4.1: Originalaufzeichnung der Messung der Hämolympffließgeschwindigkeit  $E$  [V] in einem einzelnen Krebs mit Hilfe der Pulsed-Doppler-Flowmetrie.

Links: Hämolympffließgeschwindigkeit  $E$  [V] in der A. posterior (I), der A. descendens (II) und der A. lateralis (III) über einen Zeitraum von 110 Minuten ( $t_0 - t_{110}$ ). Start der Stickstoffbegasung (A) nach 10 Minuten Vorlauf (Normoxie). Infusion von Adenosin (A1) unter hypoxischen Bedingungen ( $PO_2 < 4$  kPa).

Rechts: Ausschnitte der Hämolympffließgeschwindigkeit  $E$  [V] in der A. descendens (II) über jeweils 0,25 Minuten zu verschiedenen Zeitpunkten des gesamten Versuches.

- a: normoxischer Vorlauf
- b: 10 min Hypoxie,  $PO_2 < 4$  kPa
- c: 30 min Hypoxie,  $PO_2 < 4$  kPa
- d: 75 min Hypoxie,  $PO_2 < 4$  kPa, 5 min Adenosininfusion ( $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$ )
- e: 99 min Hypoxie,  $PO_2 < 4$  kPa, 19 min nach Ende der Adenosininfusion

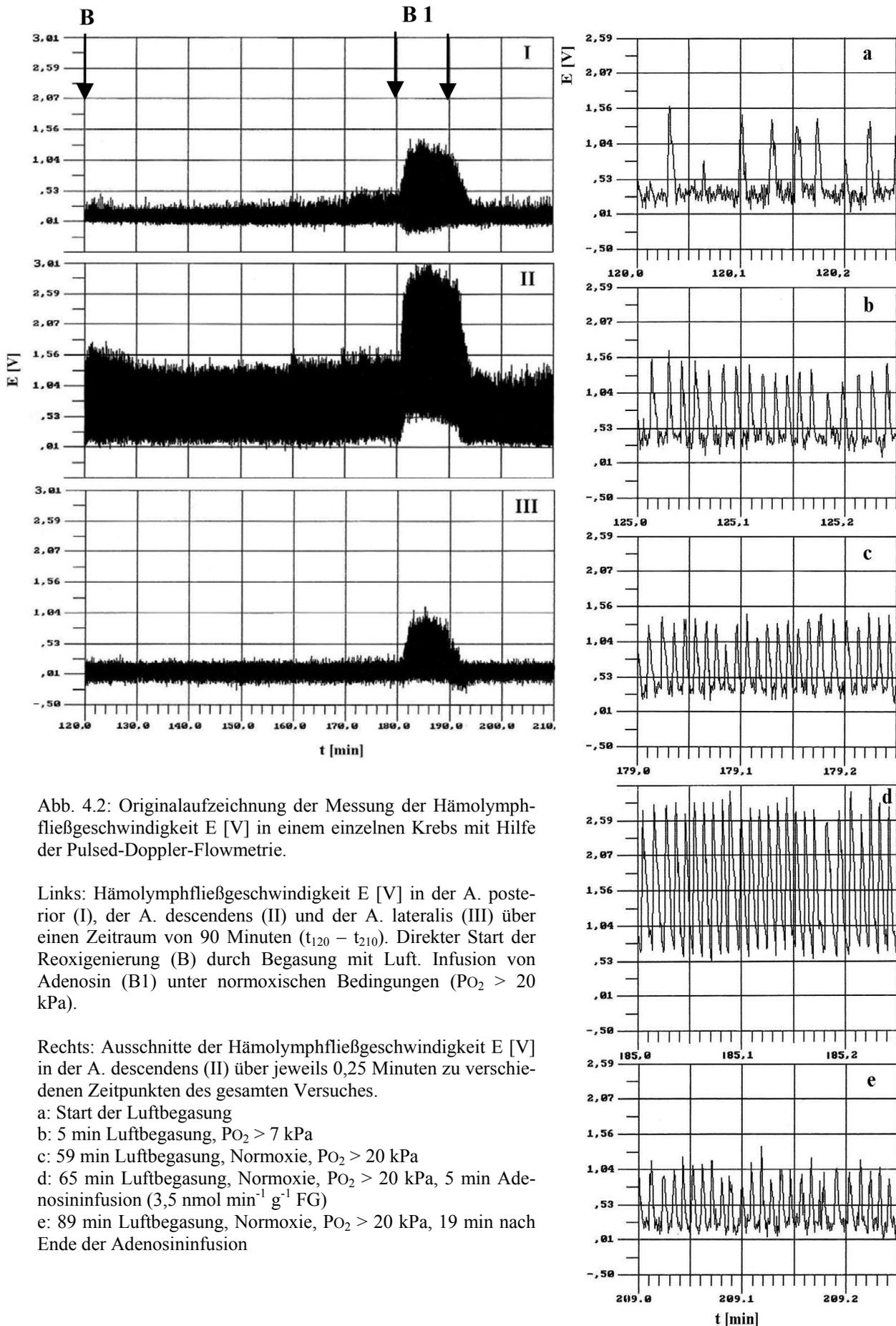


Abb. 4.2: Originalaufzeichnung der Messung der Hämolympffließgeschwindigkeit  $E$  [V] in einem einzelnen Krebs mit Hilfe der Pulsed-Doppler-Flowmetrie.

Links: Hämolympffließgeschwindigkeit  $E$  [V] in der A. posterior (I), der A. descendens (II) und der A. lateralis (III) über einen Zeitraum von 90 Minuten ( $t_{120} - t_{210}$ ). Direkter Start der Reoxigenierung (B) durch Begasung mit Luft. Infusion von Adenosin (B1) unter normoxischen Bedingungen ( $PO_2 > 20$  kPa).

Rechts: Ausschnitte der Hämolympffließgeschwindigkeit  $E$  [V] in der A. descendens (II) über jeweils 0,25 Minuten zu verschiedenen Zeitpunkten des gesamten Versuches.

a: Start der Luftbegasung

b: 5 min Luftbegasung,  $PO_2 > 7$  kPa

c: 59 min Luftbegasung, Normoxie,  $PO_2 > 20$  kPa

d: 65 min Luftbegasung, Normoxie,  $PO_2 > 20$  kPa, 5 min Adenosininfusion ( $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$ )

e: 89 min Luftbegasung, Normoxie,  $PO_2 > 20$  kPa, 19 min nach Ende der Adenosininfusion

Auch bei *Procambarus clarkii* nahmen Herzfrequenz und Schlagvolumen während schwerer Hypoxie ab (Reiber und McMahon 1998). Ein großes Schlagvolumen erfordert eine entsprechende Kontraktionskraft des Herzens, wofür bei anhaltender Hypoxie nicht genügend Energie zur Verfügung steht. Bei sinkendem PO<sub>2</sub> nimmt zusätzlich der Widerstand in der Peripherie und in den Gefäßen zu, wodurch das Schlagvolumen reduziert wird (Reiber und McMahon 1998). Sobald im Außenmedium von *Astacus leptodactylus* der PO<sub>2</sub> erhöht wurde, verringerte sich das Schlagvolumen (kleiner werdende Amplitude) zugunsten einer ansteigenden Herzfrequenz (Abb. 4.2 rechts: a-c). Neben den cardialen Effekten führte die Inkubation bei niedrigem PO<sub>2</sub> auch zu einer Umverteilung der Hämolymphe mit Hilfe der cardioarteriellen Klappen (McGaw et al. 1994b; Reiber und McMahon 1998). Zu Beginn der hypoxischen Phase veränderten sich die Amplituden der Signale in den Arterien unterschiedlich (Abb. 4.1 links). Während sie in der A. descendens sofort und in der A. posterior erst mit Erreichen des P<sub>C</sub> anstiegen, verkleinerten sich die Signalamplituden in der A. lateralis im Zeitraum t<sub>10</sub>-t<sub>30</sub>. So wurde verstärkt Hämolymphe in die A. descendens und die davon abzweigende rostrale A. subneuralis ausgeworfen, wodurch wichtige Gewebe wie Kiemen und ZNS mit Sauerstoff versorgt werden konnten.

Im Gegensatz zu den Infusionsexperimenten (Abb. 3.6 D, S. 40) ließen sich unter Sauerstoffmangel (Abb. 3.12 A, S. 50) die cardiovasculären Parameter durch die Applikation von Adenosin nicht im gleichen Maße erhöhen: Während die Herzfrequenz durch das Adenosin unbeeinflusst blieb, stieg die Fließgeschwindigkeit nur in der A. descendens signifikant gegenüber den normoxischen Werten an. Abb. 4.1 zeigt eine adenosininduzierte Vergrößerung der Signalamplituden in allen Gefäßen (t<sub>80</sub>-t<sub>90</sub>) gegenüber den vorherigen Minuten, was wahrscheinlich auf ein vergrößertes Schlagvolumen zurückzuführen ist. Durch dieses wurde überwiegend die Perfusion der A. descendens erhöht, da die Geschwindigkeiten in der A. posterior und der A. lateralis unbeeinflusst blieben. Nach der Reoxigenierung traten durch eine erneute Infusion von 3,5 nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> FG Adenosin die bekannten, aktivierenden Effekte auf den Herzkreislauf auf (Abb. 3.12. B, S. 50 u. Abb. 4.2). Da im Vergleich mit den Infusionsexperimenten die Fließgeschwindigkeiten in den Gefäßen und die Herzfrequenz wieder um ähnliche Werte erhöht wurden (Tab. 3.4, S. 52), kann unter Sauerstoffmangel von einer hypoxiebedingten Herabsetzung der Adenosinwirkung ausgegangen werden. Es ist nicht bekannt, welche Faktoren für diesen Effekt verantwortlich sind. Möglich wäre, daß aufgrund einer Reduktion des Metabolismus die Aktivierung des Herzkreislaufs durch Adenosin verhindert wird, weil sie mit einem gesteigerten Sauerstoff- und Energieverbrauch einhergehen würde und somit einen kontraproduktiven Effekt besäße. Einerseits ist vielleicht die Wirkungsvermitt-

lung von Adenosin über die entsprechenden Rezeptoren vermindert, andererseits könnte die ADA unter Sauerstoffmangel aktiver sein und das infundierte Adenosin schneller abbauen. Für die letztere Möglichkeit spräche die Untersuchung von Bandyopadhyay und Poddar (1994), die in Rattenmilz und -thymus eine Aktivitätserhöhung der ADA durch Koffein zeigen konnten. Wenn Xanthinderivate wie Koffein und Urat die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins erhöhen (Menze et al. 2000), warum sollte es rein spekulativ nicht möglich sein, daß ein weiteres Adenosinabbauprodukt positiv auf die ADA-Aktivität wirkt, wie es Koffein vermochte? Das Purinderivat könnte entweder während der hypoxischen Inkubation akkumuliert, oder direkt als Abbauprodukt des infundierten Adenosins entstanden sein. Inosin und Hypoxanthin beeinflussen zwar die ADA-Aktivität im Hund, allerdings erst ab einer Konzentration, die über 100  $\mu\text{M}$  liegt (Saito et al. 1993). Vielleicht sind noch ganz andere, unbekannte Faktoren an der Aktivierung oder auch Inhibierung des Enzyms beteiligt, deren Konzentration sich während einer Hypoxie verändert (Collinson et al. 1987).

#### 4.2.2 Effekte einer mangelnden Sauerstoffversorgung auf die Verteilung der Purinderivate in Hämolymphe und Gewebe

##### 4.2.2.1 Konzentrationen in der Hämolymphe

###### *Biotopbedingte Hypoxie über einen Zeitraum von vier Stunden*

Wenn infundiertes Adenosin im Gegensatz zu normoxischen Bedingungen unter Hypoxie keine Veränderung der cardiovasculären Parameter induzieren konnte, stellt sich hier die Frage, ob es bei mangelnder Sauerstoffversorgung des Organismus überhaupt von physiologischer Bedeutung ist. In der Literatur geht man davon aus, daß sich die Adenosinkonzentration in Abhängigkeit von einer abnehmenden Energieladung (Formel (4.1)) erhöht, was entweder durch einen verstärkten ATP-Abbau oder durch eine Abnahme der ATP-Syntheserate aufgrund von Sauerstoffmangel bedingt ist (Bruns 1990).

$$\text{Energieladung} = \frac{(ATP + 0,5 ADP)}{(ATP + ADP + AMP)} \quad (4.1)$$

Durch die Bestimmung der Purinderivatkonzentrationen in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* sollte es möglich sein, die Bedeutung des Adenosins zu spezifizieren. Innerhalb von vier Stunden extremer Hypoxie ( $\text{PO}_2 < 2,67 \text{ kPa}$ ) variierten die Adenosinkonzentrationen zwischen  $6 \pm 9$  und  $31 \pm 45 \text{ nmol L}^{-1}$ , die sich nicht statistisch signifikant von den normoxischen Werten ( $14 \pm 3$  bis  $19 \pm 8 \text{ nmol L}^{-1}$ ) unterschieden (Abb. 3.9 u. 3.13 A, S. 45 u. 53). Auch im Inosin spiegelte sich kein erhöhter Adenosinabbau wider. Im Vergleich

mit den Kreislaufparametern unter Hypoxie (Abb. 3.12, S. 50) kann die niedrige Adenosinkonzentration in der Hämolymphe nicht die Ursache für die schnelle Absenkung der Herzfrequenz innerhalb von Minuten gewesen sein. Die Bradycardie ist vielmehr eine physiologische Antwort auf die Registrierung der erniedrigten Sauerstoffspannung, die mit einer gekoppelten neuronalen Reaktion von Ventilation und Herzfrequenz über ein Konnektiv im circumoesophagealen Ganglion (Schlundkonnektiv) zusammenhängt (Wilkens et al. 1974). Die Inosinkonzentration betrug innerhalb der vier Stunden maximal  $14 \pm 5 \mu\text{mol L}^{-1}$  und lag damit weit unterhalb der Konzentration, die Saito et al. (1993) für die Aktivierung der ADA-Aktivität im Hund messen konnten. Inosin steigert wahrscheinlich nicht die Aktivität der ADA und ist demnach nicht für die stark reduzierte Adenosinwirkung nach 70 Minuten Hypoxie verantwortlich, wie unter 4.2.1 vermutet wurde. Interessanterweise akkumulierte in der Hämolymphe in den 4 Stunden auch kein Urat, dessen Konzentrationen maximal  $148 \pm 47 \mu\text{mol L}^{-1}$  betrug und nur  $8 \mu\text{mol L}^{-1}$  über der höchsten Konzentration der normoxischen Messung lag (Abb. 3.13 A, S. 53). Die hohen normoxischen Uratkonzentrationen konnten durch Bestimmung dieser unter hyperoxischer Inkubation der Tiere (Abb. 3.11, S. 47) als physiologisch bewertet werden. Da Urat nicht akkumulierte, könnte es einerseits ein Hinweis darauf sein, daß innerhalb dieser vier Stunden der Uricase noch genügend Sauerstoff zur Verfügung stand, um Urat zum Allantoin zu oxidieren. Andererseits führte die vierstündige Inkubation unter extremer Hypoxie in *Astacus leptodactylus* eventuell noch nicht zu einer verminderten Bereitstellung von ATP und einer damit verbundenen Abnahme der Energieladung, weshalb auch die Adenosin- und Inosinkonzentrationen nicht angestiegen waren.

