
Modulation des Herzkreislaufsystems durch Adenosin
und Adeninnukleotide
beim Amerikanischen Hummer, *Homarus americanus*

Inaugural-Dissertation

zur

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

Vorgelegt von

Gereon Maurer

aus Velbert

Düsseldorf, 2006

Aus dem Institut für Zoophysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Manfred K. Grieshaber

Korreferent: Prof. Dr. Christopher R. Bridges

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2007

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG.....	1
2 MATERIAL UND METHODEN.....	12
2.1 VERSUCHSTIERE.....	12
2.2 CHEMIKALIEN	12
2.3 UNTERSUCHUNGEN AM SEMI-ISOLIERTEN (<i>IN SITU</i>) HERZEN	12
2.3.1 <i>Infusionslösungen</i>	13
2.3.1.1 Hummerringe.....	13
2.3.1.2 Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen.....	13
2.3.2 <i>Präparation der semi-isolierten (in situ) Herzen</i>	13
2.3.3 <i>Versuchsaufbau zur Messung der semi-isolierten (in situ) Herzaktivität</i>	14
2.3.4 <i>Versuchsprotokolle zur Bestimmung der semi-isolierten (in situ) Herzaktivität</i>	16
2.3.4.1 Perfusionsversuche	16
2.3.5 <i>Prinzip der Flußmessung</i>	16
2.3.6 <i>Datenaufzeichnung und Auswertung</i>	18
2.4 <i>IN VIVO</i> MESSUNGEN MIT DEM PULSED-DOPPLER-FLOWMETER.....	19
2.4.1 <i>Infusionslösungen</i>	19
2.4.1.1 Ringer-Lösung	19
2.4.1.2 Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen.....	19
2.4.2 <i>Präparation der Versuchstiere</i>	20
2.4.2.1 <i>Präparation der intakten Hummer zur Bestimmung der Fließgeschwindigkeit und der Herzfrequenz mittels der Pulsed-Doppler-Flowmetrie</i>	20
2.4.2.2 <i>Durchtrennung der kardioresulatorischen Nerven</i>	21
2.4.2.3 <i>Scheinpräparationen</i>	21
2.4.3 <i>Versuchsaufbau</i>	22
2.4.4 <i>Versuchsprotokolle</i>	23
2.4.4.1 <i>In vivo</i> Infusionsversuche für intakte und scheinpräparierte Tiere	23
2.4.4.2 <i>In vivo</i> Infusionsversuche für denervierte Tiere	24
2.4.5 <i>Das Prinzip der Dopplermessungen</i>	24
2.4.6 <i>Datenerfassung und Auswertung</i>	27
2.5 BESTIMMUNG DER KONZENTRATIONEN VON DOPAMIN, OCTOPAMIN UND SEROTONIN AUS DER HÄMOLYMPHE UNTER DEM EINFLUß VON ADENOSIN	27
2.5.1 <i>Präparation der Versuchstiere</i>	27
2.5.2 <i>Versuchsaufbau</i>	27

2.5.3	<i>Versuchsprotokoll</i>	28
2.5.4	<i>Probenentnahme</i>	28
2.5.5	<i>Probenvorbereitung zur Quantifizierung von Dopamin, Serotonin und Octopamin</i>	29
2.5.5.1	Dopamin und Serotonin	29
2.5.5.2	Octopamin.....	29
2.5.6	<i>Bestimmung der Aminkonzentration mittels RP-HPLC und elektrochemischer Detektion</i> 29	
2.5.6.1	Bestimmung der Dopamin- und Serotoninkonzentration	29
2.5.6.2	Bestimmung der Octopaminkonzentration	32
2.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	UNTERSUCHUNGEN AM SEMI-ISOLIERTEN (<i>IN SITU</i>) HERZEN	34
3.1.1	<i>Vergleich der Wirkung von Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen auf das semi-isolierte (in situ) Herz</i>	35
3.1.1.1	Perfusion der semi-isolierten (<i>in situ</i>) Herzen mit Adenosinlösung	35
3.1.1.2	Perfusion der semi-isolierten (<i>in situ</i>) Herzen mit AMP-Lösung	37
3.1.1.3	Perfusion der semi-isolierten (<i>in situ</i>) Herzen mit ADP-Lösung	38
3.1.1.4	Perfusion der semi-isolierten (<i>in situ</i>) Herzen mit ATP-Lösung	40
3.1.1.5	Vergleich der Wirkung von Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen auf die semi-isolierte (<i>in situ</i>) Herzaktivität.....	41
3.2	<i>IN VIVO</i> MESSUNGEN MIT DEM PULSED-DOPPLER-FLOWMETER: VERGLEICH ZWISCHEN INTAKTEN TIEREN UND TIEREN DENEN DIE KARDIOREGULATORISCHEN NERVEN DURCHTRENNT WURDEN (DENERVIERTE HUMMER)	45
3.2.1	<i>Vergleich der Herzfrequenz und der Fließgeschwindigkeit unter Adenosineinfluß</i>	46
3.2.1.1	Gesamtvergleich unter dem Einfluß von Adenosin [2,4 nmol min ⁻¹ g ⁻¹ FG].....	46
3.2.1.2	Vergleich der Herzfrequenz unter dem Einfluß verschieden konzentrierter Adenosinlösungen	48
3.2.1.3	Vergleich der Fließgeschwindigkeit in der A. descendens unter dem Einfluß verschieden konzentrierter Adenosinlösungen.....	49
3.2.2	<i>Vergleich der Herzfrequenz und der Fließgeschwindigkeit unter AMP-Einfluß</i>	52
3.2.2.1	Gesamtvergleich unter dem Einfluß von AMP [2,4 nmol min ⁻¹ g ⁻¹ FG]	52
3.2.2.2	Vergleich der Herzfrequenz unter dem Einfluß verschieden konzentrierter AMP-Lösungen	53
3.2.2.3	Vergleich der Fließgeschwindigkeit in der A. descendens unter dem Einfluß verschieden konzentrierter AMP-Lösungen.....	55
3.2.3	<i>Vergleich der Herzfrequenz und der Fließgeschwindigkeit unter ADP-Einfluß</i>	56

3.2.3.1	Gesamttiervergleich unter dem Einfluß von ADP [2,4 nmol min ⁻¹ g ⁻¹ FG].....	56
3.2.3.2	Vergleich der Herzfrequenz unter dem Einfluß verschieden konzentrierter ADP-Lösungen 58	
3.2.3.3	Vergleich der Fließgeschwindigkeit in der A. descendens unter dem Einfluß verschieden konzentrierter ADP-Lösungen	59
3.2.4	<i>Vergleich der Herzfrequenz und der Fließgeschwindigkeit unter ATP-Einfluß</i>	61
3.2.4.1	Gesamttiervergleich unter dem Einfluß von ATP [2,4 nmol min ⁻¹ g ⁻¹ FG]	61
3.2.4.2	Vergleich der Herzfrequenz unter dem Einfluß verschieden konzentrierter ATP-Lösungen 62	
3.2.4.3	Vergleich der Fließgeschwindigkeit in der A. descendens unter dem Einfluß verschieden konzentrierter ATP-Lösungen.....	63
3.2.4.4	Kontrollversuche (Scheinpräparation).....	65
3.2.4.5	Ringerinfusionen.....	67
3.2.5	<i>Infusion von Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen</i>	68
3.2.5.1	Vergleich der Herzfrequenz unter dem Einfluß von Adenosin- und den Adeninnukleotidlösungen [2,4 nmol min ⁻¹ g ⁻¹ FG]	68
3.2.5.2	Vergleich der Fließgeschwindigkeit in der A. descendens unter dem Einfluß von Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen	70
3.3	BESTIMMUNG VON DOPAMIN, SEROTONIN UND OCTOPAMIN	74
4	DISKUSSION	76
4.1	EINFLUß VON ADENOSIN UND DEN ADENINNUKLEOTIDEN AUF DAS SEMI-ISOLIERTE (<i>IN SITU</i>) HERZ.	77
4.2	<i>IN VIVO</i> MESSUNGEN MITTELS DER PULSED-DOPPLER-FLOWMETRIE IN INTAKTEN UND DENERVIERTEN HUMMERN	83
4.2.1	<i>Scheinpräparation und Ringerinfusion</i>	93
4.3	NEUROHORMONE	94
4.4	SPEKULATION ÜBER MÖGLICHE WIRKUNGSVERMITTLUNGEN VON ADENOSIN UND DEN ADENINNUKLEOTIDEN	97
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	102
6	LITERATUR	104
7	ANHANG	115
7.1	PULSED-DOPPLER FLOWMETRIE: ADENOSININFUSION	115
7.2	KONZENTRATIONSABHÄNGIGER VERGLEICH DER FLIEßGESCHWINDIGKEIT IN DER A. POSTERIOR UND DER A. LATERALIS	115
7.3	AMP-INFUSION.....	116

7.4	KONZENTRATIONSABHÄNGIGER VERGLEICH DER FLIEßGESCHWINDIGKEIT IN DER A. POSTERIOR UND DER A. LATERALIS	116
7.5	ADP-INFUSION.....	117
7.6	KONZENTRATIONSABHÄNGIGER VERGLEICH DER FLIEßGESCHWINDIGKEIT IN DER A. POSTERIOR UND DER A. LATERALIS	117
7.7	ATP-INFUSION	118
7.8	KONZENTRATIONSABHÄNGIGER VERGLEICH DER FLIEßGESCHWINDIGKEIT IN DER A. POSTERIOR UND DER A. LATERALIS	118
7.9	INFUSION VON ADENOSIN- UND ADENINNUKLEOTIDLÖSUNGEN.....	119
7.9.1	<i>Herzfrequenz</i>	119
7.9.2	<i>Fließgeschwindigkeit in der Aorta posterior</i>	119
7.9.3	<i>Fließgeschwindigkeit in der Arteria descendens</i>	120
7.9.4	<i>Fließgeschwindigkeit in der Arteria lateralis</i>	121

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
A/D-Wandler	Analog/Digital-Wandler
AID	Analog Input Device
ANOVA	Analysis of Variance
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bpm	beat per minute
CCAP	crustacean cardio active peptide
DA	Dopamin
DHBA	3,4-Dihydroxybenzylamin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
f_H	Herzfrequenz
5-HT	5'-Hydroxytryptamin (Serotonin)
HMV	Herzminutenvolumen
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HSM	HPLC System Manager
I.D.	Innen Durchmesser
IMP	Inosin-5'-monophosphat
IP	Isoproterenol
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid
OA	Octopamin
PCA	Perchlorsäure
PE	Polyethylen
PRPP	5'-Phosphorybosyl-1'-pyrophosphat
P_{vent}	ventrikulärer Druck
PVC	Polyvinylchlorid
RP	reversed-phase
rpm	rounds per minute
SD	Standardabweichung
SV	Schlagvolumen
v	Fließgeschwindigkeit

1 Einleitung

Die decapoden Crustaceen besitzen ein Kreislaufsystem, das aus drei Komponenten besteht: Dem Herzen, dem Verteilungssystem und der Hämolymphe (Wilkens, 1999). Im Vergleich mit dem Kreislauf der Vertebraten wird es traditionell als offener Blutkreislauf beschrieben (Maynard, 1960; Martin und Hose, 1995; McMahon, 1995), da die von dem Herzen ausgehenden Gefäße offen im Gewebe enden und somit letzteres direkt von der Hämolymphe umspült wird. Es fehlen Venen, über welche die Hämolymphe zurück zum Herzen geleitet werden kann. Bisher wurde davon ausgegangen, daß das offene Kreislaufsystem dem geschlossenen der Vertebraten unterlegen sei. Neuere Arbeiten beschreiben jedoch das offene Kreislaufsystem der decapoden Crustaceen als ein komplexes, effizientes sowie regulierbares Organ, das dem System der Vertebraten ebenbürtig ist (McMahon und Burnett, 1990; Reiber und McMahon, 1998). McGaw (2005) bezeichnet das Kreislaufsystem sogar als ein teilweise geschlossenes System, da er für verschiedene Brachyuren zeigen konnte, daß die meisten Sinus mit Membranen ausgekleidet sind.

Das muskuläre, einkammerige Herz des Amerikanischen Hummers, *Homarus americanus*, (Milne Edwards H., 1837) ist über drei Paar flügelartige Ligamente im Perikardialsinus aufgehängt. Durch die rhythmische Kontraktion des Myocardiums wird die sauerstoffreiche Hämolymphe in ein komplexes, arterielles System gepumpt, das sieben Hauptverteilungswege umfasst, die sich im Gewebe immer feiner verzweigen und schließlich offen enden. Sie entsprechen laut Maynard (1960) morphologisch und funktionell den Kapillaren eines geschlossenen Blutkreislaufsystems. Da sie aber bevorzugt die Hämolymphe verteilen, statt dem Gasaustausch zu dienen, ähneln sie laut Martin und Hose (1995) eher Arteriolen. Von ihrem Ende aus fließt die Hämolymphe weiter in Lakunen, in denen die Hämolymphe direkt das Gewebe umspült und somit dem offenen Blutkreislaufsystem seinen Namen gibt. Vom Gewebe kommend, sammelt sich die desoxygenierte Hämolymphe im Peribranchialsinus. Von hier kann sie entweder über die Kiemen und die Branchioperikardialkanäle oder aber über den Branchiostegitenkreislauf, der sich dorsolateral in den Perikardialsinus eröffnet, zurück zum Herzen fließen. Die mit Sauerstoff angereicherte Hämolymphe gelangt dann, ausgehend vom Perikardialsinus, durch drei Paar muskuläre Ostien in das Herz. Bei der Füllung des Herzens, die durch die elastischen Ligamente unterstützt wird, fällt während der Diastole der ventrikuläre Druck unter den Druck des Perikardialsinus. Die Ostien öffnen sich und die Hämolymphe strömt ein. Der Grad der Füllung variiert dabei mit dem Druckgradienten über den Ostien. Während der Systole steigt der Druck, die Ostien schließen sich und die Hämolymphe wird

über die sieben Hauptgefäße im Körper verteilt (McMahon und Burnett, 1990; McMahon, 1995a).

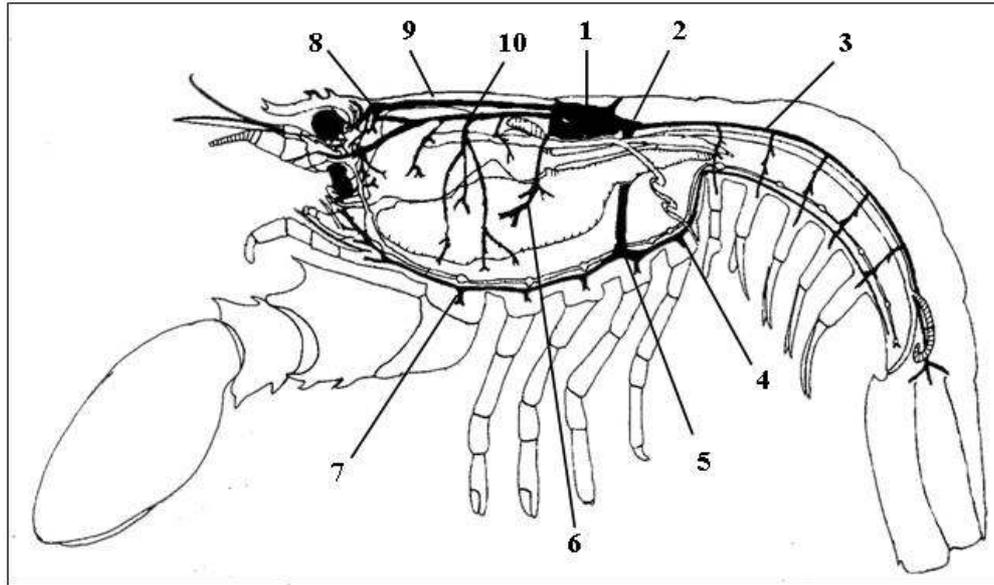


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des offenen Blutkreislaufsystems des Amerikanischen Hummers, *Homarus americanus*. 1. Herz mit Ostien, 2. Bulbus arteriosus, 3. Aorta posterior, 4. kaudale Arteria subneuralis, 5. Arteria descendens, 6. linke Arteria hepatica, 7. rostrale Arteria subneuralis, 8. Cor frontale, 9. Aorta anterior, 10. linke Arteria lateralis. (verändert nach McLaughlin, 1983)

Von diesen verlaufen (Abbildung 1.1) fünf in anteriorer Richtung (Aorta anterior [9], Arteriae laterales [10], Arteriae hepaticae [6]). Ein weiteres Gefäß verläuft nach ventral (Arteria descendens [5]) und eines zum posterioren Pol (Aorta posterior [3]). Augen, Augenmuskulatur, Antennen und Oberschlundganglion werden über die Aorta anterior, die sich dorsal, median unter dem Carapax befindet, mit Hämolymphe versorgt. Oberhalb des Magens erweitert sich das Gefäß zum Cor frontale [8], einem akzessorischen Herzen, das die Verteilung der Hämolymphe unterstützt. Durch die paarige Arteria lateralis werden beide Antennenpaare, die Antennendrüsen, der Magen und das Gastrolithenfeld in der anterioren Körperregion umspült. Neben dem Hepatopankreas erhalten die Gonaden über die paarige Arteria hepatica sauerstoffreiche Hämolymphe. Der kaudale Bereich des Hummers wird zum Teil über die Aorta posterior versorgt, die aus dem sogenannten Bulbus arteriosus [2] entspringt und dorsal zum distalen Pol zieht. Im Bereich des Abdomens gehen segmentale, paarige Verzweigungen von diesem Gefäß ab. Dadurch werden teilweise die Gonaden, der Darm, die Abdominalmuskulatur, die Pleopoden, Uropoden und das Telson mit Hämolymphe beliefert. Ebenfalls aus dem Bulbus entspringt die Arteria descendens, die nach ventral verläuft und sich in die rostrale Arteria subneuralis und die kaudale Arteria subneuralis verzweigt. Über diese werden die Sche-

ren, Schreitbeine, Mundgliedmaßen, Scaphognathiten, die Abdominalmuskulatur und das Bauchmark (ZNS) mit Hämolymphe versorgt (Maynard, 1960; McLaughlin, 1983).

An den Ursprüngen der Gefäße, dicht am Herzen, befinden sich semilunare, muskuläre und innervierte Klappen (Alexandrowicz, 1932). Nur die A. posterior besitzt an ihrem Ursprung keine kardioarteriellen Klappen, sie befinden sich erst an jedem Verzweigungspunkt der Segmentaläste (Wilkens, 1997). Die Klappen verhindern zum einen den Rückfluß der Hämolymphe während der Diastole, zum anderen stellen sie eine wichtige Kontrollstelle in der Verteilung der Hämolymphe unter verschiedenen physiologischen Bedingungen dar (McMahon und Burnett, 1990). Eine der Situation entsprechende Verteilung kann durch neuronale (Fujiwara-Tsukamoto et al., 1992; Kuramoto et al., 1992, 1995) und hormonelle Einflüsse (Kuramoto und Ebara, 1984a; Kuramoto et al., 1992; Wilkens, 1997; Wilkens und Kuramoto, 1998) erfolgen.

Die Gefäße besitzen elastische Eigenschaften (Shadwick et al., 1990). Die während der Systole durch die Dehnung der Gefäßwände erhaltene Energie kann zur Weiterleitung der Hämolymphe genutzt und der durch die Kontraktion entstandene Puls gleichzeitig geglättet werden, vergleichbar dem Windkesseneffekt der Vertebraten. Eine aktive Regulation des Gefäßdurchmessers und damit eine Erhöhung des Widerstandes werden nicht angenommen, da die Gefäße im Gegensatz zu den Vertebraten keine Muskelzellschicht besitzen. Eine Ausnahme bildet hier erneut die A. posterior, die als einziges Gefäß in die Gefäßwand eingestreute Muskelzellen besitzt (Martin und Hose, 1995; Wilkens et al., 1997a). Diese lose orientierten Zellen können durch elektrische Stimulation und durch Proctolin zur Kontraktion gebracht werden (Wilkens et al., 1997b). Eine weitere Möglichkeit zur Regulation des Gefäßwiderstandes wäre durch die Stellung des Abdomens gegeben (Wilkens, 1997). Neuere Untersuchungen an den Arteriae laterales deuten darauf hin, daß es, trotz der fehlenden Muskelzellschichten, durch Stressfasern zu einer Verringerung des Gefäßdurchmessers kommen kann (Chan et al., 2006). Demnach wäre eine Regulation des Widerstandes über den Gefäßdurchmesser denkbar, bleibt aber weiterhin strittig.

Zur Kontrolle des Herzminutenvolumens durch den arteriellen Widerstand trägt somit weniger der Gefäßdurchmesser als der durch die arteriellen Klappen verursachte Widerstand bei. Hauptsächlich wird das Herzminutenvolumen (mL min^{-1}) über die Herzfrequenz (Schlag min^{-1}) und das Schlagvolumen (mL Schlag^{-1}) moduliert. Beide Faktoren können unabhängig voneinander reguliert werden (Wilkens, 1987).

Das Schlagvolumen ist abhängig von der diastolischen Füllung und dem systolischen Auswurf (McMahon und Burnett, 1990). Variationen im diastolischen Endvolumen entstehen

durch Modifikation in der Druckdifferenz zwischen Ventrikel und Perikardialsinus. Die Druckdifferenz kann durch Variation der Ostienöffnung und der Ventrikeldehnung vergrößert werden. Änderungen der Ostienweite wurden bisher nicht untersucht. Der Ventrikel kann hingegen durch die Spannung, die während der Systole in den Ligamenten gespeichert wird, gedehnt werden. Die Ligamente funktionieren nicht nur als elastische Gummibänder, die das Herz in seine ursprüngliche Position zurückversetzen, sondern sie können eventuell auch aktiv kontrahieren (McMahon und Wilkens, 1983). Des Weiteren könnte das Ventrikelvolumen durch das ebenfalls innervierte Perikardialseptum vergrößert werden (Alexandrowicz, 1932). Beide Möglichkeiten wurden aber bisher nicht eingehend untersucht.

Variationen im Hämolymphauswurf während der Systole sind abhängig von der Kontraktionskraft des Herzens und dem Widerstand des Gefäßsystems (McMahon und Burnett, 1990). Für den Widerstand im arteriellen System sind hauptsächlich die oben erwähnten arteriellen Klappen verantwortlich. Die Kontraktionskraft kann unter anderem über das Herzganglion reguliert werden.