#### *Biotopbedingte Hypoxie über einen Zeitraum von 20 Stunden*

Vielleicht waren vier Stunden hypoxische Inkubation nicht ausreichend, um Effekte in den Hämolymphekonzentrationen erkennen zu können. Deshalb wurde ein äquivalentes Experiment über 20 Stunden Hypoxie durchgeführt, das ein deutlich anderes Ergebnis aufweist (Abb. 3.13 B, S. 53). Obwohl Adenosin in Konzentrationen normoxischer Bereiche gemessen wurde, kann man anhand der angestiegenen Inosinkonzentration (von  $8 \pm 4$  auf  $35 \pm 4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) und der signifikant erhöhten Uratkonzentration (von  $92 \pm 46$  auf  $388 \pm 156 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) davon ausgehen, daß *Astacus leptodactylus* über diesen Zeitraum eine interne Hypoxie entwickelt hatte und weniger ATP bereitgestellt wurde. Den Zusammenhang zwischen interner Hypoxie und der Akkumulation von Urat konnte bei *Carcinus maenas* (Lallier et al. 1987; Durand und Regnault 1998) und *Necora puber* (Durand und Regnault 1998) gezeigt werden. Die Entstehung des Inosins aus Adenosin oder IMP kann anhand dieser Versuche nicht ge-

klärt werden. Sollte Adenosin der Vorläufer sein, müßte die ADA extrem aktiv sein, um die Adenosinkonzentration im normoxischen Bereich halten zu können. Sehr spekulativ ist an dieser Stelle die Existenz von ADA-Isoenzymen bei *Astacus leptodactylus*, die Niedzwicki et al. (1995) im Opossum *Didelphis virginiana* mit sehr unterschiedlichen Aktivitäten fanden. Solche Isoenzyme könnten sich z.B. in ihrer Wirkung in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration unterscheiden. Trotzdem sprechen Fakten für den Weg vom AMP über das IMP zum Inosin. Czytrich (1990) postulierte für *Astacus leptodactylus* den Weg über IMP, da durch die Hemmung der AMP-DA mittels Coformycin Urat in geringem Maße akkumuliert wurde, wohingegen die Hemmung der ADA durch EHNA zu keiner Akkumulation der Purinderivate führte. Die Erhöhung der Inosinkonzentration in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus*, unabhängig vom Entstehungsweg, ist durch eine sehr lange Halbwertszeit von 114 Minuten (Czytrich 1990) gekennzeichnet, weshalb man davon ausgehen muß, daß die XDH als abbauendes Enzym eine niedrige Aktivität besitzt. Die Enzymaktivität der XDH in Geweben von *Carcinus maenas* war während biotopbedingter Hypoxie im Vergleich zur Uricase sehr viel geringer (Dykens 1991). Nach Dykens und Shick (1988) besteht die Rolle der XDH während einer Hypoxie in der Steigerung der Uratkonzentration, die zur Erhöhung der Sauerstoffbeladung des Hämocyanins beiträgt und sehen diesbezüglich das Urat als metabolische Konsequenz bei Crustaceen in dieser Situation.

Innerhalb von 12 Stunden hypoxischer Inkubation akkumulierten  $369 \pm 42 \mu\text{mol L}^{-1}$  Urat in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus*, das nach 20 Stunden auf knapp  $400 \mu\text{mol L}^{-1}$  angestiegen war (Tab. 4.2). In Bereich dieser Konzentration wird der Sättigungswert von Urat in der Hämolymphe erreicht worden sein. Czytrich (1990) konnte über einen Zeitraum von 24 Stunden ähnlich hohe Werte in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* ermitteln, wohingegen in *Carcinus maenas* (Lallier et al. 1987) fast  $\frac{1}{3}$  weniger Urat akkumulierte. Allerdings betrug die Akkumulationsrate in *Carcinus maenas* unter Luftexposition nur  $0,72 \mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$  (Durand und Regnault 1998). Die Autoren gehen davon aus, daß *Carcinus maenas* unter diesen Bedingungen in der Lage war, seinen Stickstoffmetabolismus zu regulieren und erst sehr spät eine geringe interne Hypoxie entwickelte. *Carcinus maenas* greift anscheinend nicht auf einen anaeroben Metabolismus zurück (geringfügige Lactatproduktion) und richtet seine metabolische Rate nach der Sauerstoffverfügbarkeit aus. Bei *Astacus leptodactylus* dagegen erhöhte sich nicht nur die Uratkonzentration in der Hämolymphe, sondern in dieser akkumulierte über einen Zeitraum von 36 Stunden die 50fach höhere Lactatmenge (Czytrich 1990). Das weist auf einen anaeroben Metabolismus bei *Astacus leptodactylus* unter extrem hypoxischen Bedingungen hin.

Tab. 4.2: Uratkonzentration [ $\mu\text{mol L}^{-1}$ ] in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* und *Carcinus maenas* während hypoxischer Inkubation ( $\text{PO}_2 \leq 2,67 \text{ kPa}$ ) über maximal 24 h und 15 bzw. 20 °C.  $X \pm \text{SD}$  nach drei verschiedenen Autoren.

t [h]	<i>Astacus leptodactylus</i>	<i>Astacus leptodactylus</i>	<i>Carcinus maenas</i>
	20 °C < 2,67 kPa	15 °C 1,33 kPa	15 °C $\leq 2,67 \text{ kPa}$
0	106 ± 28	57 ± 29	79 ± 16 *
4	180 ± 28	116 ± 46	
6			185 ± 22
8	261 ± 48	160 ± 62	
12	369 ± 42	221 ± 53	113 ± 25
16	332 ± 102	272 ± 67	
20	388 ± 156	315 ± 68	
24		358 ± 75	140 ± 18
	diese Arbeit	Czytrich 1990	Lallier et al. 1987

\* Mittelwert der drei Kontrollen zu den verschiedenen Meßzeiten

#### *Die Uratakkumulation über 48 Stunden in Abhängigkeit vom $\text{PO}_2$*

Die Uratakkumulation in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* unter extrem hypoxischen Bedingungen sollte zusätzlich auf ihre Sauerstoffabhängigkeit untersucht werden. Da die Uricase aufgrund des fehlenden Sauerstoffs Urat nicht oxidieren kann (Dykens 1991) und demzufolge als Sauerstoffsensor funktioniert (Vetter und Grieshaber 1989), ist die Akkumulation des Urats als Folge des Sauerstoffmangels ein guter Indikator zur Untersuchung der  $\text{PO}_2$ -Abhängigkeit. Die Abhängigkeit ist gegeben, da die Ergebnisse der Abb. 3.14 (S. 55) eine deutliche Zunahme der Uratkonzentration in Abhängigkeit vom abnehmenden Sauerstoffpartialdruck zeigen. Dabei erwies sich  $13,6 \pm 1,1 \text{ kPa}$  als indifferenter Druck, bei dem die Uratkonzentration über 48 Stunden nicht zunahm. In diesem Zeitraum war es *Astacus leptodactylus* vermutlich möglich, trotz erniedrigtem  $\text{PO}_2$ , einen aeroben Metabolismus aufrechtzuerhalten, indem er seinen Stoffwechsel regulierte. Von dieser Annahme kann man ausgehen, da unter gleichem Partialdruck *Austropotamobius pallipes* den Sauerstoffverbrauch und verschiedene physiologische Funktionen konstant halten konnte (Wheatly und Taylor 1981). Erst ab einem kritischen  $\text{PO}_2$  zwischen 5,33 und 6,67 kPa beschrieben die Autoren eine Abnahme der gemessenen Parameter und interpretierten die zu diesem Zeitpunkt beginnende Akkumulation von Lactat als Zeichen für den Wechsel zum anaeroben Metabolismus. Auch wenn bei einem  $\text{PO}_2$  von  $6,9 \pm 0,5 \text{ kPa}$  bei *Astacus leptodactylus* keine signifikant unterschiedlichen Uratkonzentrationen gemessen werden konnten, erhöhten sich diese nach 40 Stunden um Faktor zwei gegenüber der Ausgangskonzentration von  $153 \pm 47 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Wahrscheinlich war bei *Astacus leptodactylus* hier der kritische  $\text{PO}_2$  erreicht, ab dem der Me-

tabolismus umschwenkte. Deutlich wird das bei weiter abfallenden Sauerstoffpartialdrücken, da innerhalb von 32 Stunden über  $550 \mu\text{mol L}^{-1}$  Urat akkumulierte und die Mortalitätsrate der Versuchstiere zunahm. Demzufolge konnten bei  $2,4 \pm 0,8 \text{ kPa}$  und  $1,1 \pm 0, \text{ kPa}$  teilweise nur noch Einzelmessungen durchgeführt werden. Die Abhängigkeit der Uratakkumulation vom  $\text{PO}_2$  spiegelt sich deutlich beim Vergleich der Akkumulationsraten in Tab. 4.3 wider. Jede Halbierung des Sauerstoffpartialdrucks führte annähernd zu einer Verdopplung der Akkumulationsrate. Die unterschiedliche Fitness der verwendeten Tiere wird die abweichenden Raten von  $9,60$  und  $22,0 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  in den zwei Versuchen bei  $1,1 \pm 0,3 \text{ kPa}$  hervorgerufen haben.

Tab. 4.3: Rate der Uratakkumulation [ $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ] in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* in Abhängigkeit von unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken [kPa]. (\*  $22,0 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  sind aus dem 20h Versuch in Abb. 3.13, S. 53)

$\text{PO}_2$ [kPa]	Rate der Uratakkumulation [ $\mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ]
$13,6 \pm 1,1$	-0,46
$6,9 \pm 0,5$	2,79
$3,6 \pm 0,7$	5,61
$2,4 \pm 0,8$	12,34
$1,1 \pm 0,3$	9,60 bzw. 22,0*

#### 4.2.2.2 Konzentrationen in verschiedenen Geweben

Um ein einheitliches Bild von der Verteilung der Purinmetabolite unter hypoxischen Bedingungen zu erhalten, wurden die Konzentrationen von Adenosin, Inosin und Urat bei einem  $\text{PO}_2 \leq 3,73 \text{ kPa}$  über 24 Stunden in verschiedenen Geweben gemessen (Abb. 3.15, S. 57). Insgesamt sind die Purinderivate im Gewebe gegenüber der Hämolymphe in umgekehrten Verhältnissen konzentriert. So lag zum einen die Adenosinkonzentration der Kontrollen je nach Gewebe schon 4 bis 16fach über der Konzentration in der Hämolymphe und erreichte nach 24 Stunden hypoxischer Inkubation gegenüber dieser 120fach gesteigerte Werte. Zum anderen konnte im Gewebe nach der gleichen Versuchsdauer Urat in Konzentrationen gemessen werden, die in der Hämolymphe schon nach kürzester Zeit akkumuliert worden waren. Daraus geht hervor, wie die physiologische Rolle des Urats zu beurteilen ist: Während eine hohe Gewebekonzentration keinerlei positiven Effekt nach sich ziehen würde, ist die Akkumulation in der Hämolymphe sinnvoll, denn nur dort kann Urat seine Wirkung als Modulator der Sauerstoffaffinität des Hämocyanins entfalten. So führte die Erhöhung des Hämocyaningehaltes bei *Nephrops norvegicus* unter Sauerstoffmangel zu einer vermehrten Uratbindung, die den modulierenden Effekt unterstützte (Spicer und Baden 2001). Woher stammte das in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* akkumulierte Urat? Nies (1993) konnte durch

ihre Untersuchungen zum Uratstoffwechsel im Hepatopancreas von *Homarus americanus* zeigen, daß das unter biotopbedingter Hypoxie aus Purinderivaten entstandene Urat mit Hilfe eines Austauschmechanismus aus den Hepatopancreaszellen in die Hämolymphe abgegeben wird. Der Hepatopancreas als Uratquelle ist möglich, da nach 12 Stunden Hypoxie die Konzentrationen von Adenosin, Inosin und Urat in den Muskelgeweben von *Astacus leptodactylus* nur wenig zugenommen hatten und folglich die hohen Uratkonzentrationen nicht aus dem Interstitium des Gewebes hätten ausgeschleust werden können. Zudem konnten Morris und Callaghan (1998) im Schwanzmuskels von *Cherax destructor* innerhalb von drei Stunden bei 1,3 kPa keine Änderungen im Adenylatpool messen. Nach 18 Stunden Sauerstoffmangel akkumulierte in den Muskelgeweben von *Astacus leptodactylus* verstärkt Adenosin und Inosin, was nicht zu einer äquivalenten Erhöhung der Uratkonzentration in diesen Geweben führte. Entweder wurde in diesem Zeitraum auch Urat aus dem Interstitium in die Hämolymphe ausgeschleust, oder das entstandene Inosin wurde nicht schnell genug oder gar nicht zu Urat abgebaut, was im nächsten Abschnitt diskutiert wird. Nach 24 Stunden Hypoxie lag Urat in der Hämolymphe in Konzentrationen von über  $380 \mu\text{mol L}^{-1}$  vor. Ob diese hohe Konzentration zu einer Verzögerung des Uratausstroms aus dem Hepatopancreas in die Hämolymphe führte, oder ob die Katalyserate der Uricase in den Peroxisomen des Hepatopancreas aufgrund mangelnder Sauerstoffverfügbarkeit reduziert war und infolgedessen Urat nach 24 Stunden in signifikanten Mengen in diesem Organ akkumulierte, läßt sich nicht definitiv sagen. Höchstwahrscheinlich werden beide Möglichkeiten dazu beigetragen haben.

Betrachtet man die Inosinkonzentrationen, stiegen diese im Gegensatz zum Urat nach 18 Stunden Hypoxie um ein Vielfaches gegenüber den Kontrollwerten an. Dabei akkumulierte Inosin in den Muskeln sehr viel stärker als im Hepatopancreas. In diesem wurde bei *Carcinus maenas* nach 24 Stunden Hypoxie noch eine 447fach höhere Aktivität für die XDH gefunden als im Scherenmuskel, dessen XDH-Aktivität nur  $0,04 \pm 0,02 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$  betrug (Dykens 1991). Demgegenüber stehen die viel höheren Aktivitäten der inosinbildenden Enzyme, die sauerstoffunabhängig arbeiten können. In Muskelextrakten von drei Garnelenarten betrug die Aktivität der ADA 17 bis  $435 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$  (Fijisawa und Yoshino 1987) und in *Homarus vulgaris* zwischen  $218 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$  (Schwanzmuskel) und  $290 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$  (Scherenmuskel) (Arch und Newsholme 1978). Die IMP-spezifische 5'-Nucleotidase setzte im Muskel von *Paracus japonicus* und *Neptunus trituberculosis* dagegen nur  $22 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$  IMP zu Inosin um (Fijisawa und Yoshino 1987). Inosin akkumulierte demzufolge bei biotopbedingter Hypoxie, da es schneller gebildet wurde, als es durch die langsam arbeitende XDH zu Hypoxanthin abgebaut werden konnte. Zudem konnte das

entstandene Hypoxanthin über den salvage pathway zu IMP und von dort aus über einen weiteren Zwischenschritt wieder zum AMP umgebildet werden. Auch das würde eine geringere Uratakkumulation trotz hoher Inosinkonzentrationen im Gewebe bewirken. Sollte Inosin, wie schon vorher diskutiert, über den AMP-IMP-Weg entstehen, wäre eine Produkthemmung der IMP-spezifischen 5'-Nucleotidase durch das akkumulierende Inosin nicht ausgeschlossen (Zimmermann 1992). Die Folge davon wäre eine Umleitung des AMP-Abbaus über Adenosin mit Hilfe der AMP-spezifischen 5'-Nucleotidase, die einen größeren  $K_m$ -Wert (1 - 15 mmol L<sup>-1</sup>) besitzt als das IMP-spezifische Enzym ( $K_m$ : 0,1 - 0,6 mmol L<sup>-1</sup>) und erst bei höheren AMP-Konzentrationen das Substrat umsetzt (Zimmermann 1992). Da Inosin akkumulierte, ist ein Rückstau im Sinne einer Produkthemmung auch bei der ADA nicht ausgeschlossen. Damit lassen sich die nach 24 Stunden signifikant erhöhten Adenosinkonzentrationen in den Muskelgeweben erklären, zumal das Adenosin aufgrund seiner geringen HWZ normalerweise in kürzester Zeit abgebaut wäre. Ein minimaler Ausstrom des Adenosins in die Hämolymphe oder ein verstärkter Abbau in dieser wären Möglichkeiten, weshalb nach über 20 Stunden hypoxischer Inkubation Adenosin nicht in der Hämolymphe angehäuft wurde.

Der Weg von AMP über Adenosin ist bei biotopbedingter Hypoxie möglich, aber von der Dauer des Sauerstoffmangels abhängig. In der späten Phase der biotopbedingten Hypoxie ist nicht auszuschließen, daß Adenosin mit einer Konzentration von  $1,2 \pm 1,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG, die sogar geringfügig über der Konzentration nach zwei Minuten erhöhter muskulärer Aktivität liegt, cardiovasculäre Effekte hervorruft. Diese Effekte würden zumindest bei chronischem Sauerstoffmangel die Versorgung der wichtigsten Organe, wie Kiemen und ZNS, mit Hämolymphe unterstützen. Für eine Bestätigung dieser These, müßten weitere Experimente auf Ebene des Herzkreislaufs über einen entsprechend langen Zeitraum durchgeführt werden.

### **4.3 Die Auswirkung einer funktionellen Hypoxie auf Herzkreislauf und Purinkonzentrationen von *Astacus leptodactylus***

#### **4.3.1 Effekte eines erhöhten Sauerstoffbedarfs durch muskuläre Aktivität auf den Herzkreislauf**

Die bei Flußkrebse bekannte, rückwärtsgerichtete Fluchtbewegung ist durch ein ruckartiges Einschlagen des muskulösen Abdomens gekennzeichnet (Müller 1954). Phasische Muskeln führen die schnellen Kontraktionen aus, die über einen längeren Zeitraum keine konstante Spannung ohne Ermüdungserscheinungen aufrechterhalten können. Im Gegensatz zu den tonischen Muskeln macht dieser Muskeltyp die Hauptmasse des Abdomens der Crustaceen aus (Fields 1976). Wie schnell diese Ermüdungserscheinungen bei *Astacus leptodactylus*

*dactylus* auftraten, zeigt der Versuch zur funktionellen Hypoxie, der in Abb. 4.3 am Beispiel der Messung der Hämolympffließgeschwindigkeit in der A. posterior eines Tieres dargestellt ist. In der Doppleraufzeichnung konnten die Kontraktionen während der Aktivitätsphase anhand der herausragenden Signalen erkannt und gezählt werden (Abb. 4.3 a, b). Im Detail (Abb. 4.3 b) stellen die dichtgepackten Signale gehäufte Kontraktionen in kurzen Abständen dar ( $t_{10,4}$ - $t_{10,9}$ ) und zeigen, daß die Kontraktionen nicht kontinuierlich erfolgten.

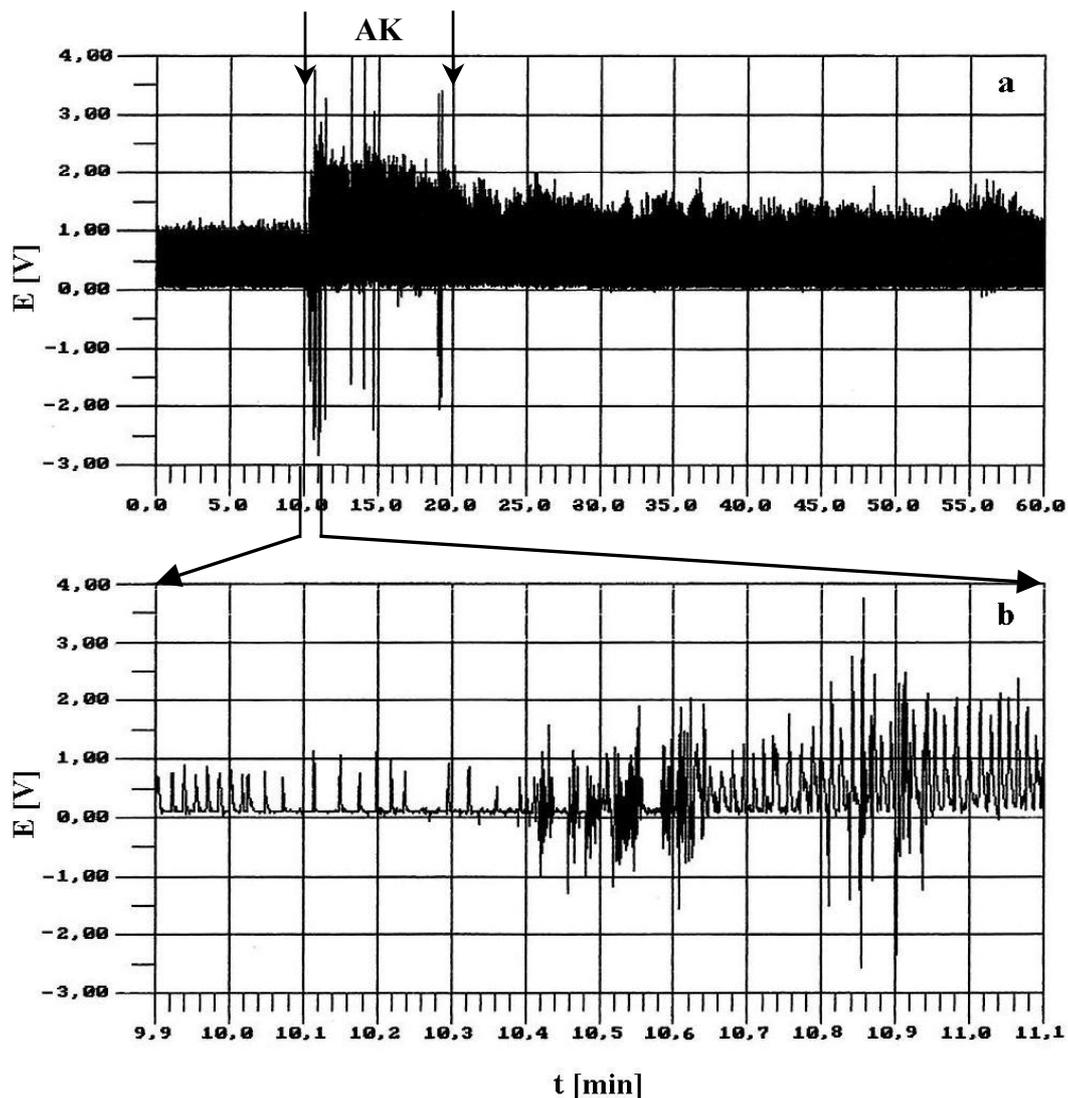


Abb. 4.3: Originalaufzeichnung der Messung der Hämolympffließgeschwindigkeit  $E$  [V] in der A. posterior eines einzelnen Krebses mit Hilfe der Pulsed-Doppler-Flowmetrie unter dem Einfluß muskulärer Aktivität (AK).

a: Gesamtversuch über 60 Minuten: nach einem zehnmütigen Vorlauf ( $t_0$ - $t_{10}$ ) wurde *Astacus leptodactylus* zu 10 Minuten Aktivität (Schwanzschlagen) animiert. Die Kontraktionen sind an den weit herausragenden Signalen zu erkennen

b: Der Ausschnitt des Gesamtversuches von  $t_{9,9}$  bis  $t_{11,1}$  zeigt den Übergang vom Vorlauf zum Beginn der Aktivitätsphase

Die Anfangsphase der Kontraktionen ist durch eine Serie schneller und kraftvoller Schwanzschläge gekennzeichnet, die bei *Cherax destructor* zwischen 15 und 30 lagen. Nachfolgende Serien an Schwanzschlägen wurden zunehmend langsamer und weniger kräftig (England und Baldwin 1983). Bei *Astacus leptodactylus* konnten bis zum Ende der Aktivitätsphase Kontraktionen gemessen werden, die allerdings nur noch vereinzelt vorkamen (Abb. 4.4). Innerhalb der ersten Aktivitätsminute ( $t_{11}$ ) traten extrem viele Kontraktionen ( $38 \pm 15$  Schwanzschläge) auf, die nach der zweiten Minute ( $t_{12}$ ) schon um 26 auf  $12 \pm 8$  Schwanzschläge reduziert waren. Bis zum Ende der Aktivitätsphase reagierte *Astacus leptodactylus* mit drei bis vier und ab der 17. Minute im Mittel nur noch mit einer Kontraktion.

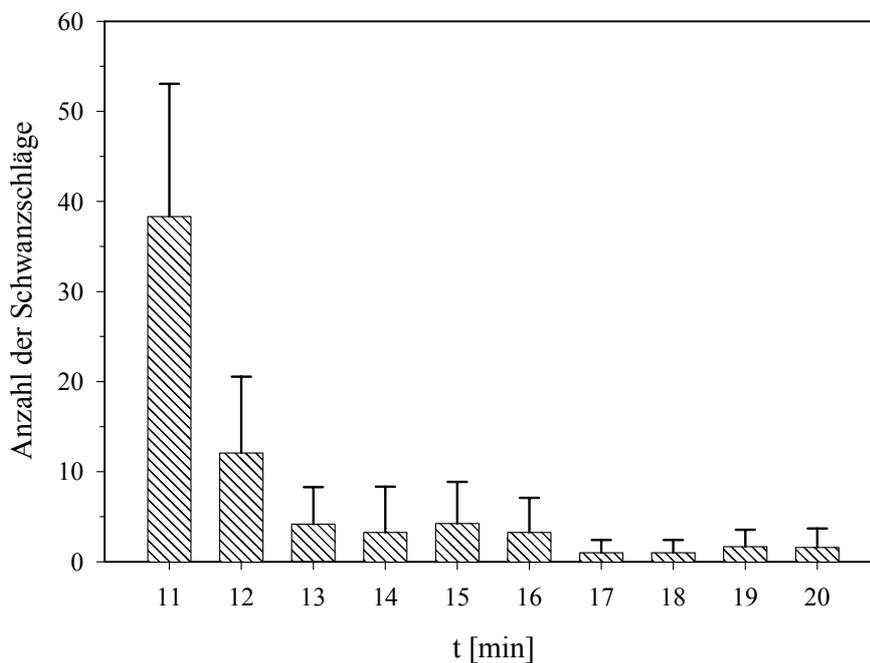


Abb. 4.4: Anzahl der Schwanzschläge von *Astacus leptodactylus* zu jeder Minute während der Aktivitätsphase im Versuch zur funktionellen Hypoxie. ( $X \pm SD$ ; Anzahl der Tiere  $n = 12$ ).

Im Vergleich mit der Abb. 3.16 (S. 59) kann die sofortige und signifikante Erhöhung der Hämolympffließgeschwindigkeit in der A. posterior, der A. descendens sowie der Herzfrequenz auf die hohe Anzahl der Schwanzschläge während der ersten zwei Minuten der Aktivitätsphase zurückgeführt werden. Über die beiden Gefäße werden Körperregionen versorgt, die bei Aktivität erhöht Sauerstoff benötigen. So perfundiert die A. posterior das Abdomen verstärkt mit Hämolymphe (Burnett 1984), wodurch die Muskulatur möglicherweise trotz der Kontraktionen weniger anaerob wird. Das entstandene Pyruvat würde dann nur teilweise zu Lactat reduziert werden, das infolgedessen in der Hämolymphe in geringeren Konzentrationen akkumulieren würde. Die A. descendens versorgt über die rostrale und caudale A. subneuralis u.a. das ZNS, die Scaphognathiten und ventrale lokomotorische Strukturen (Reiber et al.

1997; McMahon 1995b; McMahon 1999). Dadurch werden die Muskeln der Scaphognathiten erhöht durchblutet, deren Frequenz gesteigert und damit eine intensivere Ventilation ermöglicht (McMahon et al. 1979; Hamilton und Houlihan 1992; De Wachter und McMahon 1996b). Ähnliche Hämolympfverteilungsmuster konnten bei *Procambarus clarkii* (Reiber et al. 1997), als auch bei *Homarus americanus* (Reiber et al. 1997; Stegen 2001) während erhöhter Aktivität gezeigt werden.

Die erhöhte Perfusion der A. posterior und der A. descendens wird durch die Kontraktion bzw. Relaxation der muskulösen cardioarteriellen Klappen reguliert. Während die Klappe zwischen Bulbus arteriosus und der A. descendens die Verteilung der Hämolymphe in dieses Gefäß beeinflusst, regulieren die Klappen an den Eingängen der Aa. laterales abdominales den Durchfluß der A. posterior, da diese selbst keine Klappe im Bereich des Bulbus arteriosus besitzt (Kuramoto et al. 1995). Die Stimulation der muskulären Klappen erfolgt neurohormonell (Kuramoto und Ebara 1984; Wilkens et al. 1996) und neuronal (Wilkens 1995; Davidson et al. 1998). Wenn *Astacus leptodactylus* während einer Aktivitätsphase seine Abdominalmuskulatur verstärkt kontrahiert, relaxieren einerseits die lateralen Muskelblöcke der A. posterior, wodurch der Widerstand des Gefäßes reduziert wird und mehr Blut zu den Abdominalmuskeln fließen kann (Burnett 1984, Wilkens et al. 1997b). Andererseits führt eine inhibitorische Stimulation der segmentalen Nerven des Abdomens, die vom ventralen Nervenstrang aus parallel zu den Aa. laterales abdominales und zu den Klappen verlaufen, zur Relaxation der Klappen und folglich zu einer Erhöhung des Hämolympfflusses in diesen Gefäßen (Wilkens et al. 1997b; Davidson et al. 1998). In der A. descendens steigt die Durchblutung durch die Relaxation der cardioarteriellen Klappe an. Diese wird einerseits durch eigene inhibitorischer Nerven stimuliert (Kuramoto et al. 1995), andererseits durch Nerven der Aa. laterales abdominales, die vom ersten Nervenpaar zu der Klappe abzweigen, innerviert (Wilkens et al. 1997b). Durch die gemeinsame Stimulation der cardioarteriellen Klappen von A. descendens und der Aa. laterales abdominales kann der Blutfluß gleichzeitig nach ventral und in die Muskelregion verstärkt werden (Wilkens et al. 1997b; Davidson et al. 1998).

Die schnelle Änderung der Herzfrequenz wird durch cardioregulatorische Nerven (Dorsalnerven) des ZNS kontrolliert (Guirguis und Wilkens 1995; Rose et al. 1998). Im Unterschied zur biotopbedingten Hypoxie, bei der die Regulation des HZV nicht über die Herzfrequenz, sondern über die Erhöhung des Schlagvolumens verläuft und vom Sauerstoffgehalt des Blutes abhängig ist, erfolgt bei Aktivität der Anstieg der Herzfrequenz aufgrund neuronaler Einflüsse schneller und stärker als die Änderung des Schlagvolumens (Hamilton und Houlihan 1992; McMahon 1999). Da Herz und Scaphognathiten eine gemeinsame Schalt-

stelle im ZNS besitzen, führt die Innervierung bei Aktivität zu einer Korrelation der Änderung von Herzfrequenz und Ventilation und damit zu einer optimalen Sauerstoffversorgung des Tieres (Wilkens et al. 1974; Rose et al. 1998). Die Herzfrequenz von *Astacus leptodactylus* nahm in der auf eine Aktivitätsphase folgenden Erholung nur langsam ab und die einzelnen Werte +waren bis zum Versuchsende immer noch signifikant gegenüber den Ruhewerten erhöht (Abb. 3.16 IV, S. 59). Vergleicht man die aktivitätsbedingten Reaktionen auf den Herzkreislauf mit denen, die durch die Infusion der Adenylate mit einer Konzentration von  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$  (Abb. 3.5 und 3.6, S. 39 u. 40) hervorgerufen worden waren, zeigt sich ein paralleler Effekt zu den ATP- und ADP-Applikationen. Sowohl die bis zum Versuchsende gesteigerte Herzfrequenz, als auch die signifikant erhöhten Fließgeschwindigkeiten während der gesamten Erholungsphase sind denen nach Aktivität am ähnlichsten. Eine Gegenüberstellung der maximalen Erhöhungen dieser Parameter durch die Adenylatinfusionen und durch muskuläre Aktivität in Abb. 4.5 verdeutlicht diese Ähnlichkeit. Die durch Adenosin und AMP ausgelösten Effekte auf die Hämolymphtfließgeschwindigkeit und die Herzfrequenz sind bis auf die A. lateralis deutlich geringer, als infolge einer ATP- und ADP-Infusion sowie durch muskuläre Aktivität. Stegen (2001) konnte jedoch bei *Homarus americanus* eine gegensätzliche Relation zeigen. Die cardiovasculären Parameter veränderten sich durch Aktivität annähernd um die gleichen prozentualen Erhöhungen, wie durch die Infusion von  $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$  Adenosin und AMP. Die Autorin schloß auf eine mögliche Freisetzung von Adenosin aus den aktiven Muskelzellen und einer purinergen Vermittlung der cardiovasculären Reaktionen. Aufgrund der bekannten physiologischen Effekte des Adenosins (s. Einleitung) scheint diese Überlegung logisch. Da aber bei *Astacus leptodactylus* eine höhere Adenosinkonzentration als  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$  (Abb. 3.2, S. 32) nur in der A. descendens eine Fließgeschwindigkeitssteigerung bewirkte, können die Differenzen in den anderen Gefäßen und der Herzfrequenz im Vergleich zur Aktivitätsphase nicht allein auf das Adenosin zurückgeführt werden (Abb. 4.5). Möglich wäre, daß bei *Astacus leptodactylus* während einer Aktivitätsphase durch die Kontraktion des Abdomens ATP freigesetzt wird, das über ADP und AMP zu Adenosin abgebaut wird und die auftretenden purinergen Effekte eine Mischung der Wirkung unterschiedlicher Adenylate ist. In *Cherax destructor* sank die ATP-Konzentration nach einer Aktivitätsphase um 2,96 auf  $4,47 \pm 1,24 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ FG}$ , wohingegen die ADP- und die AMP-Konzentrationen von  $0,94 \pm 0,10$  auf  $2,76 \pm 0,47 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ FG}$  bzw. von  $0,08 \pm 0,04$  auf  $1,42 \pm 0,09 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ FG}$  stiegen (England und Baldwin 1983). Ein derart verstärkter ATP-Abbau geht einher mit der Abnahme der Energieladung (Formel (4.1)), die durch die Menge entstandenen AMP bestimmt wird (Bruns 1990). Daß unter Aktivität die Energieladung in

Crustaceen abnimmt, konnten England und Baldwin (1983) bei *Cherax destructor* sowie Gäde (1984) bei *Orconectes limosus* nach funktioneller Anaerobiose zeigen.