Der Herzschlag des neurogenen Herzens wird durch eine kurzdauernde, hochfrequente Folge von Aktionspotentialen, die durch das Y-förmige, semiautonome Herzganglion generiert werden, initiiert (Alexandrowicz, 1932; Anderson und Cooke, 1971; Cooke, 1988, 2002). Des Weiteren kontrolliert das Herzganglion die Herzfrequenz und die Kontraktionskraft des Herzmuskels. Das aus neun Nervenzellen bestehende Herzganglion liegt an der inneren dorsalen Wand des Herzens. Vier kleinere posterior gelegene Zellen, die als Schrittmacher dienen, erzeugen in den fünf großen anterior gelegenen Zellen excitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP's). Über die fünf großen Zellen werden dann die Herzmuskelfasern polyneuronal innerviert, so daß das gesamte Myocardium synchron kontrahiert (Alexandrowicz, 1932; Maynard, 1953; Anderson und Cooke, 1971; Kuramoto und Kuwasawa, 1980; Cooke, 1988; Berlind, 1989). Eine Variation der Kontraktion des Myocardiums ist möglich, da das Herz nicht nach dem „Alles-oder-nichts-Prinzip“ wie das der Vertebraten schlägt. Abstufungen entstehen durch die Dauer oder die Intensität der „bursts“ und durch die Anzahl der feuernenden Neurone bzw. durch die Muskeleinheiten, die innerviert werden. (Florey, 1960; Maynard, 1960; McMahon und Burnett, 1990).

Neben den autoregulatorischen Mechanismen des Herzens kann die Herzaktivität durch weitere externe Einflüsse modifiziert werden. Kardioregulatorische Nerven, welche die Verbindung zum zentralen Nervensystem herstellen, innervieren das Herzganglion und können die Herzaktivität positiv wie negativ chronotrop und auch inotrop beeinflussen. Sie bestehen aus zwei Paar excitatorischen und einem Paar inhibitorischen Fasern und haben ihren

Ursprung im Unterschlundganglion (Alexandrowicz, 1932). Im Bereich des Herzens verlaufen sie über die dorsolateralen Ligamente, durchqueren die dorsale Wand des Herzens und stehen dann über Synapsen mit dem Herzganglion in Verbindung. Wilkens und Walker (1992) konnten für semi-isolierte Herzen zeigen, daß eine Stimulation der hemmenden Fasern zu einer Bradykardie bzw. sogar zu einem Herzstillstand führt, wohingegen die Stimulation der excitatorischen Fasern in einer Zunahme der Herzfrequenz und der Kontraktilität des Herzens resultiert.

Neben dem Herzganglion werden auch die Ligamente und das Perikardialorgan durch die dorsalen Nerven innerviert (Alexandrowicz, 1932, Alexandrowicz und Carlisle, 1953). Das Perikardialorgan ist ein Plexus von neurosekretorischen Neuronen und Endigungen, die im Perikardialsinus angesiedelt sind und lateral zum Herzen liegen (Alexandrowicz, 1953). Das Perikardialorgan enthält Amine wie Dopamin, 5-Hydroxytryptamine, Octopamin und die Peptide Proctolin, CCAP (Crustacean cardio active peptide) und verschiedene FMRFamide-ähnlichen Peptide (F1 und F2) (Cooke und Sullivan, 1982). Die genannten Neurohormone spielen neben den dorsalen Nerven eine wichtige Rolle in der Modulation der Herzaktivität. Werden sie in die Hämolymphe freigesetzt, können sie zum einen direkt auf das Herzganglion einwirken, zum anderen das Myocardium direkt beeinflussen (Cooke und Sullivan, 1982). In zahlreichen Untersuchungen wurden für die durch das Herz perfundierten oder in den Perikardialsinus infundierten Neurohormone positiv chronotrope und inotrope Wirkungen nachgewiesen. (Wilkens und McMahon, 1992; Yazawa und Kuwasawa, 1992; Wilkens und Mercier, 1993; Wilkens et al., 1996; 2005; Saver und Wilkens, 1998; Saver et al., 1998).

Auch negativ chronotrope und inotrope Einflüsse wurden in neueren Untersuchungen an *H. americanus* durch Stickstoffmonoxid beschrieben (Mahadevan et al., 2004). NO ist ein ubiquitäres Signalmolekül in Vertebraten und Invertebraten (Hanafy et al., 2001; Palumbo, 2005). Neben seinen vasodilatatorischen Eigenschaften (Ignarro, 1999) beeinflusst NO die Herzfunktion (Balligand et al., 1993; Gyurko et al., 2000) und synaptische Transmission (Schuman und Madison, 1994). In *H. americanus* übt NO seine hemmenden Wirkungen durch eine Beeinflussung des Herzganglions, nicht aber des Herzmuskels aus. Mahadevan und Mitarbeiter (2004) stellten daher die Hypothese auf, daß NO als inhibitorischer Neurotransmitter fungiert. Einen Einfluß auf das isolierte Herzganglion wurde auch für *Cancer productus* durch Scholz, et al. (2002) gezeigt.

Neben den oben genannten Modulatoren der Herzaktivität spielen externe Umwelteinflüsse ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Modulation der Herzaktivität. Insbesondere der Transfer von Sauerstoff und Kohlendioxid zwischen Kiemen und Gewebe muß in angepasster

Weise aufrechterhalten werden. Diese Funktion sollte, um einen möglichst aeroben Metabolismus zu garantieren bzw. eine bereits eingegangene Sauerstoffschuld auszugleichen, auch unter funktionsbedingter und biotopbedingter Hypoxie gewährleistet sein. Aus diesem Grund müssen die Herzaktivität, das Gefäßsystem, die Sauerstofftransportkapazität der Hämolymphe und die damit verbundene Ventilation den gegebenen Bedingungen angepasst werden.

Aktivitäten wie „Laufen“ (*H. americanus*) und „Eingraben“ (*Cancer magister*) führen in erster Linie zu einer gesteigerten Herzrate und einem gesteigerten Schlagvolumen, was wiederum ein gesteigertes Herzminutenvolumen zur Folge hat. Des Weiteren erfolgt eine Zunahme der Ventilationsfrequenz und damit verbunden ein erhöhter Wasserstrom über die Kiemen (DeWachter und McMahon, 1996; Rose et al., 1998, 2001; McGaw, 2004). DeWachter und McMahon (1996) und McGaw (2004) beobachteten zusätzlich eine Umverteilung der Hämolymphe, weg von den inneren Organen, hin zur Laufmuskulatur und den Kiemen. Starkes, exzessives Schwanzschlagen, das während einer Fluchtreaktion beobachtet wird, führte ebenso zu einem erhöhten Hämolymphefluß und einer gesteigerter Herzfrequenz wie zu einer Zunahme der Scaphognathitenfrequenz (Stegen, Maurer und Grieshaber, in Vorbereitung).

Werden Crustaceen sinkenden Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt, wie es während einer biotopbedingter Hypoxie der Fall ist, nimmt die Herzrate kontinuierlich ab. Im Gegensatz dazu erhöht sich die Scaphognathitenfrequenz bis zu einer Sauerstoffspannung von 30 - 40 mmHg und fällt erst dann ab (McMahon und Wilkens, 1975). Dabei wird das Herzminutenvolumen, bedingt durch die Zunahme des Schlagvolumens, beibehalten (McMahon, 1992) oder sogar gesteigert (Airriess und McMahon, 1994 (*Cancer magister*); Reiber und McMahon, 1998 (*Procamberus clarkii* und *Homarus americanus*). Die genannten Autoren beobachteten ebenfalls eine regionale Umverteilung der Hämolymphe. Diese wurde ausgehend von den Eingeweiden zu den Kiemen, zur Gliedmaßenmuskulatur, zum zentralen Nervensystem und zu den sensorischen Anhängen im Kopfbereich hin neu verteilt.

Das gesteigert Herzminutenvolumen und die Verteilung der Hämolymphe ermöglichen eine bessere Durchblutung der Kiemen. Verbunden mit der erhöhten Ventilationsfrequenz, führt dies zu einer besseren Beladung der Hämolymphe mit Sauerstoff. Eine weitere Anpassung betrifft die verbesserte Sauerstofftransportkapazität der Hämolymphe. Bridges und Morris (1986) sowie Mangum (1983) zeigten, daß anorganische Ionen wie Mg^{2+} , Ca^{2+} und Cl^- die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins erhöhen. Des Weiteren führen L-Laktat (Truchot, 1980) und Urat (Morris et al., 1985; Bridges und Morris, 1986; Lallier et al., 1987; Zeis et al., 1992; Zeis und Grieshaber, 1993) ebenfalls zu einer Verbesserung des Sauerstofftransportes durch Hämocyanin unter hypoxischen Bedingungen. Eine Akkumulation von Urat konnte während

biotopbedingter Hypoxie in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* (Czytrich, 1990; van de Meer, 2004) und *Carcinus maenas* (Lallier et al., 1987) nachgewiesen werden. Urat kann dann in der Hämolymphe akkumulieren, wenn die sauerstoffabhängige Uricase durch Sauerstoffmangel gehemmt ist und Urat daher nicht weiter abgebaut werden kann. Urat selbst ist ein Zwischenprodukt des ATP-Katabolismus. Ein weiteres Zwischenprodukt des ATP-Abbaus, dem eine Rolle in der Verbesserung der Sauerstoffversorgung zugesprochen wird, ist Adenosin.

In vivo infundiertes Adenosin steigert in *H. americanus* die Herzfrequenz und die Fließgeschwindigkeit in der A. descendens, A. anterior sowie A. posterior und erhöht die Ventilationsfrequenz des Scaphognathiten (Stegen und Grieshaber, 2001). Van de Meer (2004) konnte in *Astacus leptodactylus*, ebenfalls während einer Adenosininfusion, eine Zunahme der Herzfrequenz und der Fließgeschwindigkeit beobachten. Neben Adenosin führten ebenfalls ATP, ADP und AMP zu gesteigerten Herzraten und Fließgeschwindigkeiten in beiden Crustaceen.

1929 beschrieben Drury und Szent-Györgyi zum ersten Mal die kardiovaskulären Eigenschaften von Adenosin. In ihren Experimenten riefen sie durch die Infusion dieses Nucleosids eine Bradykardie und eine Vasodilatation der Coronargefäße in Hundeherzen hervor. Seitdem galt der Wirkung des Adenosins auf das Herzkreislaufsystem ein besonderes Interesse. Adenosin ist ein potenter, extrazellulärer Mediator im Herzen (Berne, 1963; Dobson, 1983, Dobson und Fenton, 1983; Dobson und Schrader, 1984; Berne et al., 1987; Fredholm und Dunwiddie, 1988; Belardinelli et al., 1989, 1991; Pelleg et al., 1990). Die durch Adenosin vermittelten Effekte können Gewebezellen direkt oder über das Nervensystem indirekt beeinflussen. Adenosin kann so zu vasodilatatorischen, negativ chronotropen, inotropen, dromotropen und anti-adrenergen Wirkungen führen. Auf diese Weise unterstützt Adenosin, in der Regel, die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Sauerstoffversorgung und Sauerstoffbedarf unter hypoxischen und ischämischen Bedingungen. Darüber hinaus dienen diese Effekte dem Zell bzw. dem Gewebeschutz (Schrader, 1990; Bruns, 1991).

Drury und Szent-Györgyi (1929) untersuchten nicht nur die Wirkung von Adenosin auf das Herzkreislaufsystem, sondern sie entdeckten auch die kardiovaskulären Eigenschaften von ATP. Die von ATP verursachten direkten und indirekten Effekte auf das Herz sind in Tabelle 1.1 vergleichend mit Adenosin, dargestellt. So führt ATP unter anderem über die Stimulation sympathischer und parasympathischer afferenter Nerven zu einer Verlangsamung des Herzschlags (Pelleg et al., 1997). Bereits 1959 gab es erste Hinweise, daß ATP als Neurotransmitter fungiert (Holton, 1959) und Burnstock et al. lieferten 1970 den Beweis dafür.