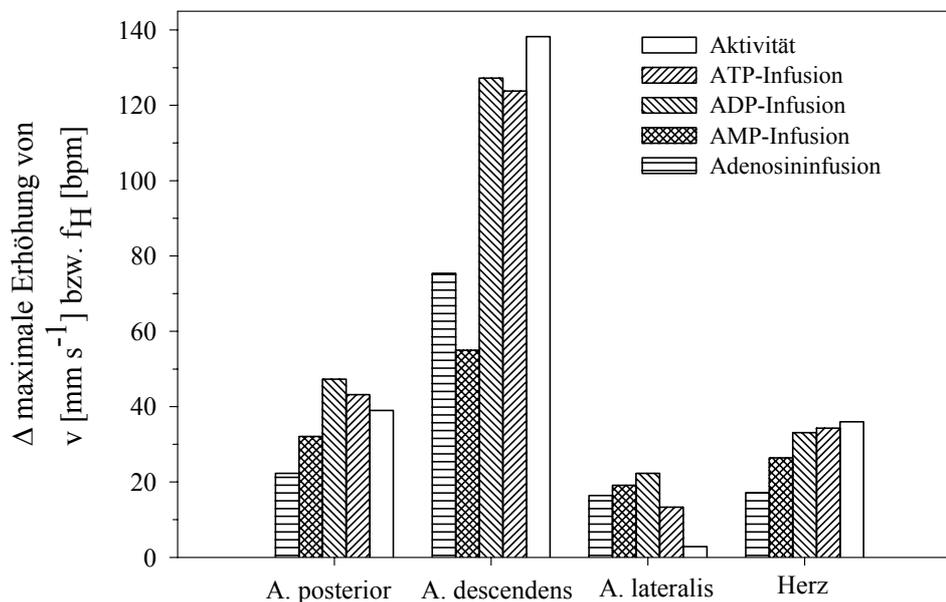


Abb. 4.5: Vergleich der maximalen Erhöhungen der Fließgeschwindigkeiten [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in der A. posterior, der A. descendens, der A. lateralis und der Herzfrequenz [bpm] gegenüber dem mittleren Ruhewert nach Infusion von Adenosin, AMP, ADP und ATP sowie nach Aktivität bei *Astacus leptodactylus*.

Doch wo wird unter Aktivität ATP freigesetzt und zu Adenosin abgebaut? Im Gegensatz zur biotopbedingten Hypoxie, bei der Adenosin intrazellulär in vasculären Geweben und in Blutzellen entsteht, wird es während einer funktionellen Hypoxie beim Hund extrazellulär in den Skelettmuskeln gebildet (Mo und Ballard 2001). Auch im Interstitium von Rattenmuskeln konnte die Adenosinproduktion in Abhängigkeit von muskulärer Aktivität gezeigt werden (Lo et al. 2001). Sollte bei *Astacus leptodactylus* ATP aus dem kontrahierenden Abdominalmuskel freigesetzt werden, erfordert die Adenosinbildung im Interstitium die Anwesenheit entsprechender ecto-Enzyme, die eine hinreichend hohe Abbauraten aufweisen müssen. Adenosin gehört zu den Autakoiden, zu lokal wirkenden hormon- oder transmitterähnlichen Substanzen, die zelluläre Funktionen regulieren (Julien 1997). Es entfaltet seine Effekte am Ort der Entstehung, indem es an Rezeptoren bindet, die auf der Oberfläche von Gefäß- und Muskelzellen sitzen (Hellsten et al. 1998). Seine Rolle ist weniger als zirkulierendes, sondern als ein lokal wirkendes Hormon zu sehen (Brunns 1990). Rubio et al. (1973) wiesen mit Hilfe histochemischer Untersuchungen in Vertebratenskelettmuskeln die Entstehung des Adenosins innerhalb eines begrenzten Bereichs in der Nähe von Gefäßwänden nach, wo das Adenosin auf die Gefäßmuskulatur wirken konnte.

Wie könnte nun eine purinvermittelte Wirkung der cardiovasculären Effekte bei *Astacus leptodactylus* aussehen? Einerseits wäre es möglich, daß die Adenylate und das Adenosin relaxierend auf die Gefäßmuskulatur der A. posterior wirken, andererseits den gleichen Effekt auf die cardioarteriellen Klappen der A. descendens und der Aa. laterales abdominales haben. Die Relaxation der Muskeln würde in Kombination mit dem positiv chronotropen Effekt die Durchblutung der Gefäße erhöhen und dadurch die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe in diesen steigern. Die Relaxation der Gefäßmuskulatur in Vertebraten wird nach Burnstock (1990) und Stone (1991) durch die Bindung von endothelialelem ATP und Adenosin an P2Y- bzw. P1(A<sub>2A</sub>)-Rezeptoren vermittelt, die die Freisetzung des Vasodilatators NO bewirken. Ob eine NO-induzierte Vasodilatation bei *Astacus leptodactylus* auftritt, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Daß NO bei *Procambarus clarkii* und *Pacifastacus leniusculus* neuronale Reaktionen im abdominalen Nervensystem reguliert (Aonuma 2002; Aonuma und Newland 2002), spricht für die Möglichkeit einer NO-Beteiligung. Allerdings konnte mit der Infusion von 3,5 nmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> FG L-Arginin, dem Substrat der NO-Synthese, kein gesteigerter Effekt auf die Fließgeschwindigkeit und die Herzfrequenz von *Astacus leptodactylus* gezeigt werden (Schmidt-van de Meer 1998). Eine zweite Ansatzstelle der Purinderivate wäre auf neuronaler Ebene möglich, indem die Innervierung der cardioarteriellen Klappen beeinflusst wird. Die Modulation der Transmitterfreisetzung während eines extrazellulären ATP-Abbaus geht bei Vertebraten in den meisten Fällen auf das Adenosin zurück, das als inhibitorischer Neuromodulator im ZNS bekannt ist. Es inhibiert über A<sub>1</sub>-Rezeptoren die Freisetzung excitatorischer Neurotransmitter wie Acetylcholin, 5-HT und Dopamin. Die Aktivierung erfolgt dagegen über A<sub>2A</sub>-Rezeptoren, vor allem während intensiver Muskelaktivität, wenn die Adenosinbildung sehr hoch ist (Correia-de-Sá et al. 1997; Ribeiro et al. 1997; Okada und Hirai 1997). Theoretisch besteht bei *Astacus leptodactylus* die Möglichkeit, daß Adenosin die Klappenmuskulatur der Aa. laterales abdominales und der A. descendens über entsprechende Rezeptoren auf den Neuronen reguliert. Obwohl in der Literatur die Existenz von A<sub>1</sub>- und A<sub>2</sub>-Rezeptoren in neuronalen Geweben von Invertebraten unterschiedlich diskutiert wird (siehe 4.1.3), kann bei *Astacus leptodactylus* eine Inhibierung der Acetylcholinausschüttung aus den excitatorischen Nerven und die erhöhte Freisetzung von GABA aus den inhibitorischen Nerven nicht ausgeschlossen werden (Davidson et al. 1998), was die Klappen relaxieren und die Durchblutung verstärken würde. Eine ähnliche neuronal vermittelte Wirkung könnte auch die positiv chronotropen Effekte erklären. Aufgrund der vorherigen Ausführungen und der extrem schnellen Abbauraten extrazellulären Adenosins (Brunns 1990) ist es unwahrscheinlich, daß die Purine aus der Abdominalregion über die Hämolymphe zum Herzen gelangen, um

dort ihre Wirkung zu entfalten. Stegen (2001) ging daher eher von einer neuronalen Vermittlung der Adenosinwirkung aus.

Es stellt sich die Frage nach der tatsächlichen Produktion von Adenosin unter verstärkter Muskelaktivität bei *Astacus leptodactylus*. Die Messung der Adenosinkonzentration in der Hämolymphe und im Gewebe sollten in Hinblick auf die zuvor beschriebenen Möglichkeiten zeigen, ob diese Substanz im Abdominalmuskel des Krebses entsteht und für die cardio regulatorischen Effekte verantwortlich sein kann. Vielleicht ist dadurch die Wirkungsvermittlung über die Hämolymphe auszuschließen.

### **4.3.2 Effekte eines erhöhten Sauerstoffbedarfs durch muskuläre Aktivität auf die Verteilung der Purinderivate in Hämolymphe und Gewebe**

#### **4.3.2.1 Konzentrationen in der Hämolymphe**

Erhöhte muskuläre Aktivität führte in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* weder zu einer signifikanten Erhöhung der Adenosinkonzentration, noch zu der des Abbauprodukts Inosin und der des Urats (Abb. 3.17, S. 60). Die Adenosinkonzentration stieg aktivitätsbedingt innerhalb einer Minute um  $8 \text{ nmol L}^{-1}$  an, fiel mit Ende der Aktivitätsphase sofort wieder um 11 auf  $10 \pm 9 \text{ nmol L}^{-1}$  ab. Da diese Konzentrationen den Werten der Versuche zur Normoxie ( $14 \pm 3$  bis  $19 \pm 8 \text{ nmol L}^{-1}$ , Abb. 3.9, S. 45) entsprechen, kann das Adenosin in diesen geringen Menge nicht ausschlaggebend für die cardio vasculären Veränderungen (Abb. 3.6, S. 40) gewesen sein. Auch die zeitlich verzögert angestiegenen Inosinkonzentrationen, die maximal  $7,0 \pm 3,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  betragen, sind den normoxischen Werten ähnlich. Trotz einer sehr schnellen Desaminierung des entstandenen Adenosins durch die ADA der Hämolymphe hätte sich eine, wenn auch nicht messbar hohe Adenosinkonzentration, in einer stärkeren Erhöhung der Inosinkonzentration widerspiegeln müssen. Die lange Halbwertszeit des Inosins in der Hämolymphe (Czytrich 1990) wird außerdem dafür verantwortlich gewesen sein, daß die Inosinkonzentration nach 120 Minuten Erholung noch oberhalb des Kontrollwertes lag. Zusätzlich könnte die serielle Hämolymphentnahme zu einer möglichen Konzentrierung des Inosins und der anderen Purinderivate beigetragen haben. Bei *Homarus americanus* stieg die Inosinkonzentration nach muskulärer Aktivität sogar noch weiterhin an (Stegen 2001). Die Ergebnisse schließen die Hämolymphe als Transportweg für Adenosin aus und sowohl Adenosin als auch die Adenylate müssen ihre Wirkungen auf andere Weise vermitteln.

In der Krabbe *Callinectes sapidus* konnte trotz 30minütiger Schwimmphase keine signifikante Änderung der Uratkonzentration in der Hämolymphe gemessen werden, vielmehr nahm die Konzentration von  $101 \pm 17$  auf  $90 \pm 14 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ab (Lallier und Walsh 1990). E-

benfalls sank bei *Astacus leptodactylus* die Uratkonzentration innerhalb von zwei Minuten Muskelaktivität von  $104,4 \pm 64,9$  auf  $86,7 \pm 42,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Eine Ursache hierfür liegt in der Bindung des Urats an das Hämocyanin der Hämolymphe (Lallier und Walsh 1990). Zudem kann Urat bei muskulärer Aktivität im Hepatopancreas zu Allantoin oxidiert werden, da im Gegensatz zur biotopbedingten Hypoxie während der Aktivitätsphase die Hämolymphe das Gewebe zu 21 % oxigeniert verläßt (Booth et al. 1982) und der Sauerstoffgehalt im Hepatopancreas für die Uricasereaktion noch hoch genug ist (Lallier und Walsh 1990). Da die Uratkonzentrationen während des gesamten Versuchs im Bereich normoxischer Werte liegen (Abb. 3.9, S. 45), kann demzufolge Urat bei erhöhter Aktivität im Gegensatz zur biotopbedingten Hypoxie kein wichtiger Modulator der Sauerstoffaffinität des respiratorische Pigmentes sein (Lallier und Walsh 1990).

#### **4.3.2.2 Konzentrationen in verschiedenen Geweben**

Im Vergleich zur Hämolymphe konnte im Schwanzmuskel von *Astacus leptodactylus* eine signifikante Zunahme von Adenosin während der gesamten Aktivitätsphase gemessen werden (Abb. 3.18, S.). Schon nach zweiminütiger Muskelaktivität stieg die Adenosinkonzentration in diesem Gewebe um das 10fache gegenüber der Kontrolle an und war um Faktor 55 gegenüber der Hämolympfkonzentration zu diesem Zeitpunkt erhöht. Der signifikante Anstieg des Adenosins auf hohe Konzentrationen zu Beginn der Aktivitätsphase spricht für einen gesteigerten ATP-Abbau während diese Zeitraums. Das Ergebnis deckt sich mit den schnellen Änderungen der Herzkreislaufparameter (Abb. 3.16, S. 59) unter gleichen Bedingungen. Demnach ist Adenosin sicherlich eine der Substanzen, die für die beobachteten Veränderungen verantwortlich ist. Ebenso wahrscheinlich ist auch die unter 4.3.1 diskutierte Beteiligung der Adenosinvorläufer, da die Konzentration des Adenosins schon nach einer Minute Erholung von  $1,2 \pm 1,7$  auf  $0,3 \pm 0,2 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$  abgesunken war und somit nicht mehr für die länger anhaltenden Effekte auf den Herzkreislauf (Abb. 3.16, S. 59) zuständig sein konnte. Hiermit läßt sich eindeutig die Vermutung von Czytrich et al. (1989) widerlegen, daß unter funktioneller Hypoxie in den Geweben von *Astacus leptodactylus* AMP gar nicht oder nur zum Teil über Adenosin zum Inosin abgebaut wird. Denn die Autoren konnten keine Akkumulation der Purinderivate nach Hemmstoffversuchen mit EHNA beobachten. Der Weg über IMP ist sicher nicht auszuschließen, aber während erhöhter Muskelaktivität wird bei *Astacus leptodactylus* der AMP-Abbau über Adenosin bevorzugt. Demzufolge müssen im Interstitium des Schwanzmuskels entsprechend hohe Aktivitäten von ecto-5'-Nucleotidase und ADA vorliegen. So fand Hellsten (1999) in Skelettmuskelzellen von Ratten eine erhöhte Aktivität der

ecto-5'-Nucleotidase, die durch Muskelaktivität induziert worden war. Auch wenn in dieser Arbeit keine Enzymaktivitäten gemessen wurden, kann anhand des aus Adenosin entstandenen Inosins auf das Vorhandensein entsprechender Enzyme rückgeschlossen werden. Im Schwanzmuskel von *Astacus leptodactylus* akkumulierte Inosin zeitverzögert zum Adenosin, da die Konzentration erst ab der zweiten Aktivitätsminute signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht war. In der ersten Minute der Erholungsphase spiegelte sich in der immer noch signifikant erhöhten Inosinkonzentration die hohe Adenosinkonzentration aus der Aktivitätsphase wider. Adenosin akkumulierte während der Erholungsphase nicht weiter, wodurch die Inosinkonzentration fünf Minuten nach Aktivitätsende auf nichtsignifikante Werte sank, jedoch nach 10 Minuten Erholung noch um Faktor 4 gegenüber über der Kontrolle erhöht war. Ein hämolymphgerichteter Ausstrom des Inosins wird nur langsam erfolgt sein, denn die Konzentration des Inosins in der Hämolymphe war mit  $4,9 \pm 5,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  annähernd so hoch wie im Gewebe ( $5,4 \pm 4,4 \text{ nmol g}^{-1} \text{ FG}$ ) und änderte sich aufgrund der langen HWZ von 114 Minuten (Czytrich 1990) auch über einen längeren Zeitraum nicht (120 min E:  $6,2 \pm 3,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  Abb. 3.17, S. 60). Durch den langsamen Abbau des Inosins konnte im Schwanzmuskel kein Urat akkumulieren, das gegenüber der Hämolymphe in diesem Gewebe fast 10fach geringer konzentriert war. Möglicherweise wurde das aus dem Inosin entstandene Hypoxanthin nicht weiter abgebaut, das stattdessen über den salvage pathway zu IMP und weiter über Adenylosuccinat zu AMP rückreagierte. Auf diese Weise blieben die energiereichen Adenylate erhalten und konnten für nachfolgende Reaktionen wiederverwendet werden. Die Bedeutung des Urats liegt offensichtlich nicht im Bereich physiologischer Abläufe im Gewebe, sondern ist auf die Hämolymphe beschränkt, wo es die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins erhöht. Demzufolge ist der Urat-Effekt während einer langanhaltender biotopbedingten Hypoxie und nicht bei Muskelaktivität von Nutzen.

Die Messungen der Purinderivate im Scherenmuskel zeigten ein anderes Bild. Während Adenosin und Inosin in gleichbleibend niedrigen Konzentrationen gemessen wurden, stieg die Uratkonzentration auf Werte über die der anderen beiden Gewebe. Adenosin wird demzufolge unter funktioneller Hypoxie nur im aktiven Gewebe, dem Schwanzmuskel, verstärkt gebildet. Daraus läßt sich schließen, daß Adenosin und seine Vorläufer wie angenommen lokal begrenzt auf die Muskulatur der A. posterior und die der cardioarteriellen Klappen wirken, um so die Hämolympffließgeschwindigkeit durch das aktive Gewebe zu fördern und die Versorgung mit Sauerstoff zu verstärken. Die Uratakkumulation im Scherenmuskel kann auf einen verringerten Abtransport des Urats aus dem Gewebe und auf eine geringe Uricaseaktivität in diesem (Dyken 1991) zurückgeführt werden. Für letzteres könnte der sehr hohe

Anteil glycolytischer Muskelfasern in der Schere verantwortlich sein, die in der Krabbe *Eriphia* identifiziert wurden (Rathmayer und Maier 1987).

Obwohl der Hepatopancreas trotz muskulärer Arbeit mit genügend Sauerstoff versorgt wurde (s. 4.3.2.1), stieg die Uratkonzentration nach einminütiger Aktivität um Faktor 1,7 an. Die geringfügige Abnahme der Adenosin- und Inosinkonzentration in dieser Zeit ist sicher nicht der Grund dafür, vielmehr kann eine kurzzeitige Hemmung der Uricase in Betracht gezogen werden. Eine wiederhergestellte Uricaseaktivität oder eine verminderte Uratbildung ließen die Uratkonzentrationen nach zweiminütiger Muskelaktivität auf Konzentrationen sinken, die unterhalb der Kontrolle von  $37,7 \pm 25,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  lagen. Weniger Urat würde dann gebildet werden, wenn das aus Inosin entstandene Hypoxanthin über den bekannten salvage pathway wieder zur Auffüllung des Adenylatpools verwendet wird. Der nicht signifikante Anstieg der Purinderivate Adenosin und Inosin in der Erholungsphase läßt auf einen verzögerten, aber erhöhten ATP-Abbau im Hepatopancreas schließen. Obgleich in der Krabbe *Gecarcoidea natalis* eine hohe Aktivität der Xanthinoxidoreduktase von  $59 \text{ nmol Urat min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG gemessen werden konnte (Linton und Greenaway 1998), verlief der Abbau von Inosin im Hepatopancreas von *Astacus leptodactylus* sehr langsam. So traten nach 5 und 10 Minuten Erholung die höchsten Inosinkonzentrationen auf, wodurch Adenosin ebenfalls akkumulieren konnte. Der verzögerte Abbau des Inosins führte möglicherweise dazu, daß die Uricase das entstandene Urat sehr schnell oxidierte, ohne eine merkliche Änderung in dessen Konzentration hervorgerufen zu haben. Der Unterschied in der Uricaseaktivität ( $102,9 \pm 10,0 \text{ nmol Urat min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG) und der Aktivität der XDH ( $17,4 \pm 2,8 \text{ nmol Urat min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG) im normoxischen Hepatopancreas von *Carcinus maenas* (Dykens 1991) spricht für diese Erklärungsvariante.

## 5. Zusammenfassung

Der Sumpfkrebs *Astacus leptodactylus* ist in Bezug auf seine Habitatbedingungen eine außerordentlich widerstandsfähige Spezies. Er toleriert vor allem niedrige Sauerstoffkonzentrationen im Umgebungswasser. Doch nicht nur in solchen Situationen muß er für eine Regulation seines Stoffwechsels sorgen, sondern auch die ruckartige Kontraktion des Abdomens während der Flucht erfordert ebenfalls Adaptationen auf physiologischer Ebene, um auf diese Weise die Sauerstoffversorgung aufrechtzuerhalten. Hypoxische Bedingungen führen zu einem verstärkten Abbau von ATP, das über Adenosin zum primären Endprodukt Urat katabolisiert werden kann. Urat wird unter Sauerstoffmangel nicht weiter durch die Uricase abgebaut und akkumuliert daher.

Adenosin ist seit über 70 Jahren für seine kreislaufaktivierenden Wirkungen bei Vertebraten bekannt und auch bei *Astacus leptodactylus* führte die Infusion von Adenosin zu einer Erhöhung der Herzfrequenz und der Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe in den Gefäßen. Die Infusion der Adenosinvorläufer ATP, ADP und AMP konnten gleiche Effekte bei *Astacus leptodactylus* hervorgerufen werden, die mit zunehmendem Phosphorylierungsgrad stärker wurden. IMP, Inosin, Hypoxanthin und Urat sind dagegen nicht cardioaktiv.

Die Herabsetzung des Sauerstoffpartialdrucks unter 2,67 kPa bewirkte bei *Astacus leptodactylus* eine schnelle Adaptation auf cardiovasculärer Ebene, die mit einer typischen Bradycardie einherging und sich während einer Reoxigenierung ebenso schnell wieder normalisierte. Während einer biotopbedingten Hypoxie konnte gezeigt werden, daß Adenosin nicht für die Regulation des Herzkreislaufs verantwortlich ist. Es war nicht cardioaktiv und in der Hämolymphe konnte keine Konzentrationszunahme über einen längeren Zeitraum gemessen werden. Ob signifikante Adenosinkonzentrationen im Gewebe nach 24 Stunden noch kreislaufunterstützende Funktion haben, ist fraglich, da sich seine aktivierenden Effekte gegenüber der aufgetretenen Bradycardie kontraproduktiv verhalten würden. Demzufolge muß die verbesserte Sauerstoffversorgung des Tieres unter diesen Bedingungen auf einer anderen Ebene erfolgen. Während in der Anfangsphase einer Hypoxie die Anpassung des Herzkreislaufs das Resultat neuronaler Innervierung ist, geht bei langanhaltendem Sauerstoffmangel die verbesserte Sauerstoffaufnahme auf die Akkumulation von Urat in der Hämolymphe zurück. Uratkonzentrationen, die in den Versuchen z.T.  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  überstiegen, erhöhen die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins, wodurch vermehrt Sauerstoff in den Kiemen aufgenommen

werden kann. So ist die Sauerstoffversorgung während biotopbedingter Hypoxie eher durch Urat auf Ebene des respiratorischen Pigments gewährleistet, als durch Adenosin.

Während funktioneller Hypoxie, die durch eine gehäufte Fluchtreaktionen hervorgerufen wird, zeigte *Astacus leptodactylus* ein zur biotopbedingten Hypoxie konträres Bild der physiologischen Anpassung an den akuten Sauerstoffmangel. Als wichtiger Modulator der cardiovasculären Parameter konnte das im Schwanzmuskel produzierte Adenosin identifiziert werden, das sowohl die Herzfrequenz als auch die Hämolymphtfließgeschwindigkeit erhöht und damit die Perfusion des aktiven Gewebes mit Sauerstoff verbessert. Da der Sauerstoffmangel unter Aktivität eher kurzfristig ist, scheint es schwierig, die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins durch die Akkumulation von Urat zu verbessern, da dieser Metabolit während biotopbedingter Hypoxie erst nach acht Stunden signifikant erhöht war. So konnten über den kurzen Zeitraum in der Hämolymphe und im aktiven Gewebe keine erhöhten Uratkonzentrationen gemessen werden. Vermutlich wird der Effekt des Urats am Hämocyanin durch Lactat, das in der Literatur als anaerobes Endprodukt bei Aktivität zitiert wird, übernommen.

Adenosin und Urat akkumulieren während unterschiedlicher hypoxischer Situationen im Gewebe oder in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* und modulieren über die Aktivierung des Kreislaufs oder über die Erhöhung der Sauerstoffaffinität des Hämocyanins die Sauerstoffversorgung der Gewebe:

- Urat wirkt auf Ebene des respiratorischen Pigments und verbessert während einer biotopbedingten Hypoxie die Sauerstoffaufnahme in den Kiemen
- Adenosin wirkt aktivierend auf den Herzkreislauf und sorgt während einer funktionellen Hypoxie für einen schnelleren Transport des Sauerstoffs durch den Körper

## 6. Literatur

- Abe T, Morgan DA, Gutterman DD (1997) Role of adenosine receptor subtypes in neuronal stunning of sympathetic coronary innervation. *Am J Physiol* 272: H25-H34
- Agnisola C, Calabrese P, Foti L, Trara Genoino I (1987) Adenosine and AMP effects on performance of the systemic heart in *Octopus vulgaris*. *Pflügers Archiv* 410: S6
- Alexandrowicz JS (1932) The innervation of the heart of the crustacea. I. Decapoda. *Q J microsc Sci* 75: 182-249
- Alexandrowicz JS (1953) Nervous organs in the pericardial cavity of the decapod crustacea. *J Mar Biol Ass UK* 31: 563- 580
- Alexandrowicz JS, Carlisle DB (1953) Some experiments on the function of the pericardial organs in crustacea. *J Mar Biol Ass UK* 32: 175- 192
- Antoni H (2000) Mechanik der Herzaktion. In: Schmidt RF, Thews G, Lang F (eds) *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 28. Auflage
- Aonuma H (2002) Distribution of NO-induced cGMP-like immunoreactive neurones in the abdominal nervous system of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Zool Sci* 19 (1): 969-979
- Aonuma H, Newland PL (2001) Opposing actions of nitric oxide on synaptic inputs of identified interneurons in the central nervous system of the crayfish. *J Exp Biol* 204: 1319-1332
- Aonuma H, Newland PL (2002) Synaptic inputs onto spiking local interneurons in crayfish are depressed by nitric oxide. *J Neurobiol* 52: 144-155
- Arch JRS, Newsholme EA (1978) Activities and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine. *Biochem. J.* 174: 965-977
- Bandyopadhyay BC, Poddar MK (1994) Caffeine-induced increase of adenosine-deaminase activity in mammalian lymphoid organs. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 16 (10): 731-733
- Baumann H (1921) Das Gefäßsystem von *Astacus fluviatilis* (*Potamobius astacus* L.). *Z wiss Zool* 118: 246-312
- Beis I, Newsholme EA (1975) The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 152: 23-32
- Berne RM (1963) Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 204 (2): 317-322

- Berne RM, Gidday JM, Hill HE, Curnish RR, Rubio R (1987) Adenosine in the local regulation of blood flow: some controversies. In: Gerlach E, Becker BF (eds) Topics and perspectives in adenosine research. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 395-405
- Böhm M (1987) Kardiale Wirkungen von Adenosin. *Klin Wochenschr* 65: 487-499
- Bojsen BH, Witthøfft H, Styrishave B, Andersen O (1999) Circadian rhythmicity in heart rate and locomotor activity of noble crayfish, *Astacus astacus*, during exposure to hypoxia. *Freshwater Crayfish* 12: 107-120
- Booth CE, McMahon BR, Pinder AW (1982) Oxygen uptake and the potentiating effects of increased hemolymph lactate on oxygen transport during exercise in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J Comp Physiol* 148: 111-121
- Bourne GB, McMahon BR (1990) The physiology of invertebrate circulatory system: an introduction. *Physiol Zool* 63 (1): 1-2
- Bridges CR, Morris S (1986) Modulation of haemocyanin oxygen affinity by L-lactate – a role for other cofactors. In: Linzen B (ed) Invertebrate oxygen carriers. Springer-Verlag, Berlin, 341-352
- Bruns RF (1980) Adenosine receptor activation in human fibroblasts: nucleoside agonists and antagonists. *Can J Physiol Pharmacol* 58: 673-691
- Bruns RF (1990) Adenosine receptors: roles and pharmacology. In: Dubyak GR, Fedan JS (eds) Biological actions of extracellular ATP. *Annals of the New York academy of sciences* 603: 211-226
- Bruns RF, Fergus JH (1989) Allosteric enhancers of adenosine A<sub>1</sub> receptor binding and function. In: Ribeiro JA (ed) Adenosine receptors in the nervous system. Taylor and Francis, London, 53-60
- Buddenbrock-Hettersdorff W von (1967). Das Herz der Arthropoden. In: *Vergleichende Physiologie*. Band VI: Blut und Herz. Birkhäuser, Basel, 310-334
- Burggren W, Pinder A, McMahon BR, Doyle M, Wheatly M (1990) Heart rate and hemolymph pressure responses to hemolymph volume changes in the land crab *Cardisoma guanhumi*: evidence for "baroreflex" regulation. *Physiol Zool* 63 (1): 167-181
- Burnett BR (1984) Striated muscle in the wall of the dorsal abdominal aorta of the california spiny lobster *Panulirus interruptus*. *J Crust Biol* 4 (4): 560-566
- Burnstock G (1978) A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: Straub RW, Bolis L (eds) Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach. Raven Press, New York, 107-118
- Burnstock G (1989) Purine receptors. In: Ribeiro JA (ed) Adenosine receptors in the nervous system. Taylor and Francis, London, 1-14

- Burnstock G (1990) Dual control of local blood flow by purines. In: Dubyak GR, Fedan JS (eds) Biological actions of extracellular ATP. New York Academy of Sciences, New York, 31-45
- Burnstock G (1996) Purinoceptors: ontogeny and phylogeny. *Drug Dev Res* 39: 204-242
- Busse R (2000) Gefäßsystem und Kreislaufregulation. In: Schmidt RF, Thews G, Lang F (eds) Physiologie des Menschen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 28. Auflage
- Cameron JN, Mangum CP (1983) Environmental adaptations of the respiratory system: ventilation, circulation, and oxygen transport. In: Bliss DE, Vernberg FJ, Vernberg WB (eds) The biology of crustacea. Vol. VIII: Environmental adaptations. Academic Press, Inc., New York, 43-63
- Carr WES, Thompson HW (1983) Adenosine 5'-monophosphate, an internal regulatory agent, is a potent chemoattractant for a marine shrimp. *J Comp Physiol* 153: 47-53
- Chauveau M, Levy B, Dessanges JF, Savin E, Bailliart O, Martineaud JP (1985) Quantitative Doppler blood flow measurement method and *in vivo* calibration. *Cardiovasc Res* 19: 700-706
- Chiba S, Himori N (1975) Different inotropic responses to adenosine on the atrial and ventricular muscle of the dog heart. *Jpn J Pharmacol* 25: 489-491
- Claybrook DL (1983) Nitrogen metabolism. In: Bliss ED, Mantel LH (eds) The biology of crustacea. Vol. 5: Internal anatomy and physiological regulation. Academic Press, Inc., New York, 163-213
- Collinson AR, Peuhkurinen KJ, Lowenstein JM (1987) Regulation and function of 5'-nucleotidases. In: Gerlach E, Becker BF (eds) Topics and perspectives in adenosine research. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 133-144
- Cooke IM, Sullivan RE (1982) Hormones and neurosecretion. In: Bliss ED, Atwood HL, Sandeman DC (eds) The biology of crustacea. Vol. 3: Neurobiology: structure and function. Academic Press, Inc., New York, 205-290
- Correia-de-Sá P, Timóteo MA, Ribeiro JA (1997) Adenosine plays a key role on neuromuscular transmission to adjust the modulatory pattern (cholinergic vs peptidergic) to the conditions of motor nerve stimulation. In: Okada Y (ed) The role of adenosine in the nervous system. Elsevier Science, Amsterdam, 79-87
- Cox RTL, Walker RJ (1987) An analysis of the adenosine receptors responsible for modulation of an excitatory acetylcholine response on an identified *Helix* neuron. *Comp Biochem Physiol* 88C (1): 121-130
- Czytrich HM (1990) Der Purinnukleotidstoffwechsel des Flußkrebsees *Astacus leptodactylus* in Abhängigkeit von einer funktionsbedingten und biotopbedingten Anaerobiose. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dissertation
- Czytrich HM, Bridges CR, Grieshaber MK (1989) Adeninnukleotidabbau beim Flußkrebse *Astacus leptodactylus*. *Verh Dtsch Zool Ges* 82: 296-297