Weitere Untersuchungen bestätigten die Rolle als Neurotransmitter, unter anderem in Form der Cotransmission. ATP vermittelt mit Katecholaminen im peripheren und zentralen Nervensystem wichtige Funktionen (Burnstock, 1976, 1999; 2004; 2006a, b). Freigesetzt aus perivaskulären sympathischen Nerven führt ATP, z. B. durch Bindung an seinen Rezeptor, zur Kontraktion der glatten Muskulatur und damit zu einer Vasokonstriktion.

Tabelle 1.1: Effekte von Adenosin und ATP auf das Herz

	Adenosin	ATP
Koronare Vasodilatation	+	+
Koronare Vasokonstriktion	-	+
Negativ chronotrop	+	+
Negativ dromotrop	+	+
Negativ inotrop	+	+
Direkte elektrophysiologische Effekte auf Myocyten	+	?
Anti-adrenerg	+	?

Aus: Drury und Szent-Györgyi, 1929; Berne, 1963; Gerlach et al., 1963; Burnstock und Meghji, 1983; Burnstock und Kennedy, 1985; Ribeiro und Lima, 1985; White und Angus, 1987; Berne et al., 1987; Hopwood und Burnstock, 1987

ATP kann aber auch über nicht-neuronale Zellen seine Wirkung vermitteln (Abbrachio und Burnstock 1998; Burnstock und Knight, 2004). So zeigten neuere Untersuchungen, daß die von Berne 1963 postulierte Hypothese, daß Adenosin der alleinige, lokale Regulator des Blutflusses sei, revidiert werden muß. Es wird angenommen, daß ATP, das während Hypoxie aus Endothelzellen und aus aggregierten Blutplättchen freigesetzt wird, über spezifische Rezeptoren zur Ausschüttung von NO führt, das nachfolgend eine Vasodilatation auslöst. Das freigesetzte ATP wird dann über eine Kaskade zu Adenosin abgebaut, das durch eine direkte Wirkungsvermittlung auf die glatte Muskulatur über Oberflächenrezeptoren die durch NO ausgelöste Vasodilatation unterstützt. (Kelm und Schrader, 1988; Ralevic und Burnstock, 1998, Burnstock, 2002, 2006a;).

Sowohl Adenosin als auch ATP, ADP und AMP vermitteln ihre Wirkung über verschiedene Oberflächenrezeptoren, die entweder auf Nervenzellen oder aber auf anderen Zielzellen lokalisiert sind. Unterteilt werden diese in den P1- für Adenosin und AMP und den P2-Rezeptor für ATP und ADP (Burnstock, 1978). Mittlerweile wurden von den G-Protein-gekoppelten P1-Rezeptoren vier Subtypen cloniert. Diese sind molekular, biochemisch und pharmakologisch charakterisiert und nach ihren Eigenschaften in A1, A2A, A2B und A3 un-

terteilt (Ralevic und Burnstock, 1998). Die P2-Rezeptoren wurden 1985 von Burnstock und Kennedy in zwei Hauptfamilien unterteilt: Die P2Y-Familie, bestehend aus acht Subtypen, ist ebenfalls G-Protein-gekoppelt, während die P2X-Familie, bestehend aus sieben Subtypen, ligandenkontrollierte Ionenkanal-Rezeptoren darstellt (Burnstock 2004b Illes, 2000). Die verschiedenen Rezeptortypen sind auf unterschiedlichen Zellen lokalisiert und vermitteln, je nach Zielzelle und Organ, verschiedenartigste Effekte (Shryock und Belardinelli, 1997; Mubagwa und Fleming, 2001; Burnstock, 2006c).

Da für Invertebraten ebenfalls rezeptorvermittelte Effekte beschrieben wurden (Cox und Walker, 1987; Hoyle und Greenberg, 1988; Burnstock, 1996), ist davon auszugehen, daß die von Stegen und Grieshaber (2001) untersuchten Wirkungen von Adenosin und seinen Nukleotiden auf das Herzkreislaufsystem des Amerikanischen Hummers ebenfalls rezeptorvermittelt sind. In die Hämolymphe infundiertes Adenosin steigerte die Herzfrequenz und Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe in verschiedenen Gefäßen. Van de Meer (2004) konnte diese Befunde auch für den Galizischen Flusskrebs, *Astacus leptodactylus*, bestätigen.

Adenosin, zusammen mit den Nukleotiden und Urat, führt also auf zwei verschiedenen Ebenen des Kreislaufsystems zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung während hypoxischer Bedingungen. Adenosin und die Purine vermitteln auf der Ebene des Herzens (Zunahme der Herzfrequenz) sowie des Kreislaufsystems (gesteigerte Fließgeschwindigkeit) und beschleunigen so den Transport der Hämolymphe, während Urat auf Ebene der Hämolymphe für einen verbesserten Sauerstofftransport durch eine erhöhte Sauerstoffaffinität des Hämocyanins sorgt. Beide Regulationsmechanismen können auf diesem Weg zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung unter Sauerstoffmangelsituationen beitragen.

Es stellt sich nun die Frage nach dem Ursprung bzw. der Bildung der Purine im Organismus. ATP wird zum einen als Neurotransmitter im peripheren und zentralen Nervensystem freigesetzt. Zum anderen kann es durch mechanische Beanspruchung aus gesunden Zellen sowie während Hypoxie aus Endothelzellen über einen ABC-Transporter freigesetzt werden (Bodin und Burnstock, 2001; Zimmermann, 2001).

Adenosin kann unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen sowohl intrazellulär als auch extrazellulär gebildet werden. Unter normoxischen Bedingungen entsteht intrazellulär ein Grundgehalt an Adenosin aus S-Adenosylhomocystein (SAH) (Daly, 1982; Lloyd, et al., 1988). Dabei handelt es sich um ein Seitenprodukt, das während der Methylierung durch S-Adenosylmethionin entsteht. Da Methylierungen in der Regel nicht mit dem Energiestatus der Zelle gekoppelt sind (Bruns, 1991), spielt dieser Weg der Adenosinbildung unter hypoxischen Bedingungen keine Rolle (Deussen et al., 1988; Lloyd et al., 1988).

Extrazellulär entsteht Adenosin durch die Aktivität einer ecto-5'-Nukleotidase. ATP, das z.B. als Neurotransmitter aus Nervenendigungen freigesetzt worden ist, wird über eine Kaskade von Reaktionsschritten, an denen Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen, Nukleotid-Pyrophosphatasen, eine alkalische Phosphatase und eine 5'-Nukleotidase beteiligt sind, zu Adenosin abgebaut (Zimmermann, 2001). Adenosin kann dann über einen Feedback-Kreislauf als Neuromodulator wirken und eine weitere Ausschüttung von ATP und einem Katecholamin (Dopamin, Acetylcholin u. a.) regulieren (Burnstock, 2004a, 2006a, b).

Während hypoxischer Bedingungen sowie während exzessiver Muskelaktivität, falls das Gleichgewicht zwischen Energie-Versorgung und -Verbrauch verschoben ist, entstehen Adenosin und Urat durch den ATP-Katabolismus (Daly, 1982; Sparks und Bardenheuer, 1986; Bruns, 1991). Dabei wird ATP über ADP zu AMP dephosphoryliert. AMP wird auf zwei Wegen abgebaut, die zum einen über Adenosin, zum anderen über IMP zum Inosin führen. Der erste Weg wird durch eine 5'-Nukleotidase katalysiert, von der verschiedene intra- und extrazelluläre Isoformen existieren (Zimmermann, 1992, 2000, 2001). Dabei ist die Konzentration des Adenosins abhängig von den Aktivitäten der 5'-Nukleotidase, der Adenosinkinase und der Adenosindesaminase. Die Adenosinkinase rephosphoryliert Adenosin unter Verbrauch von ATP zu AMP und die Adenosindesaminase führt zur Bildung von Inosin. Erhöht sich die Aktivität der 5'-Nukleotidase, aktiviert durch Mg^{2+} , das durch die Hydrolyse von ATP freigesetzt wird (Darvish und Mattig, 1993), und wird die Aktivität der Adenosinkinase durch Substrat gehemmt, kann genügend Adenosin entstehen (Arch und Newsholm, 1978), daß dann aus der Zelle ausgeschleust werden kann.

Der zweite Weg zum Inosin wird durch die AMP-Desaminase und eine IMP-spezifische 5'-Nukleotidase katalysiert. Die Rückreaktion verläuft hier unter Verbrauch von Aspartat über Adenylosuccinat (Urich, 1990). IMP ist bei der *de novo*-Purinsynthese das primäre Produkt, wenn es nicht neben AMP und GMP bei der weniger aufwendigen Wiederverwertungsreaktion (salvage pathway) unter PRPP-Verbrauch entsteht. Nach Claybrook (1983) fehlt Crustaceen aber die Fähigkeit zur *de novo*-Purinbiosynthese.

In Vertebraten (Gerlach, 1963; Fjísawa und Yoshino, 1987) und Invertebraten scheinen beide Wege beschränkt zu werden. Stankiewicz (1982) sowie Raffin und Thebault (1987) zeigten den Weg von AMP über IMP durch die Aktivität der AMP-Desaminase in der Abdominalmuskulatur von *Orconectus limosus* und *Palaemon serratus*. Der Weg über die 5'-Nukleotidase wurde ebenfalls in der Abdominalmuskulatur verschiedener decapoder Crustaceen durch Lazou (1989) und in *Homarus* durch Stegen, Maurer und Grieshaber (in Vorbereitung) nachgewiesen. Die Adenosindesaminase-Aktivität wurde für den Flusskrebs und Hummer so-

wohl im Gewebe als auch in der Hämolymphe gefunden (Arch und Newsholm, 1978; Roush und Betz, 1956; Stegen, Maurer und Grieshaber, in Vorbereitung). Somit ist der Abbau von AMP über Adenosin zum Inosin möglich. Das erklärt auch die signifikante Zunahme des Adenosin Gehaltes in der Abdominalmuskulatur des Amerikanischen Hummers (Stegen, Maurer und Grieshaber, in Vorbereitung) und des Galizischen Flusskrebsses (van de Meer, 2004) während exzessiven Schwanzschlagens. Bis zum Urat wird Inosin über Hypoxanthin und Xanthin abgebaut. Unter normoxischen Bedingungen entsteht dann aus Urat über Allantoin, Allantoinsäure und Harnstoff, Ammoniak und Kohlendioxid (Claybrook, 1983). Unter Sauerstoffmangel kann Urat akkumulieren, da die Uricase sauerstoffabhängig ist (Dykens, 1991). Czytrich (1990) und van de Meer (2004) konnten eine Akkumulation in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* unter biotopbedingter Hypoxie nachweisen.

Freies Adenosin und freie Adeninnukleotide sind in der Hämolymphe des Hummers durchaus möglich und könnten als metabolische Regulatoren einige vegetative Leistungen des Hummers beeinflussen. Ziel dieser Arbeit war es deshalb zu klären, über welchen Weg Adenosin, AMP, ADP und ATP zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung von *Homarus americanus* beitragen können. Durch eine semi-isolierte (*in situ*) Herzpräparation, in der hormonelle und neuronale Einflüsse ausgeschlossen sind, sollte der Einfluß von Adenosin und seiner Nukleotide untersucht werden. In weiteren Präparationen wurde die Wirkung von Adenosin und den Adeninnukleotiden *in vivo* sowohl in intakten als auch in Tieren, denen die kardioregulatorischen Nerven durchtrennt wurden (im weiteren als denervierte Tiere bezeichnet), bestimmt und verglichen. Da die Purine ihre Wirkung eventuell über Hormone auslösen, sollte zusätzlich der Gehalt dreier Neurohormone in der Hämolymphe unter Adenosineinfluß bestimmt werden.

Insbesondere sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Vermitteln Adenosin und seine Vorläufersubstanzen direkte Effekte auf das Herz des Amerikanischen Hummer, *Homarus americanus*?
- Werden die Effekte indirekt über das zentrale Nervensystem oder über Neurohormone auf das Herz übertragen?
- Verändern sich unter Adenosineinfluß die Konzentrationen von Dopamin, Octopamin und Serotonin in der Hämolymphe des Amerikanischen Hummers?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für Versuche, die am Department of Biological Science der University of Calgary, Kanada durchgeführt wurden, sind Amerikanische Hummer (*Homarus americanus*) über einen ortsansässigen Fischgroßhändler (City Fish) bezogen worden. Die Tiere, deren Gewicht zwischen 500 und 600 g lagen, wurden entweder sofort für die Versuche eingesetzt oder kurzzeitig, maximal bis zu einer Woche, in einer Seewasseranlage bei 12 °C und einer Salinität von 32 ‰ gehältert. Innerhalb dieses Zeitraumes wurden die Tiere nicht gefüttert.

Für die in Düsseldorf durchgeführten Versuche wurden Amerikanische Hummer über die Metro (Düsseldorf) bezogen. Die zwischen 500 und 700 g schweren Tiere wurden in belüftetem künstlichen Seewasser bei einer Temperatur von 15 ± 2 °C, einer Salinität von 35 ± 1 ‰ und einem pH-Wert von $7,8 \pm 0,3$ gehältert. Der Nitritwert wurde regelmäßig kontrolliert und so eingestellt, daß er nicht mehr als $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ betrug. Einmal wöchentlich wurden die Tiere mit Kalmar oder Sardinen gefüttert.

Für die jeweiligen Versuche wurden nur Tiere eingesetzt, die sich in einem Zwischenhäutungsstadium befanden.

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Acros (Geel, Belgien), Appli-Chem (Darmstadt), Baker (Deventer, Niederlande), BDH Inc. (Toronto, Kanada), Calbiochem (San Diego, USA), Fischer Scientific (New Jersey; USA), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

2.3 Untersuchungen am semi-isolierten (*in situ*) Herzen

Die semi-isolierte (*in situ*) Herzpräparation, basierend auf der Methode von Wilkens und Mercier (1993), ermöglicht es, direkte Effekte unabhängig von nervösen und hormonellen Einflüssen auf das Herz decapoder Crustaceen zu untersuchen. Die Methode erlaubt es, den ventrikulären Druck [P_{vent} , kPa], das Herzminutenvolumen [mL min^{-1}], die Herzfrequenz [bpm] und das Schlagvolumen [mL Schlag^{-1}] zu bestimmen (Wilkens und McMahon, 1994). Sie wird von Wilkens und Mercier (1993) als *in situ* Präparation bezeichnet, um diese Methode deutlich von isolierten Herzpräparationen abzugrenzen.

2.3.1 Infusionslösungen

2.3.1.1 Hummerringer

Als Perfusionslösung und als Lösungsmittel für Adenosin und die Adeninnukleotide diente eine Ringer-Lösung, die aus 530 mmol L^{-1} NaCl, $10,7 \text{ mmol L}^{-1}$ KCl, 18 mmol L^{-1} $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, $24,6 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, 3 mmol L^{-1} Tris Base[®] bestand und auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt wurde.

2.3.1.2 Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen

Für die Perfusionen wurden von Adenosin, AMP, ADP und ATP 10 mmol L^{-1} Stammlösungen in Ringer hergestellt. Ausgehend von diesen Stammlösungen wurden die Adenosin- und die Adeninnukleotidlösungen auf 1 mmol L^{-1} , $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ und 5 mmol L^{-1} verdünnt.

2.3.2 Präparation der semi-isolierten (in situ) Herzen

Den Hummern wurde nach hypothermaler Anästhesie auf Eis mittels einer Knochenschere das Rostrum entfernt. Dabei wurde das Cerebralganglion zerstört, das zwischen den Augen dorsal zum Ösophagus liegt. Im Anschluß wurden das Abdomen und die Scheren abgetrennt. Ausgehend vom posterioren Ende wurden dann laterale Schnitte auf Höhe der Branchiostegiten in anteriorer Richtung geführt. Circa einen Zentimeter hinter der Cervicalfurche wurde ein transversaler Schnitt über den dorsalen Carapax gesetzt. Das Carapaxstück wurde in einer mit Ringer gefüllten Präparationsschale von dem auf dem Herz liegenden Darm, den Gonaden sowie dem Hepatopankreas befreit und mehrfach mit Ringer gespült. Das freiliegende Herz mit dem darüber befindlichen Perikardialseptum wurde mit der ventralen Seite nach oben in das eigentliche Organbad überführt und mit Hilfe von Nadeln befestigt (Abb. 2.1). Im weiteren Verlauf der Präparation wurden alle Gefäße bis auf die Aorta posterior und die Arteria descendens mit einem 1.0-Nähseidefaden (© Ethicon Inc. USA) dicht am Herzen abgebunden. In die Aorta posterior wurde ein Polyethylenröhrchen (I.D. 2,27 mm), das spitz ausgezogen war und dadurch annähernd den gleichen Innendurchmesser besaß wie das Gefäß selber, eingeführt. Laut Reiber et al. (1997) beträgt der mittlere Gefäßdurchmesser der A. posterior 1,86 mm. Das Polyethylenröhrchen war über einen Schlauch gleichen Durchmessers mit einem In-Line Fluss-Sensor (Typ 2, I.D. 3,2 mm) und einem Einkanal T106 Animal Research Flowmeter (beide Transonic Systems Inc., Ithaca, USA) verbunden. Im Anschluß wurde die Arteria descendens abgebunden, so daß der gesamte Herzauswurf über die Aorta posterior und das Flowmeter geleitet wurde. Somit entsprach der gemessene Fluß [mL min^{-1}] dem

Herzminutenvolumen. Die A. posterior wurde gewählt, da sie das einzige Gefäß ist, an deren Ursprung keine muskuläre kardiovaskuläre Klappe sitzt.

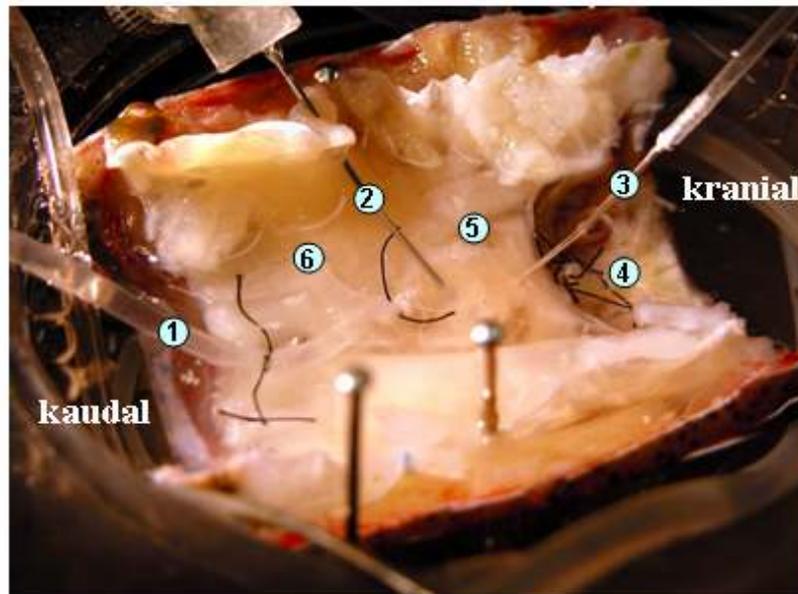


Abb. 2.1: Darstellung des semi-isolierten Herzens im Organbad nach beendeter Präparation. 1: Aorta posterior mit angeschlossener Polyethylenkanüle zur Bestimmung des Herzauswurfs [mL min^{-1}], 2: Infusionskatheter, 3: Kanüle mit angeschlossener Druckaufzeichner [kPa], 4: Abgebundene A. hepaticae, A. laterales und A. anterior, 5: Herz mit darüber liegendes Perikardialseptum, 6: Abgebundene A. descendens.

Dadurch konnte ein Einfluß auf den ventrikulären Druck und auch auf den Herzausstoß, bedingt durch einen erhöhten Widerstand, der aus der möglichen Kontraktion der kardiovaskulären Klappe resultieren würde, ausgeschlossen werden. Um den ventrikulären Druck [kPa] messen zu können, wurde eine Kanüle (0,6 · 30 mm, Nr. 14), unter Zuhilfenahme eines Mikromanipulators, mittig zwischen die Ostien ins Herz geführt. Die Kanüle war über einen mit Wasser gefüllten Katheter mit einem Druckaufnehmer (Model P23Db, Gould Stat-ham, Oxnard, USA) verbunden. Ebenfalls durch Zuhilfenahme eines Mikromanipulators wurde eine Perfusionskanüle (0,9 x 40 mm) hinter den Bulbus mittig ins Herz eingeführt. Über diese Kanüle wurde das Herz mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Masterflex, Cole-Parmer Instruments Co., Illinois, USA) mit Ringer perfundiert. Über einen 4-Wege Hahn konnte zwischen dem Ringerreservoir und den Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen umgeschaltet werden.

2.3.3 Versuchsaufbau zur Messung der semi-isolierten (*in situ*) Herzaktivität

Die wie unter 2.3.2 beschrieben präparierten Herzen befanden sich während der Versuche in einem doppelwandigen, aus PVC bestehenden Organbad (Volumen = 150 mL). Abb. 2.2, Nr.5 A und B). Die Temperatur der Ringer-Lösung (siehe 2.3.1.1) im Organbad wurde

über die mit Wasser gefüllte Doppelwandung mittels eines Thermokryostaten (RM6 Lauda, Lauda-Königshofen) auf 12 ± 1 °C eingestellt. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurde die Ringer-Lösung kontinuierlich mit Luft begast.