- Daly JW (1982) Adenosine receptors: targets for future drugs. *J Med Chem* 25 (3): 197-207
- Darvish A, Metting PJ (1993) Purification and regulation of an AMP-specific cytosolic 5'-nucleotidase from dog heart. *Am J Physiol* 264: H1528-H1534
- Davidson GW, Wilkens JL, Lovell P (1998) Neuronal control of the lateral abdominal arterial valves in the lobster *Homarus americanus*. *Biol Bull* 194 (1): 72-82
- Deussen A, Borst M, Schrader J (1988) Formation of S-adenosylhomocysteine in the heart. I: An index of free intracellular adenosine. *Circ Res* 63: 240-249
- Deussen A, Stappert M, Schäfer S, Kelm M (1999) Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding transmembranous concentration gradient. *Circulation* 99 (15): 2041-2048
- De Wachter B, McMahon BR (1996a) Temperature effects on heart performance and regional hemolymph flow in the crab *Cancer magister*. *Comp Biochem Physiol* 114A (1): 27-33
- De Wachter B, McMahon BR (1996b) Haemolymph flow distribution, cardiac performance and ventilation during moderate walking activity in *Cancer magister* (Dana) (Decapoda, Crustacea). *J Exp Biol* 199 (3) 627-633
- Dingle JR, Hines JA (1971) Degradation of inosine 5'-monophosphate in the skeletal muscle of several North Atlantic fishes. *J Fish Res Bd Can* 28: 1125-1131
- Dingle JR, Hines JA (1974) Some enzymic reactions of adenine derivatives in the tail muscle of the lobster, *Homarus americanus*. *Comp Biochem Physiol* 48B: 1-10
- Dingle JR, Hines JA, Fraser DI (1968) Post-mortem degradation of adenine nucleotides in muscle of the lobster, *Homarus americanus*. *J Food Sci* 33: 100-103
- Drury AN, Szent-Györgyi A (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-237
- Durand F, Regnault M (1998) Nitrogen metabolism of two portunid crabs, *Carcinus maenas* and *Necora puber*, during prolonged air exposure and subsequent recovery: a comparative study. *J Exp Biol* 201: 2515-2528
- Dykens JA (1991) Purineolytic capacity and origin of haemolymph urate in *Carcinus maenas* during hypoxia. *Comp Biochem Physiol* 98B (4): 579-582
- Dykens JA, Shick JM (1988) Relevance of purine catabolism to hypoxia and recovery in eu-ryoxic and stenoxic marine invertebrates, particularly bivalve molluscs. *Comp Biochem Physiol* 91C (1): 35-41
- Eckert R (1993) Tierphysiologie. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- England WR, Baldwin J (1983) Anaerobic energy metabolism in the tail musculature of the Australian Yabby *Cherax destructor* (crustacea, decapoda, parastacidae): role of phosphagens and anaerobic glycolysis during escape behavior. *Physiol Zool* 56 (4): 614-622

- Engler A (1996) Purine als Modulatoren des Kreislaufsystems von Flußkrebsen. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diplomarbeit
- Fedotov VP, Kholodkevich SV, Stochilo AG (2002) Peculiarities of cardiac activity in the crayfish *Astacus astacus* in different functional states. *J Evol Biochem Physiol* 38 (1): 45-56
- Fields HL (1976) Crustacean abdominal and thoracic muscle receptor organs. In: Mill PJ (ed) *Structure and function of proprioceptors in the invertebrates*. Chapman and Hall, London, 65-114
- Fijisawa K, Yoshino M (1987) Activities of adenylate-degrading enzymes in muscles from vertebrates and invertebrates. *Comp Biochem Physiol* 86b: 109-112
- Franke H (ed) (1969) *Lexikon der Physik*. 3. Auflage. Franck'sche Verlagshandlung, Stuttgart
- Fredholm BB (1980) Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine? *Trends Pharmacol Sci* 1: 129-132
- Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wassermann W (2000) Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362: 364-374
- Fur PL de, Mangum CP (1979) The effects of environmental variables on the heart rates of invertebrates. *Comp Biochem Physiol* 62A: 283-294
- Furshpan EJ, Potter DD, Matsumoto SG (1986) Synaptic Functions in rat sympathetic neurons in microcultures. III. A purinergic effect on cardiac myocytes. *J Neurosci* 6: 1099-1107
- Gäde G (1984) Effects of oxygen deprivation during anoxia and muscular work on the energy metabolism of the crayfish, *Orconectes limosus*. *Comp Biochem Physiol* 77A (3): 495-502
- Gerlach E, Deuticke B, Dreisbach RH (1963) Der Nucleotid-Abbau im Herzmuskel bei Sauerstoffmangel und seine mögliche Bedeutung für die Coronardurchblutung. *Die Naturwissenschaften* 50: 228-229
- Gillespie JH (1934) The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol* 80: 345-349
- Grieshaber MK, Hardewig I, Kreutzer U, Schneider A, Völkel S (1992) Hypoxia and sulfide tolerance in some marine invertebrates. *Verh Dtsch Zool Ges* 85 (2): 55-76
- Groß H (2002) Artenhilfsprogramm Steinkrebs. *LÖBF-Mitteilungen* 4: 18-22
- Guirguis MS, Wilkens JL (1995) The role of the cardio regulatory nerves in mediating heart rate responses to locomotion, reduced stroke volume, and neurohormones in *Homarus americanus*. *Biol Bull* 188 (2): 179-185
- Haas HL, Selbach O (2000) Functions of neuronal adenosine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362: 375-381

- Hamilton NM, Houlihan DF (1992) Respiratory and circulatory adjustments during aquatic treadmill exercise in the european shore crab *Carcinus maenas*. *J Exp Biol* 162: 37-54
- Harper SL, Reiber CL (1999) Influence of hypoxia on cardiac functions in the grass shrimp (*Palaemonetes pugio* Holthuis). *Comp Biochem Physiol A* 124: 569-573
- Hartley CJ, Cole JS (1974) An ultrasonic pulsed Doppler system for measuring blood flow in small vessels. *J Appl Physiol* 37: 626-629
- Hartley CJ, Lewis RM, Ishida T, Chelly JE, Entman ML (1984) High frequency pulsed Doppler measurement of blood flow and myocardial dimensions in conscious animals. In: Herd JA, Gotto AM, Kaufmann PG, Weiss SM (eds) Proceedings of the working conference on applicability of new technology to biobehavioral research. NIH Publication, USA, 95-106
- Hellsten Y (1999) The effect of muscle contraction on the regulation of adenosine formation in rat skeletal muscle cells. *J Physiol* 518 (3): 761-768
- Hellsten Y, Maclean D, Rådegran G, Saltin B, Bangsbo J (1998) Adenosine concentrations in the interstitium of resting and contracting human skeletal muscle. *Circulation* 98 (1): 6-8
- Hochachka PW, Arai KI (1966) Nucleosides in marine invertebrate muscle. *Nihon-suisan-gakkai-shi* 32: 174-179
- Hofmann J (1980) Die Flußkrebse: Biologie, Haltung und wirtschaftliche Bedeutung. 2. Auflage. Parey, Hamburg, Berlin
- Hoyle CHV, Greenberg MJ (1988) Actions of adenylyl compounds in invertebrates from several phyla: evidence for internal purinoceptors. *Comp Biochem Physiol* 90C (1): 113-122
- Hu B, Altschuld RA, Hohl CM (1993) Adenosine stimulation of AMP deaminase activity in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 264: C48-C53
- Illes P, Klotz K-N, Lohse MJ (2000) Signalling by extracellular nucleotides and nucleosides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362: 295-298
- Ishii K, Massabuau JC, Dejours P (1983) Oxygen-sensitive chemoreceptors in the branchio-cardiac veins of the crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Respir Physiol* 78: 73-81
- Julien RM (1997) Psychostimulantien: Coffein und Nicotin. In: Julien (ed) Drogen und Psychopharmaka. Spektrum Verlag, Heidelberg, 169-197
- Köksal G (1988) *Astacus leptodactylus* in Europe. In: Holdich DM, Lowery RS (eds) Freshwater crayfish: biology, management and exploitation. The University Press, Cambridge, 365-400
- Kükenthal H (1984) Crustacea, Krebse. In: Renner M (ed) Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum. 19. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena
- Kuramoto T, Ebara A (1984) Neurohormonal modulation of the cardiac outflow through the cardioarterial valve in the lobster. *J exp Biol* 111: 123-130

- Kuramoto T, Wilkens JL, McMahon BR (1995) Neuronal control of cardiac outflow through the sternal valve in the lobster *Homarus americanus*. *Physiol Zool* 68 (3): 443-452
- Lallier FH (1993) Urate in decapod crustaceans: Its role in nitrogen excretion and oxygen transport. *Trends in Comp Biochem Physiol* 1: 501-507
- Lallier FH, Walsh PJ (1990) Urate does not accumulate in the haemolymph of exercised blue crab, *Callinectes sapidus*. *J Exp Biol* 154: 581-585
- Lallier FH, Walsh PJ (1991) Activities of uricase, xanthine oxidase, and xanthine dehydrogenase in the hepatopancreas of aquatic and terrestrial crabs. *J Crust Biol* 11 (4): 506-512
- Lallier FH, Boitel F, Truchot JP (1987) The effect of ambient oxygen and temperature on haemolymph L-lactate and urate concentrations in the shore crab *Carcinus maenas*. *Comp Biochem Physiol* 86A (2): 255-260
- Langberg H, Bjørn C, Boushel R, Hellsten Y, Kjær M (2002) Exercise-induced increase in interstitial bradykinin and adenosine concentrations in skeletal muscle and peritendinous tissue in humans. *J Physiol* 542 (3): 977-983
- Larimer JL (1962) Responses of the crayfish heart during respiratory stress. *Physiol Zool* 35: 179-186
- Latini S, Pedata F (2001) Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem* 79: 463-484
- Lecher E (1973) *Lehrbuch der Physik für Mediziner und Biologen*. 13. Auflage. B. G. Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig
- Linton SM, Greenaway P (1997) Urate deposits in the Gecarcinid land crab *Gecarcoidea natalis* are synthesised *de novo* from excess dietary nitrogen. *J Exp Biol* 200: 2347-2354
- Linton SM, Greenaway P (1998) Enzymes of urate synthesis and catabolism in the Gecarcinid land crab *Gecarcoidea natalis*. *Exp Biol Online* 3:5
- Lo SM, Mo FM, Ballard HJ (2001) Interstitial adenosine concentration in rat red or white skeletal muscle during systemic hypoxia or contractions. *Exp Physiol* 86 (5): 593-598
- Londos C, Cooper DMF, Wolff J (1980) Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 (5): 2551-2554
- Mangum CP (1983) Oxygen transport in the blood. In: Bliss DE, Mantel LH (eds) *The biology of crustacea*. Vol. 5: Internal anatomy and physiological regulation. Academic Press, Inc., New York, 373-429
- Martin GC, Hose JE (1995) Circulation, the blood, and disease. In: Factor JR (ed) *Biology of the Lobster Homarus americanus*. Academic Press, Inc., USA, 465-495
- Massabuau JC, Burtin B (1984) Regulation of oxygen consumption in the crayfish *Astacus leptodactylus* at different levels of oxygenation: role of peripheral O<sub>2</sub> chemoreception. *J Comp Physiol B* 155: 43-49

Maynard DM (1960) Circulation and heart function. In: Waterman TH (ed) The physiology of crustacea. Vol. I: Metabolism and Growth. Academic Press, Inc., USA and London, 161-226

McGaw IJ, McMahon BR (2003) Balancing tissue perfusion demands: cardiovascular dynamics of *Cancer magister* during exposure to low salinity and hypoxia. *J Exp Zool* 295A (1): 57-70

McGaw IJ, Airriess CN, McMahon BR (1994a) Peptidergic modulation of cardiovascular dynamics in the dungeness crab, *Cancer magister*. *J Comp Physiol B* 164: 103-111

McGaw IJ, Airriess CN, McMahon BR (1994b) Patterns of haemolymph-flow variation in decapod crustaceans. *Marine Biology* 121: 53-60

McLaughlin PS (1983): Internal anatomy. In: Bliss ED, Mantel L (eds) Biology of crustacea. Vol. 5: Internal anatomy and physiological regulation. Academic Press, Inc., New York, 1-53

McMahon BR (1995a) The physiology of gas exchange, circulation, ion regulation, and nitrogenous excretion: an integrative approach. In: Factor JR (ed) Biology of the lobster *Homarus americanus*. Academic Press, Inc., USA, 497-517

McMahon BR (1995b) Integrated neuronal and neurohormonal control of respiratory and circulatory function in crustaceans: is there evidence for an "autonomic" control system? *Verh Dtsch Zool Ges* 88 (2): 87-101

McMahon BR (1999) Intrinsic and extrinsic influences on cardiac rhythms in crustaceans. *Comp Biochem Physiol A* 124: 539-547

McMahon BR (2001) Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in crustaceans. *Resp Physiol* 128 (3): 349-364

McMahon BR, Burnett LE (1990) The crustacean open circulatory system: a reexamination. *Physiol Zool* 63 (1): 35-71

McMahon BR, Wilkens JL (1975) Respiratory and circulatory responses to hypoxia in the lobster *Homarus americanus*. *J Exp Biol* 62: 637-655

McMahon BR, Burggren WW, Wilkens JL (1974) Respiratory Responses to long-term hypoxic stress in the crayfish *Orconectes virilis*. *J Exp Biol* 60: 195-206

McMahon BR, McDonald DG, Wood CM (1979) Ventilation, oxygen uptake and haemolymph oxygen transport, following enforced exhausting activity in the dungeness crab *Cancer magister*. *J Exp Biol* 80: 271-285

Menze MA, Hellmann N, Decker H, Grieshaber MK (2000) Binding of urate and caffeine to hemocyanin of the lobster *Homarus vulgaris* (E.) as studied by isothermal titration calorimetry 39 (35): 10806- 10811

Mo FM, Ballard HJ (2001) The effect of systemic hypoxia on interstitial and blood adenosine, AMP, ADP and ATP in dog skeletal muscle. *J Physiol* 536 (2): 593-603

- Möser H, Schrader J, Deussen A (1989) Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol* 256 (4): C799-C806
- Morris S, Callaghan J (1998) Respiratory and metabolic responses of the Australian Yabby *Cherax destructor* to progressive and sustained environmental hypoxia. *J Comp Physiol B* 168: 377-388
- Morris S, McMahon BR (1989) Neurohumor effects on crustacean haemocyanin oxygen affinity. *J Exp Zool* 249: 334-337
- Morris S, Bridges CR, Grieshaber MK (1985) A new role for uric acid: modulator of haemocyanin oxygen affinity in crustaceans. *J Exp Zool* 235: 135-139
- Müller H (1954) Die Flusskrebse. Die Neue Brehm-Bücherei, Heft 121. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg, Lutherstadt
- Mutschler E (1996) Arzneimittelwirkungen. 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Niedzwicki JG, Liou C, Abernethy DR, Lima JE, Hoyt A, Lieberman M, Bethlenfalvai NC (1995) Adenosine deaminase isoenzymes of the opossum *Didelphis virginiana*: initial chromatographic and kinetic studies. *Comp Biochem Physiol* 111B (2): 291-298
- Nies A (1993) Transport und Stoffwechsel von Urat im Hepatopankreas des Amerikanischen Hummers (*Homarus americanus*). Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dissertation
- Nilsson GE, Lutz PL (1992) Adenosine release in the anoxic turtle brain: a possible mechanism for anoxic survival. *J Exp Biol* 162: 345-351
- Okada Y, Hirai H (1997) Excitatory effects of adenosine on neurotransmission in the central nervous system. In: Okada Y (ed) *The role of adenosine in the nervous system*. Elsevier Science, Amsterdam, 25-38
- Olah ME, Stiles GL (1995) Adenosine receptor subtypes: Characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 581-606
- Olsson RA, Pearson JD (1990) Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 70 (3): 761-845
- Pearson JD, Gordon JL (1984) Metabolism of serotonin and adenosine. In: Jaffe EA (ed) *Biology of endothelial cells*. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 330-342
- Raffin JP, Thebault MT (1987) Purification and partial characterization of an AMP deaminase from the marine invertebrate *Palaemon serratus*. *Comp Biochem Physiol* 88B: 1071-1076
- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews* 50 (3): 413-492
- Rathmayer W, Maier L (1987) Muscle fiber types in crabs: studies on single identified muscle fibers. *Amer Zool* 27: 1067-1077