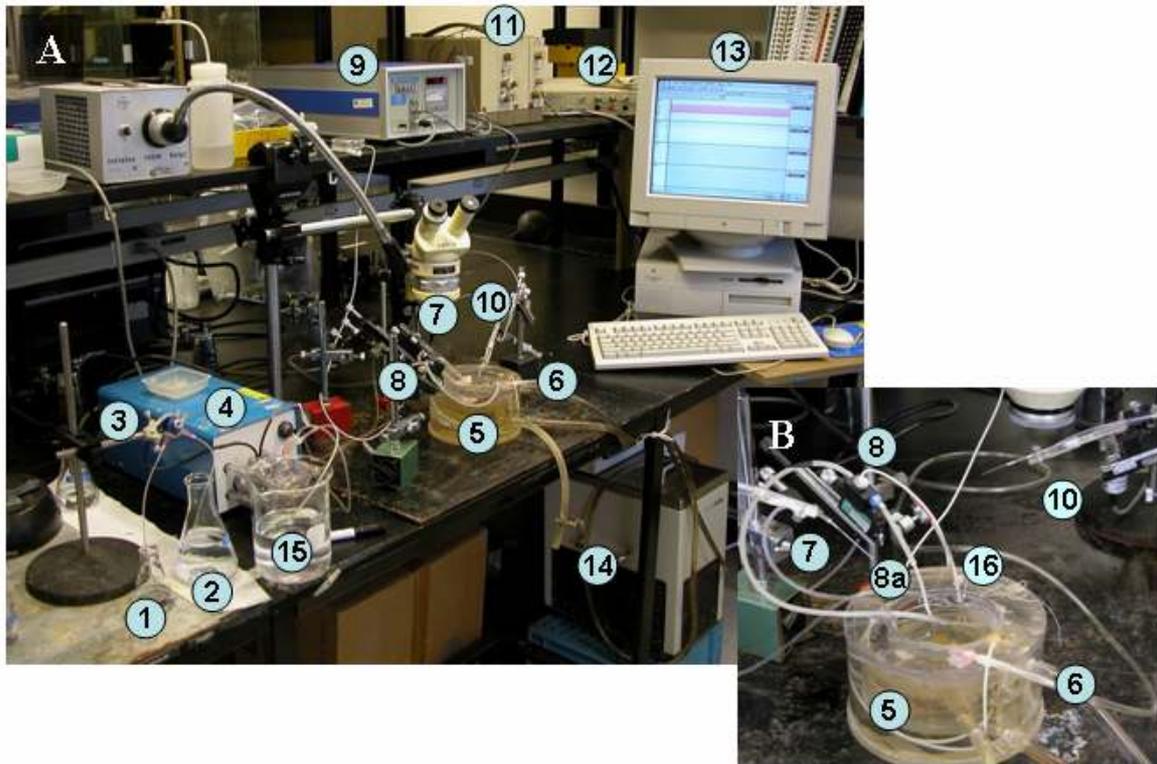


Abb. 2.2: Darstellung des Versuchsaufbaus der semi-isolierten Herzpräparation (Übersicht A und Detailansicht B). 1: Adenosin-, Nucleotidlösung, 2: Ringervorratsgefäß, 3: 4-Wege-Hahn, 4: Peristaltikpumpe, 5: Organbad, 6: Luftzufuhr 7: Infusionskanüle, 8: In-Line Fluss-Sensor (B 8a: Polyethylenkanüle), 9: T106 Flowmeter, 10: Katheter zur Druckaufnahme; Druckaufnehmer, 11: Amplifier, 12: PowerLab, 13: Computer, 14: Thermokryostat, 15: Abfallbehälter, 16: Absaugvorrichtung des Organbades

Über eine Perfusionskanüle wurden die Herzen kontinuierlich mit einer Ringer-Lösung aus einem Vorratsgefäß perfundiert. Der Fluß wurde über eine Peristaltikpumpe auf 2 mL min^{-1} eingestellt. Ein zwischen Vorratsgefäß und Peristaltikpumpe geschaltetes 4-Wege-Ventil ermöglichte es, zwischen der Ringer-Lösung und der Adenosin- und Adeninnucleotidlösung zu wechseln. Der Perfusionskatheter wurde mehrfach gewunden in das Organbad gelegt. Damit wurde eine Anpassung der Perfusionslösung an die Versuchstemperatur gewährleistet, bevor diese über die Kanüle ins Herz gelangte. Durch die autonome Kontraktion des Myocardiums wurde die Ringer-Lösung über die katheterisierte A. posterior und den In-Line Fluss-Sensor zurück in das Organbad geleitet. Überschüssige Ringerlösung wurde mit Hilfe der oben genannten Peristaltikpumpe bei einer Geschwindigkeit von 2 mL min^{-1} aus dem Organbad in einen Abfallbehälter gepumpt.

Der ventrikuläre Druck [kPa] wurde über einen Druckaufnehmer (Gould Statham, Oxnard, USA) und Transducer/Amplifier (Model 13-4615-50) (Gould Inc., Cleveland, USA) erfasst und verstärkt, während das Herzminutenvolumen [mL min^{-1}] über einen In-Line Fluss-Sensor und das T106 Animal Research Flowmeter ermittelt wurde. Die Signale wurden dann über einen 4-Kanal A/D-Wandler (PowerLab/4SP, ADInstruments Pty Ltd. Australia) gesammelt und mit Hilfe einer Software (Chart 4.2, ADInstruments Pty Ltd. Australia) aufgezeichnet.

2.3.4 *Versuchsprotokolle zur Bestimmung der semi-isolierten (in situ) Herzaktivität*

2.3.4.1 **Perfusionsversuche**

Die wie unter 2.3.2 präparierten Herzen schlugen, bedingt durch die autonome Funktion des Herzganglions und unterstützt durch die intakten Ligamente, für mehrere Stunden. Im Mittel betrug dabei die Versuchsdauer sechs Stunden. Das ermöglichte an ein und demselben Herzen, die Effekte verschiedener Substanzen wiederholt zu testen.

Nach der Präparation wurde solange gewartet, bis sich eine annähernd konstante Rate für das Herzminutenvolumen ($14,71 \pm 2,5 \text{ mL min}^{-1}$) und den ventrikulären Druck ($0,91 \pm 0,19 \text{ kPa}$) eingestellt hatte. Erst dann wurde mit den Perfusionsversuchen begonnen. Dabei wurde von der Ringer-Lösung, mit Hilfe des 4-Wege-Hahns, für eine Minute auf die Purinlösung umgeschaltet. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 1, 2,5 und 5 mmol L^{-1} . Jedoch war die Endkonzentration im Herzen, bedingt durch die über die Ostien angesaugte Ringer-Lösung, annähernd vierzehnfach geringer. Des weiteren wurde das Perfusat, nachdem es aus dem Herzen über das Flowmeter gepumpt worden war, im Organbad hundertfünfzigfach verdünnt (Wilkins et al., 1996). Erneute Versuche wurden erst wieder durchgeführt, nachdem eine konstante Rate der Parameter erreicht worden war. Die Ringer-Lösung in dem Organbad wurde in regelmäßigen Abständen ausgetauscht.

2.3.5 *Prinzip der Flußmessung*

Zur Bestimmung des Herzminutenvolumens diente ein Einkanal T106 Animal Research Flowmeter (Transonic Systems Inc. USA) mit einem angeschlossenen In-Line Fluss-Sensor (I.D. 3,2 mm). Dieser ermöglicht es, extrakorporal die Durchschnittsflußgeschwindigkeit von verschiedenen Flüssigkeiten, wie Blut, Ringer, Urin und Puffer zu bestimmen. Er eignet sich daher auch für Messungen an isolierten Organen. Das hierbei zugrunde liegende

„Ultrasonic-transit-time“-Prinzip erlaubt eine sofortige Quantifizierung des Flusses, die weitestgehend unabhängig von Flußprofil, Turbulenzen und Hämocytengehalt ist.

Der Fluss-Sensor enthält zwei auf der gleichen Seite angebrachte Ultraschalltransducer und einen Reflektor. Der Reflektor liegt in einem definierten Abstand auf der gegenüberliegenden Seite zwischen den Transducern (Abb. 2.3). Die Transducer fungieren hierbei sowohl als Sender als auch als Empfänger und durchlaufen während der Messungen zwei alternierende Messzyklen.

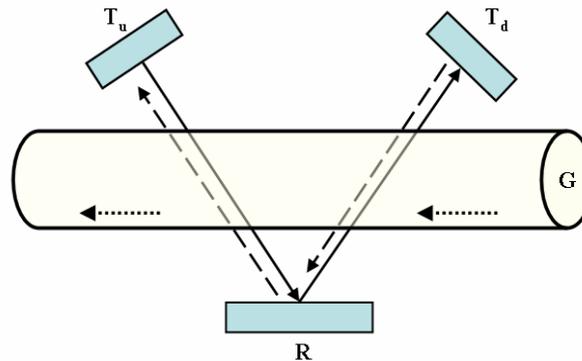


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Fluss-Sensors. T_u : stromaufwärts-Transducer, T_d : stromabwärts-Transducer, R: Reflektor, G: Gefäß. Die Pfeile im Gefäß geben die Fließrichtung an.

Bei dem sogenannten ‚upstream transit-time measurement cycle‘ sendet der stromabwärts liegende Transducer (T_d) eine Ultraschallwelle aus. Diese Welle durchläuft das zu untersuchende Gefäß stromaufwärts, wird am Reflektor (R) zurückgeworfen, durchläuft erneut das Gefäß (G) und wird vom stromaufwärts liegenden Transducer (T_u) aufgefangen. Der Ultraschall wird hier in elektrische Signale umgewandelt, von denen die Zeit abgeleitet wird, welche die Ultraschallwelle benötigte, um das Gefäß zu durchlaufen. Im folgenden wird diese Sequenz erneut absolviert, allerdings in umgekehrter Richtung (downstream transit-time measurement cycle). Auch hier wird wieder die Zeit berechnet, die benötigt wird, um das Gefäß zu durchlaufen.

Die benötigte Zeit wird dabei von der Geschwindigkeit der Flüssigkeit beeinflusst, die durch das Gefäß fließt. Während des stromaufwärts-Zyklus wandert die Ultraschallwelle gegen die Flußrichtung und die Zeit, die benötigt wird, um den Zyklus abzuschließen, nimmt abhängig von der Strömungsmenge zu, wohingegen die Zeit für den stromabwärts-Zyklus, der mit der Flußrichtung läuft, abnimmt. Die Flußgeschwindigkeit wird berechnet, indem die stromabwärts gerichtete Durchgangszeit von der stromaufwärts gerichteten Durchgangszeit abgezogen wird. Bei dieser Berechnung wird die ‚wide-beam ultrasonic illumination‘ berücksichtigt (Abb. 2.4).

Das gesamte Gefäß wird vollständig und gleichmäßig durch die Ultraschallwelle erfasst, d.h. an allen Stellen des Gefäßquerschnittes wird der Fluß bestimmt. Dadurch wird die Durchgangszeit zu einer Funktion der Flußmenge, die den Strahl, unabhängig von der Gefäßdimension, durchläuft,

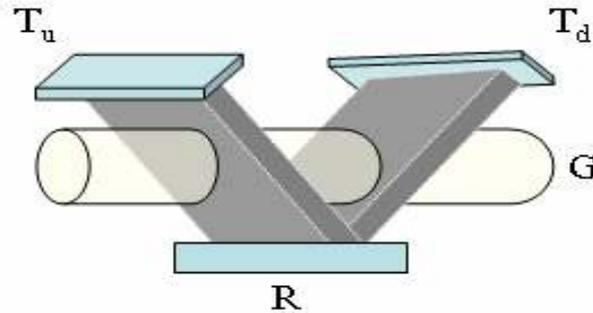


Abb. 2.4: Dreidimensionale, schematische Darstellung der Funktionsweise der ‚wide-beam ultrasonic illumination‘. T_u: stromaufwärts-Transducer, T_d: stromabwärts-Transducer, R: Reflektor, G: Gefäß/Röhre.

Während des Durchgangs erfährt die Ultraschallwelle eine Phasenverschiebung der Durchgangszeit (Abb. 2.5), die proportional zur Durchschnittsgeschwindigkeit der zu untersuchenden Probe mal der Strecke ist, über welche die Geschwindigkeit ermittelt wird. Mit Hilfe der ‚wide-beam ultrasonic illumination‘ integriert der Empfänger diese Geschwindigkeiten, und man erhält die Flußmenge aus dem Produkt der Durchschnittsgeschwindigkeiten mal der Gefäßquerschnittsfläche.

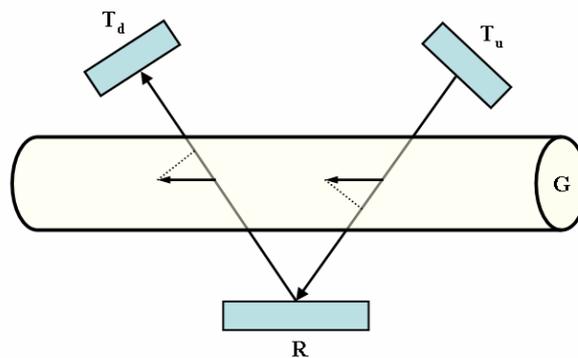


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Phasenverschiebung beim Durchgang der Ultraschallwelle durch die Probe. T_u: stromaufwärts-Transducer, T_d: stromabwärts-Transducer, R: Reflektor, G: Gefäß/Röhre. Die Pfeile im Gefäß geben die Fließrichtung an.

2.3.6 Datenaufzeichnung und Auswertung

Die analogen Signale des Transonic[®] Animal Research Flowmeters und des Druckaufnehmers wurden auf das PowerLab/4SP Data Acquisition System (ADInstruments Pty Ltd., Australia) übertragen und digitalisiert. Mit Hilfe der Software Chart 4.2 (ADInstruments Pty

Ltd., Australia) wurden die Daten auf dem Computer aufgezeichnet. Mittels einer internen Zwei-Punkte Kalibrierung wurden die eingehenden Signale [mV] direkt in die entsprechenden Einheiten umgerechnet. Nach Kalibrierung mittels eines Manometers wurde der ventrikuläre Druck in kPa aufgezeichnet. Das Herzminutenvolumen wurde mit Hilfe der Peristaltikpumpe kalibriert und in mL min^{-1} aufgezeichnet. Ausgehend von den Daten des ventrikulären Drucks wurde anhand der Anzahl der Kontraktionen die Herzfrequenz [bpm] bestimmt. Jede Kontraktion entsprach einem Herzschlag. Ebenfalls konnte unter Verwendung der Gleichung 2.1 das Schlagvolumen [mL Schlag^{-1}] aus dem Herzminutenvolumen und der Herzfrequenz berechnet werden. Die so erhaltenen Daten wurden zur weiteren Auswertung über eine Minute gemittelt.

$$\text{SV} [\text{mL Schlag}^{-1}] = \text{HMV} [\text{mL min}^{-1}] / f_{\text{H}} [\text{Schlag min}^{-1}] \quad (2.1)$$

SV = Schlagvolumen

HMV = Herzminutenvolumen

f_{H} = Herzfrequenz

2.4 *In vivo* Messungen mit dem Pulsed-Doppler-Flowmeter

2.4.1 *Infusionslösungen*

2.4.1.1 **Ringer-Lösung**

Nach Zeis et al. (1992) wurde eine Ringer-Lösung, entsprechend der ionalen Zusammensetzung der Hämolymphe des Hummers, bestehend aus 600 mmol L^{-1} NaCl, 10 mmol L^{-1} CaSO_4 , 10 mmol L^{-1} MgSO_4 , 5 mmol L^{-1} KCl und 5 mmol L^{-1} NaHCO_3 , pH 8.0, angesetzt. Die Ringer-Lösung diente als Infusionslösung für die Kontrollversuche und als Lösungsmittel für Adenosin und die Adeninnukleotide.

2.4.1.2 **Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen**

Für die Infusionsversuche wurden die Adenosin und die Adeninnukleotidlösungen frisch in einer auf jedes Tier abgestimmte Konzentration angesetzt.

2.4.2 Präparation der Versuchstiere

2.4.2.1 Präparation der intakten Hummer zur Bestimmung der Fließgeschwindigkeit und der Herzfrequenz mittels der Pulsed-Doppler-Flowmetrie

Um die Wirkung von Adenosin und den Adeninnukleotiden auf das Herzkreislaufsystem des Amerikanischen Hummers zu untersuchen, wurden die Tiere mit maximal drei piezoelektrischen Transducerkristallen (\varnothing 1 mm, 180 °, 20 MHz, Iowa Doppler Products, Iowa City, USA) und einem Infusionskatheter (I.D. 0,5 mm, Sims Portex Ltd. GB) versehen.

Nach hypothermaler Anästhesie wurde der Infusionskatheter zwischen das dritte und vierte Schreitbeinpaar durch das vorab perforierte Gelenkhäutchen circa einen Zentimeter tief in den ventralen Blutsinus eingeführt. Durch eine sofortige bolusartige Injektion von Ringelösung konnte ein Verstopfen des Katheters durch koagulierte Hämolymphe vermieden werden. Der Katheter wurde lateral am Cephalothorax mit Gewebepband fixiert und war über ein 3-Wege-Ventil mit einer Spritze und einem Perfusor (Precidor Infors AG, Basel, CH) verbunden.

Den Versuchstieren wurde mit Hilfe eines Zahnarztbohrers (KaVo EWL, Leutkirch i. A., 2 mm Bohrkopf: Meisinger, USA) zur Positionierung der Transducerkristalle an drei unterschiedlichen Stellen eine Öffnung in den Panzer gebohrt (Abb. 2.6). Für die Aorta descendens wurde der Transducerkristall auf die ventrale Seite zwischen dem dritten und vierten Schreitbeinpaar, für die Aorta posterior in der Mitte des zweiten Abdominalsegments und für die Arteria lateralis in Höhe der Sutura cervicalis ca. einen cm neben die Medianebene gesetzt.

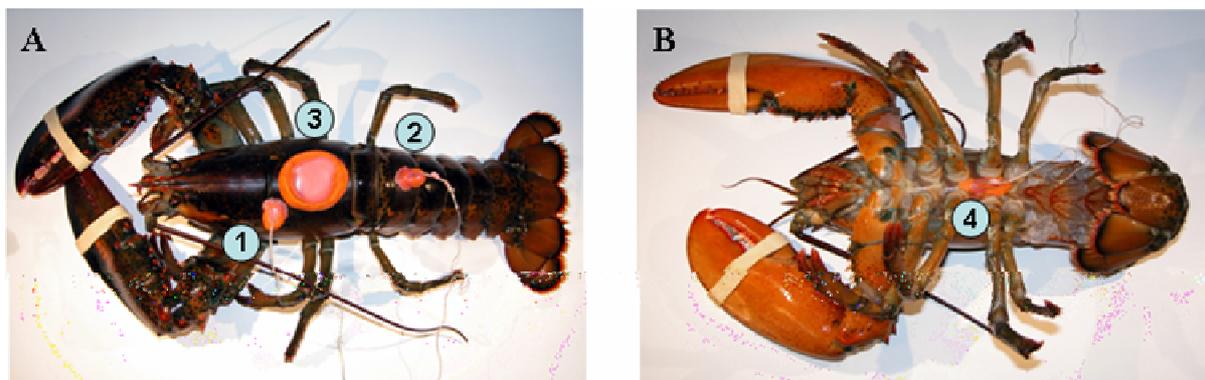


Abb. 2.6: Dorsale (A) und ventrale Ansicht (B) eines für die Pulsed-Doppler-Flowmetrie präparierten Hummers, *Homarus americanus*. Die mit Plastilin, Dentalwachs und Cyanoacrylat fixierten Transducerkristalle wurden im Bereich der A. lateralis (1), der A. posterior (2) und der A. descendens (4) eingeführt. Die Nummer 3 zeigt den Damm aus Plastilin mit einer Abdichtung aus Dentalwachs und Cyanoacrylat nach der dorsalen Nervenpräparation. Weitere Erklärungen finden sich im Text (2.4.2.2).

Dabei wurden die Transducerkristall durch leichte Drehungen den Gefäßen in einem 45° Winkel angenähert, so daß während eines Herzzyklusses ein maximales akustisches Signal und eine maximale Amplitude für den phasischen Signalausgang erreicht wurden. Die Kristalle wurden dann mittels Plastilin, Dentalwachs und Cyanoacrylat in ihrer Position fixiert. Zusätzlich wurde dadurch die Öffnung abgedichtet, so daß keine Hämolymphe austreten konnte.

2.4.2.2 Durchtrennung der kardioresulatorischen Nerven

Den Versuchstieren, die wie unter 2.4.2.1 angegeben präpariert worden waren, wurden nach einer Methode von Guirguis und Wilkens (1995) die kardioresulatorischen (dorsalen) Nerven durchtrennt. Hierbei handelt es sich um dieselben Tiere, die schon für die *in vivo* (Kontrolle) Experimente eingesetzt worden waren. Dazu wurde nach erneuter hypothermaler Anästhesie auf Eis mit Hilfe des Zahnarztbohrers (1 mm Bohrkopf) ein circa zwei Quadrat-zentimeter großes Stück Carapax dorsal zum Herzen entfernt (Abb. 2.6). Die darunter befindliche intakte Hypodermis wurde dann mit einer gewinkelten Präparationsschere (Fine Science Tools, Heidelberg) eingeschnitten und entfernt. Um den Verlust an Hämolymphe so gering wie möglich zu halten, wurde um die Öffnung ein Damm aus Plastilin mit Cyanoacrylat angebracht.

Die dorsalen Nerven verlaufen über die dorsale Oberfläche der posterioren Ligamente. Sie durchqueren das Herz bedeckende Bindegewebe und die Hälfte des posterioren Ventrikels, bevor sie durch das Myocardium zum Herzganglion hin ziehen (Guirguis und Wilkens, 1995). Durch oberflächliche Schnitte in das Bindegewebe konnten die Nerven durchtrennt werden, ohne daß dabei die Ligamente zerstört wurden.

Nach diesem Eingriff wurde die Öffnung durch das entfernte Carapaxstück verschlossen und mit Dentalwachs (van der Veen Dental, Duisburg) sowie Cyanoacrylat abgedichtet. Dadurch konnte ein weiterer Verlust an Hämolymphe verhindert werden. Die Tiere wurden im Anschluß in das Versuchsbecken gesetzt, und es folgte eine Erholungsphase von mindestens zwölf Stunden, bevor mit den Infusionsexperimenten begonnen wurde.

2.4.2.3 Scheinpräparationen

Für die Scheinpräparation wurde die Hypodermis entfernt, ohne die dorsalen Nerven zu durchtrennen. Damit sollte ein Einfluß der Präparation auf die Herzfrequenz und die Fließgeschwindigkeit ausgeschlossen werden.

2.4.3 Versuchsaufbau

Die präparierten Hummer wurden mindestens 12 Stunden vor Versuchsbeginn in die Versuchsapparatur (Abb. 2.7) eingesetzt und die Tiere an die Versuchsbedingungen (15 ± 2 °C, Salinität: 35 ± 1 ‰) akklimatisiert. Das Versuchsbecken (20·39·29,5 cm) befand sich in einer zusätzlichen Wanne, die als Auslaufschutz diente. Beide Becken waren zur Abschirmung gegen äußere elektrische Felder in einem geerdeten Faraday-Käfig untergebracht. Er wurde, um visuelle Stimulationen der Tiere zu vermeiden, mit einer PVC-Folie abgehängt.