- Reiber CL (1992) The hemodynamics of the crustacean open circulatory system: hemolymph flow in the crayfish (*Procambarus clarkii*) and the lobster (*Homarus americanus*). Dissertation, Graduate School of the University of Massachusetts
- Reiber CL (1994) Hemodynamics of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Physiol Zool* 67 (2): 449-467
- Reiber CL (1995) Physiological adaptations of crayfish to the hypoxic environment. *Amer Zool* 35 (1): 1-11
- Reiber CL (1997) Oxygen sensitivity in the crayfish *Procambarus clarkii*: peripheral O<sub>2</sub>-receptors and their effect on cardiorespiratory functions. *J Crustacean Biol* 17: 197-206
- Reiber CL, McMahon BR (1998) The effects of progressive hypoxia on the crustacean cardiovascular system: a comparison of the freshwater crayfish, (*Procambarus clarkii*), and the lobster (*Homarus americanus*). *J Comp Physiol B* 168: 168-176
- Reiber CL, McMahon BR, Burggren WW (1997) Cardiovascular functions in two macruran decapod crustaceans (*Procambarus clarkii* and *Homarus americanus*) during periods of inactivity, tail flexion and cardiorespiratory pauses. *J Exp Biol* 200: 1103-1113
- Reipschläger A, Nilsson GE, Pörtner HO (1997) A role for adenosine in metabolic depression in the marine invertebrate *Sipunculus nudus*. *Am Physiol* 272: R350-R356
- Ribeiro JA, Sebastião A (1986) Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third (A<sub>3</sub>) adenosine receptor. *Progr Neurobiol* 26: 179-210
- Ribeiro JA, Correia-de-Sá P, Cunha RA, Sebastião AM (1997) Adenosine and neurotransmitter release: inhibition and facilitation. In: Okada Y (ed) *The role of adenosine in the nervous system*. Elsevier Science, Amsterdam, 13-24
- Rose RA, Wilkens JL, Walker RL (1998) The effects of walking on heart rate, ventilation rate and acid-base status in the lobster *Homarus americanus*. *J Exp Biol* 201: 2601-2608
- Rose RA, MacDougall, Patel A, Wilkens JL, Walker RL (2001) Effects of Walking on ventilatory and cardiac function in intact and cardiac-impaired lobsters. *Physiol Biochem Zool* 74 (1): 102-110
- Roush AH, Betz RF (1956) The adenosine deaminase of crustaceans. *Biochem Biophys Acta* 19: 579-580
- Rubio R, Berne RM, Dobson JG Jr (1973) Sites of adenosine production in cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol* 225 (4): 938-953
- Saito D, Mima T, Obayashi N, Uchida S, Maekawa K, Sato T, Mizuo K, Kobayashi H, Haraoka S (1993) Effects of inosine on adenosine-induced coronary vasodilation in the open-chest dog. *Arzneimittel-Forschung* 43-2 (9): 950-953
- Saver MA, Wilkens JL (1998) Comparison of the effects of five hormones on intact and open heart cardiac ganglionic output and myocardial contractility in the shore crab *Carcinus maenas*. *J Comp Physiol A* 120 (2): 301-310

- Schmidt-van de Meer J (1998) Adenosin- und AMP-spezifische Wirkungen auf Kreislaufparameter bei *Astacus leptodactylus*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diplomarbeit
- Schubert P, Mager R (1989) Functional correlates of synaptic and extrasynaptic adenosine receptors in the hippocampus. In: Ribeiro JA (ed) Adenosine receptors in the nervous system. Taylor and Francis, London, 159-168
- Schultz SG (2002) William Harvey and the circulation of the blood: the birth of a scientific revolution and modern physiology. *News Physiol Sci* 17: 175-180
- Schwartzkopff J (1953) Die Kreislaufzeit einiger Crustaceen. *Die Naturwissenschaften* 40: 585-586
- Shryock JC, Belardinelli L (1997) Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am J Cardiol* 79 (12A): 2-10
- Siebenaller JF, Murray TF (1986) Phylogenetic distribution of [<sup>3</sup>H]cyclohexyladenosine binding sites in nervous tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 137 (1): 182-189
- Skerrett M, Peaire A, Quigley P, Mercier AJ (1995) Physiological effects of two FMRFamide-related peptides from the crayfish *Procambarus clarkii*. *J Exp Biol* 198: 109-116
- Spicer JI, Baden SP (2001) Environmental hypoxia and haemocyanin between-individual variability in Norway lobsters *Nephrops norvegicus* (L.). *Mar Biol* 139: 727-734
- Stankiewicz A (1982) Comparative studies on AMP-deaminase - VII. Purification and some properties of the enzyme from crayfish *Orconectes limosus* tail muscle. *Comp Biochem Physiol* 72B: 127-132
- Stegen (2001) Cardiovasculäre und respiratorische Effekte des Adenosins beim Amerikanischen Hummer *Homarus americanus*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dissertation
- Stegen E, Grieshaber MK (2001) Adenosine increases ventilation rate, cardiac performance and haemolymph velocity in the american lobster *Homarus americanus*. *J Exp Biol* 204: 947-957
- Stehr H (ed) (1988) Insekten und andere Wirbellose. Die Welt der Tiere, Band 10. Mosaik-Verlag, München
- Stone TW (1991) Receptors for adenosine and adenine nucleotides. *Gen Pharmac* 22 (1): 25-31
- Stryer L (1991) Biochemie. Nachdruck der Auflage 1990. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
- Taylor AC (1976) The respiratory responses of *Carcinus maenas* to declining oxygen tension. *J Exp Biol* 65: 309-322
- Taylor AC (1988) The ecophysiology of decapods in the rock pool environment. *Symp zool Soc Lond* 59: 227-261

- Taylor EW, Wheatly MG (1980) Ventilation, heart rate and respiratory gas exchange in the crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet) submerged in normoxic water and following 3 h exposure in air at 15 °C. *Comp Physiol* 138: 67-78
- Teichmann G (1992) William Harvey und das Herzminutenvolumen. *Inn Med* 19: 94-96
- Trapido-Rosenthal HG, Carr WES, Gleeson RA (1989) Biochemistry of purinergic olfaction - The importance of nucleotide dephosphorylation. In: Brand JG, Teeter JH, Cagan RH, Kare MR (eds) *Chemical senses*. Marcel Dekker, New York, 243-262
- Trapido-Rosenthal HG, Carr WES, Gleeson RA (1990) Ectonucleotidase activities associated with the olfactory organ of the spiny lobster. *J Neurochem* 55: 88-96
- Truchot JP (1980) Lactate increases the oxygen affinity of crab hemocyanin. *J Exp Zool* 214: 205-208
- Tucker AL, Linden J (1993) Cloned receptors and cardiovascular responses to adenosine. *Cardiovasc Res* 27: 62-67
- Unger KK (ed) (1989) *Handbuch der HPLC. Teil 1: Leitfaden für Anfänger und Praktiker. 1. Auflage.* GIT Verlag, Darmstadt
- Urich K (1990) Niedermolekulare Stickstoffverbindungen. In: Urich K (ed) *Vergleichende Biochemie der Tiere*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 356-404
- Van Calker D, Müller M, Hamprecht B (1979) Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33: 999-1005
- Van Harreveld A (1936) A physiological solution for freshwater crustaceans. *Proc Soc Exper Biol Med* 34: 428-432
- Van Horne KC (ed) (1993) *Handbuch zur Festphasenextraktion. 1. Auflage.* ict GmbH, Frankfurt
- Vetter RAH, Grieshaber MK (1989) Die Funktion der Uricase bei *Carcinus maenas* als Sauerstoffsensoren. *Verh Dtsch Zool Ges* 82: 234-235
- Walker RJ, Holden-Dye L (1989) Commentary on the evolution of transmitters, receptors and ion channels in invertebrates. *Comp Biochem Physiol* 93A (1): 25-39
- Wehner R, Gehring W (1990) *Zoologie. 22. Auflage.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- West NH (1989) Methods for measuring blood flow and distribution in intermittently-ventilating and diving vertebrates. In: Bridges CR, Butler PJ (eds) *Techniques in comparative respiratory physiology*. Cambridge University Press, 171-193
- Wheatly MG, Taylor EW (1981) The effect of progressive hypoxia on heart rate, ventilation, respiratory gas exchange and acid-base status in the crayfish *Austropotamobius pallipes*. *J Exp Biol* 92: 125-141

- Wilkins JL (1981) Respiratory and circulatory coordination in decapod crustaceans. In: Herreid CF, Fourtner CR (eds) Locomotion and exercise of arthropods. V: Circulation and gas exchange. Plenum Press, New York, 277-298
- Wilkins JL (1993) Re-evaluation of the stretch sensitivity hypothesis of crustacean hearts: hypoxia, not lack of stretch, causes reduction in heart rate of isolated hearts. *J Exp Biol* 176: 223-232
- Wilkins JL (1995) Regulation of the cardiovascular systems in crayfish. *American Zoologist* 35 (1): 37-48
- Wilkins JL, Kuramoto T (1998) Comparisons of the roles of neurohormones in the regulation of blood distribution from the hearts of American and Japanese lobsters. *J Comp Physiol B* 186 (7): 483-490
- Wilkins JL, Young RE (1992) Regulation of pulmonary blood flow and of blood pressure in a mangrove crab (*Goniopsis cruentata*). *J Exp Biol* 163: 297-316
- Wilkins JL, Davidson GW, Cavey MJ (1997a) Vascular peripheral resistance and compliance in the lobster *Homarus americanus*. *J Exp Biol* 200: 477-485
- Wilkins JL, Kuramoto T, McMahon BR (1996) The effects of six pericardial hormones and hypoxia on the semi-isolated heart and sternal arterial valve of the lobster *Homarus americanus*. *Comp Biochem Physiol* 114C: 57-65
- Wilkins JL, Wilkins LA, McMahon BR (1974) Central control of cardiac and scaphognathite pacemakers in the crab, *Cancer magister*. *J Comp Physiol* 90: 89-104
- Wilkins JL, Yazawa T, Cavey MJ (1997b) Evolutionary derivation of the american lobster cardiovascular system: an hypothesis based on morphological and physiological evidence. *Invertebr Biol* 116 (1): 30-38
- Willis R (Übersetzer) (1910) Harvey W, Scientific Papers: Physiology, Medicine, Surgery, Geology, with Introductions, Notes and Illustrations. Vol. 38, The Harvard Classics, New York
- Wollenberger A, Ristau O, Schoffa G (1960) Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke. *Pflügers Arch* 270: 399-412
- Wynants J, Petrov B, Nijhof J, van Belle H (1987) Optimization of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of nucleosides and their catabolites - application to cat and rabbit heart perfusates. *J Chrom* 386: 297-308
- Yazawa T, Kuwasawa K (1992) Intrinsic and extrinsic neural and neurohumoral control of the decapod heart. *Experientia* 48(9): 834-840
- Zeis B, Grieshaber MK (1993) Akkumulation von Urat und Laktat bei Hypoxie - Untersuchungen am Europäischen Hummer *Homarus vulgaris*. *Verh Dtsch Zool Ges* 86: 130

Zeis B, Nies A, Bridges CR, Grieshaber MK (1992) Allosteric modulation of haemocyanin oxygen-affinity by L-lactate and urate in the lobster *Homarus vulgaris*. I. Specific and additive effects on haemocyanin oxygen-affinity. J Exp Biol 168: 93-110

Zeitler K-H (1990) Muscheln, Schnecken, Krebse. Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin

Zimmermann H (1992) 5'-Nucleotidase: Molecular structure and functional aspects. Biochem J 285: 345-365

Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL, Civelli O (1992) Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. Proc Natl Acad Sci USA 89: 7432-7436

Tab. 7.1: Übersicht der Aufbereitung von Hämolymphe und Gewebe zur Bestimmung der Purinderivate Adenosin, Inosin und Urat sowie Messung dieser Nucleotide

	<b>Adenosin</b>	<b>Inosin</b>	<b>Urat</b>
VF der <b>Hämolymphe</b> im PCA-Extrakt	ca. 2	ca. 2	mind. 4
VF des <b>Gewebes</b> im PCA-Extrakt	ca. 3,5	ca. 3,5	ca. 3,5
<b>Hämolymphe:</b> Homogenisation der ausgefällten Proteine	nein	nein	ja
<b>Gewebe:</b> Homogenisation mit dem Ultra-Turrax	3 x 60 s max. Umdrehung	3 x 60 s max. Umdrehung	3 x 60 s max. Umdrehung
Zentrifugation	20 min, 4 °C, 47807 RCF		
Neutralisation des sauren Überstandes mit K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	ja	ja	nein
Zentrifugation	20 min, 4 °C, 47807 RCF		
Festphasenextraktion (SPE)	ja	nein	nein
Eintrocknung im Speed-Vac Concentrator	ja	nein	nein
HPLC-Säule	LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) endcapped		LiChrospher® 60 RP-select B (5µm)
HPLC-Laufmittel	A: 0,03 mol L <sup>-1</sup> Ammoniumacetat, 0,025 mmol L <sup>-1</sup> EDTA, 5 % Methanol; pH 6,2 B: Methanol-Wasser-Gemisch (Verhältnis 2:1)		0,3 mol L <sup>-1</sup> Ammoniumdihydrogenphosphat, 1 % Methanol; pH 2,2
Detektion [nm]	259	248	293

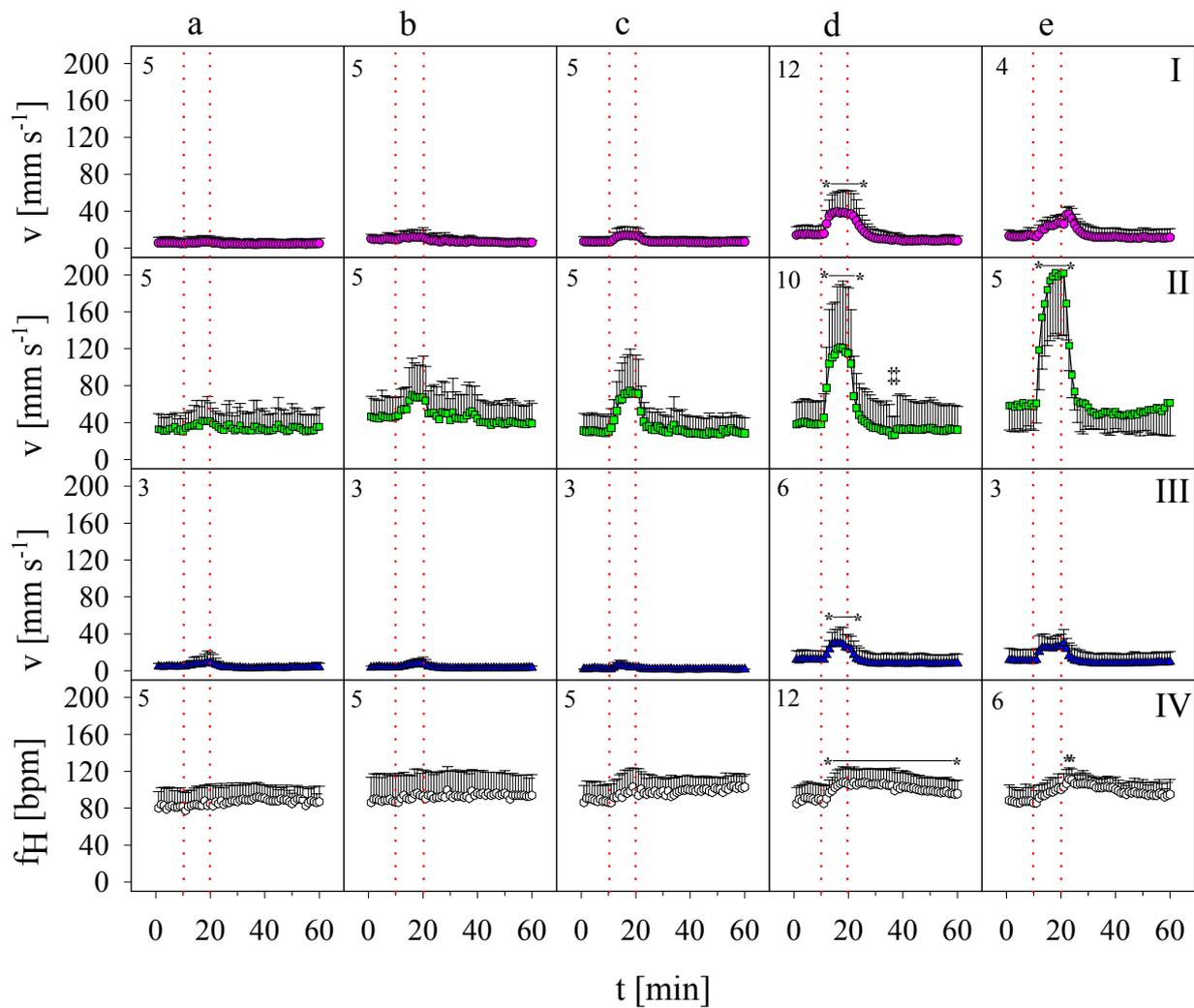


Abb. 7.1: Der Einfluß unterschiedlich konzentrierter Adenosinlösung auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in der A. posterior (I), der A. descendens (II) und der A. lateralis (III) sowie auf die Herzfrequenz (IV) [bpm] bei *Astacus leptodactylus*. Nach einem zehnmütigen Vorlauf ( $t_1$ - $t_{10}$ ) wurde Adenosin in den Konzentrationen a: 0,44; b: 0,88; c: 1,75; d: 3,5 und e: 7,0  $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$  über einen Zeitraum von 10 Minuten infundiert. ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der linken oberen Ecke jeder Graphik geben die Anzahl der Tiere (n) an). \* = signifikant erhöht zu allen zehn Werten des Vorlaufs; ‡ = signifikant erniedrigt zu allen zehn Werten des Vorlaufs

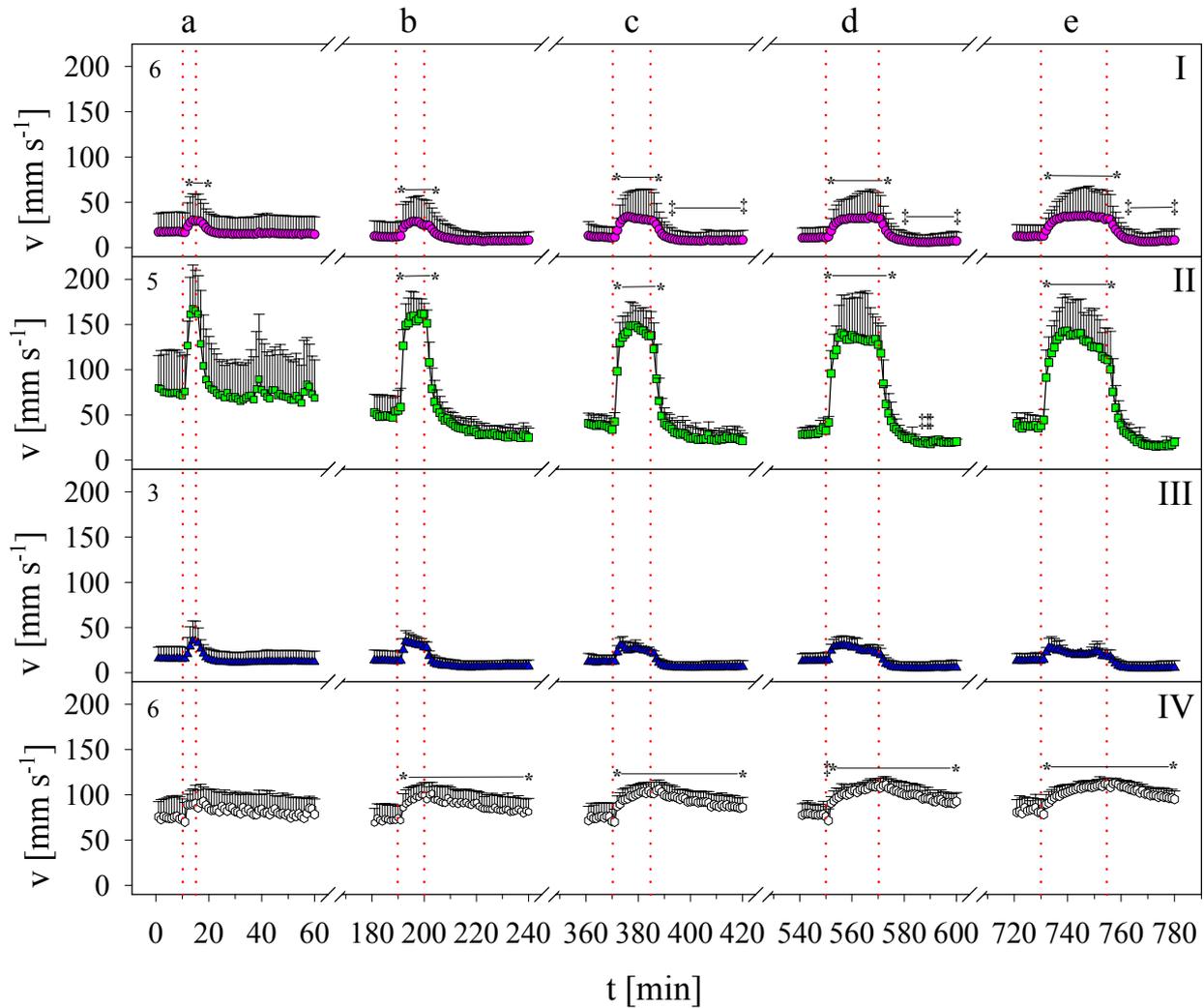


Abb. 7.2: Der Einfluß von  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosinlösung auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in der A. posterior (I), der A. descendens (II) und der A. lateralis (III) sowie auf die Herzfrequenz (IV) [ $\text{bpm}$ ] bei *Astacus leptodactylus* nach unterschiedlich langer Infusion. In dieser, aus fünf Einzelversuchen bestehenden Versuchsreihe, wurde nach einem jeweils zehnminütigen Vorlauf Adenosin über a: 5; b: 10; c: 15; d: 20 und e: 25 Minuten infundiert. Die Erholungszeit zwischen den Infusionen der einzelnen Versuche dauerte von 175 Minuten (a) bis zu 155 Minuten (e). ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der linken oberen Ecke der Graphik geben die Anzahl der Tiere (n) an, wobei eine Ziffer jeweils für alle Messungen eines Gefäßes gilt). \* = signifikant erhöht zu allen zehn Werten des Vorlaufs; ‡ = signifikant erniedrigt zu allen zehn Werten des Vorlaufs.

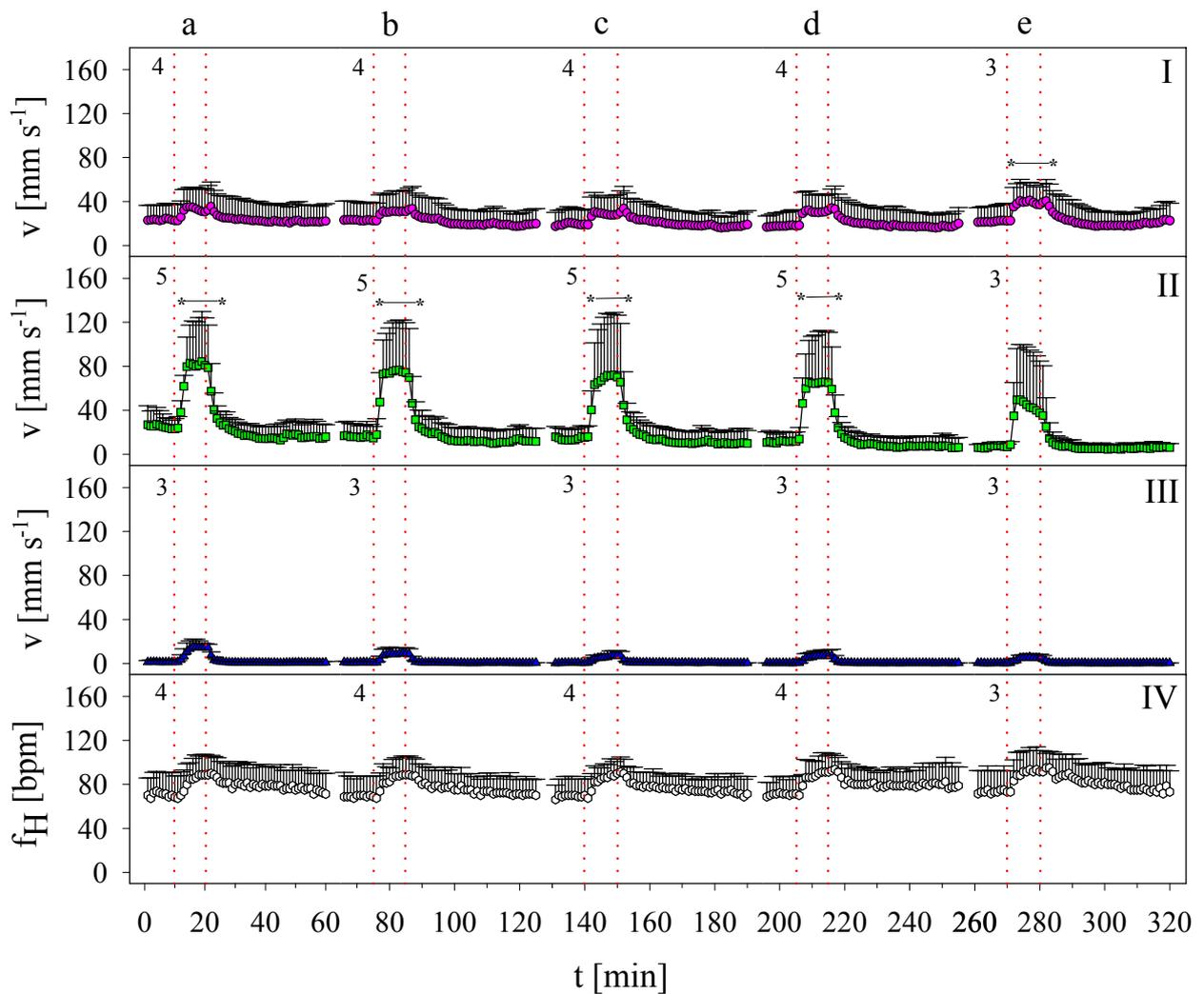


Abb. 7.3: Der Einfluß von  $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  FG Adenosinlösung auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in der A. posterior (I), der A. descendens (II) und der A. lateralis (III) sowie auf die Herzfrequenz (IV) [bpm] bei *Astacus leptodactylus* nach vermehrter Infusion. In dieser, aus fünf Einzelversuchen bestehenden Versuchsreihe (a – e), wurde jeweils nach einem zehnminütigen Vorlauf ebenfalls für 10 Minuten Adenosin infundiert. Die Erholungszeit zwischen den einzelnen Infusionen betrug immer 175 Minuten. ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der linken oberen Ecke der Graphik geben die Anzahl der Tiere ( $n$ ) an). \* = signifikant erhöht zu allen zehn Werten des Vorlaufs.

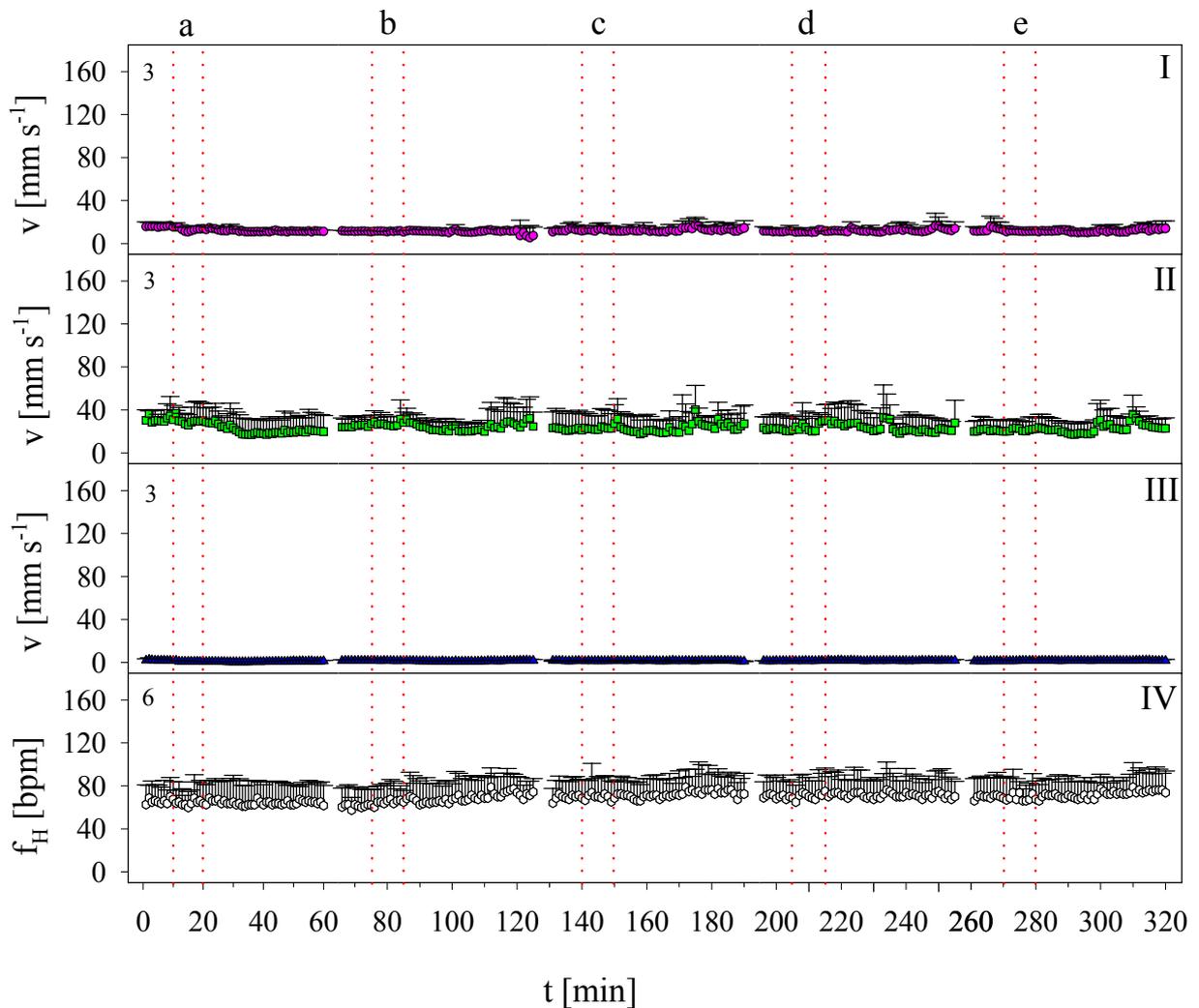


Abb. 7.4: Der Einfluß von Ringer-Lösung auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in der A. posterior (I), der A. descendens (II) und der A. lateralis (III) sowie auf die Herzfrequenz (IV) [bpm] bei *Astacus leptodactylus* nach vermehrter Infusion. In dieser, aus fünf Einzelversuchen bestehenden Versuchsreihe (a – e), wurde jeweils nach einem zehnminütigen Vorlauf ebenfalls für 10 Minuten Ringer-Lösung infundiert. Die Erholungszeit zwischen den einzelnen Infusionen betrug immer 175 Minuten. ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der linken oberen Ecke der Graphik geben die Anzahl der Tiere (n) an, wobei eine Ziffer jeweils für alle Messungen eines Gefäßes gilt).

Abb. 7.5: Der Einfluß von Ringer-Lösung auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [ $\text{mm s}^{-1}$ ] in der A. posterior (I), der A. descendens (II) und der A. lateralis (III) sowie auf die Herzfrequenz (IV) [bpm] bei *Astacus leptodactylus*. Nach einem zehnmütigen Vorlauf ( $t_1-t_{10}$ ) wurde Ringer-Lösung über einen Zeitraum von 10 Minuten infundiert. ( $X \pm \text{SD}$ ; die Ziffern in der linken oberen Ecke jeder Graphik geben die Anzahl der Tiere (n) an).