Das mit Seewasser gefüllte Versuchsbecken wurde kontinuierlich mit Luft begast. Mittels einer Filterpumpe (Eheim, Deizisau) sowie durch partiellen Wasseraustausch nach einer Versuchsserie konnte der Nitritgehalt unter $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ gehalten werden. Die Wassertemperatur wurde über die Raumkühlung eingestellt. Die ebenfalls auf 15 °C temperierten Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen wurden über einen Perfusor, den Katheter und dem dazwischen geschalteten 3-Wege-Ventil ins Tier infundiert. Das 3-Wege-Ventil verringerte den Kathetertotraum zum Tier hin, um die Belastung des Tieres beim Wechsel der Lösungen (Zwischeninfusionen) zu reduzieren. Katheter und Kabel der Transducerkristalle wurden über einen Styroporschwimmer zusammengefasst und fixiert, um so ein Herausreißen des Katheters und der Transducerkristalle zu verhindern.

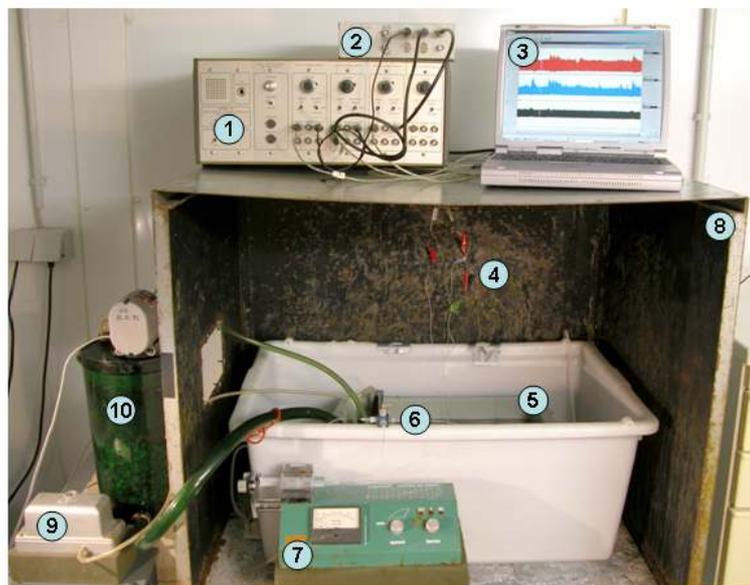


Abb. 2.7: Darstellung des Versuchsaufbaus zur Messung der kardiovaskulären Parameter von *Homarus americanus* mittels der Pulsed-Doppler-Flowmetrie. 1: Pulsed-Doppler-Flowmeter, 2: PowerLab®, 3: Computer, 4: Dopplerkabel mit Verbindungskabel zum Pulsed-Doppler-Flowmeter, 5: Versuchsbecken, 6: Infusionskatheter mit 3-Wege-Ventil, 7: Perfusor, 8: Faraday-Käfig, 9: Luftzufuhr, 10: Filterpumpe. Nicht abgebildet ist die Folie die zum Abdecken des Faraday-Käfigs diente. Die hier dargestellte Abbildung entspricht nicht 100 %ig dem Versuchsaufbau. Die Abbildung soll der Übersicht dienen. Der Computer und der Perfusor befanden sich nicht in direkter Reichweite des Faradaykäfigs, damit durch die Bedienung der Geräte eine Störung der Tiere vermieden werden konnte.

Die kardiovaskulären Parameter wurden über die Transducerkristalle und ein damit verbundenes 545C-4 Directional-Pulsed-Doppler-Flowmeter (Bioengineering, University of Iowa, USA) erfaßt, die Signale über ein PowerLab 4/25 (ADInstruments Pty Ltd. Australia) gebündelt und zur Datenverarbeitung auf einem Computer mit Hilfe der Software Chart V.4.2.3 (ADInstruments Pty Ltd. Australia) aufgezeichnet.

2.4.4 Versuchsprotokolle

2.4.4.1 *In vivo* Infusionsversuche für intakte und scheinpräparierte Tiere

Jeder Infusionsversuch bestand aus einem Meßzyklus von sechzig Minuten, der sich in einen zehnminütigen Vorlauf, eine zehnminütige Infusionsphase und eine vierzigminütige Erholungsphase unterteilte (Abb. 2.8). An einem Tier wurden mehrere Meßzyklen durchgeführt. Zwischen diesen Zyklen wurden kurzzeitige Zwischeninfusionen ausgeführt, die dem Austausch der Lösungen in dem Katheter dienen. Im Anschluß wurden, je nach vorangegangenen Experiment, Pausen von zwei bis drei Stunden eingehalten, bevor ein weiteres Experiment gestartet wurde. Um baroreflektorische Reaktionen während der Infusion auszuschließen (Burggren et al., 1990), wurde bei einer gleichmäßigen Geschwindigkeit von $0,156 \text{ ml min}^{-1}$ infundiert. Zehnminütige Ringerinfusionen dienen hierbei dem Ausschluß der Volumeneffekte und zusätzlich als Kontrolle der Adenosin- und der Adeninnukleotidlösungen.

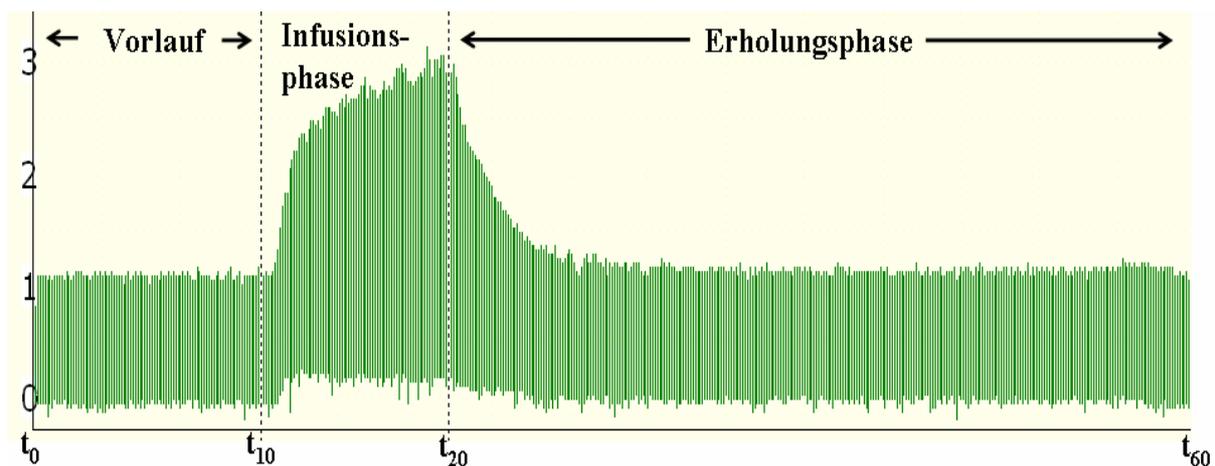


Abb. 2.8: 60minütiger Meßzyklus eines Infusionsexperimentes am Beispiel der Arteria descendens, das mit Adenosin [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$] durchgeführt wurde. An einen zehnminütigen Vorlauf ($t_0 - t_{10}$) schließt sich eine zehnminütige Infusionsphase ($t_{11} - t_{20}$) und eine 40minütige Erholungsphase ($t_{21} - t_{60}$) an.

2.4.4.2 *In vivo* Infusionsversuche für denervierte Tiere

Die Infusionsversuche gleichen denen für die intakten Tiere. Im Vorfeld einer Versuchsreihe wurde jedoch überprüft, ob die kardiregulatorischen Nerven durchtrennt worden waren. Wird der ruhende Hummer mit einem Glasstab angestoßen, so führte dieser Stimulus bei intakten Tieren zu einer kurzfristigen Bradykardie (McMahon, 1995) (Abb. 2.9). Fehlt diese Reaktion, kann man davon ausgehen, daß die dorsalen Nerven durchtrennt sind

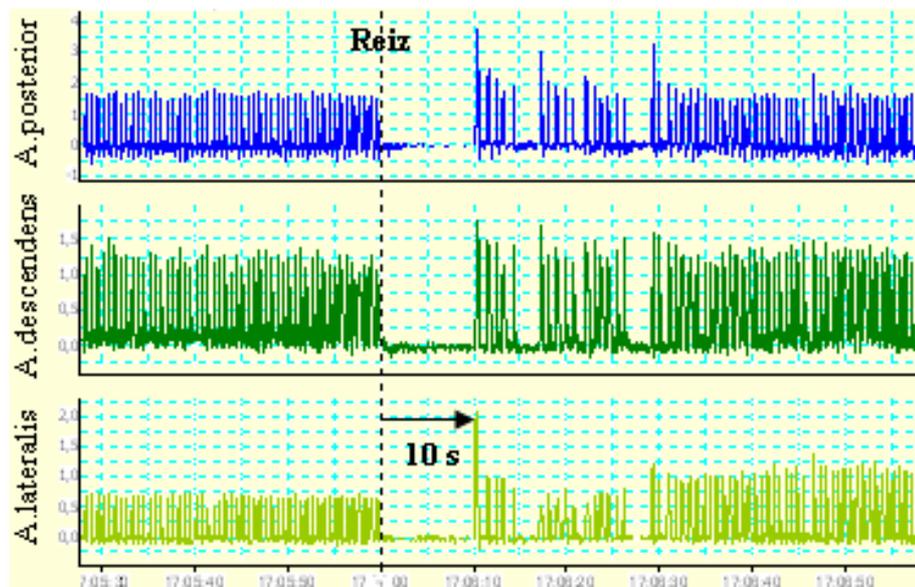


Abb. 2.9: Originalaufzeichnung einer Dopplermessung. Dargestellt ist eine durch einen externen Stimulus ausgelöste, kurzfristige Bradykardie in der A. posterior, A. descendens und der A. lateralis des Hummers, *Homarus americanus*. Die gepunktete Linie gibt den Zeitpunkt an, zu dem der Reiz ausgelöst wurde.

2.4.5 Das Prinzip der Dopplermessungen

Die Pulsed-Doppler-Flowmetrie basiert auf dem von Christian Doppler 1842 berechneten und benannten Prinzip, das besagt, daß sich die Frequenz einer Wellenlänge an einem Ort ändert, wenn sich dieser Ort und das Erregungszentrum relativ zueinander bewegen (Lecher, 1973).

Die Pulsed-Doppler-Flowmetrie erlaubt kontinuierliche *in vivo* Messungen des Blutflusses in kleinsten Tieren. Der Blutfluß kann durch die Verwendung kleiner piezoelektrischer Transducerkristalle in Gefäßen mit einem Durchmesser gemessen werden, der geringer als 1 mm ist (Hartley und Cole, 1974). Die Kristalle sind inert gegenüber der Gewebsflüssigkeit und ermöglichen eine längere Verweildauer im Körper. Es können mehrere Gefäße simultan gemessen werden.

Ein einzelner Transducerkristall sendet, innerhalb eines Funktionszyklus von 16 μ s, ein Signal von 20 MHz für 0,8 μ s in Richtung des Gefäßes (Abb. 2.10). Dort trifft das Signal auf ein definiertes Probenvolumen von 0,5 mm³ (West, 1989), wird durch die in der Hämö-

lymphe befindlichen Partikel reflektiert und von dem als Sender und Empfänger agierenden Kristall aufgefangen. Durch die Geschwindigkeit der Hämocyten kommt es bei der Reflektion zu einer Zeitverzögerung und damit zu einer Frequenzveränderung (“Doppler-Verschiebung“). Nach der Emission der Ultraschallwelle verbleibt eine Restzeit von 15,2 μs , innerhalb der das Signal empfangen werden kann. Anschließend beginnt ein erneuter Funktionszyklus. Mit Hilfe der ‚RANGE‘-Funktion des Dopplers kann der Abstand des Probenvolumens zum Kristall justiert werden. Dadurch wird der Zeitpunkt des Echoempfangs festgelegt. Die

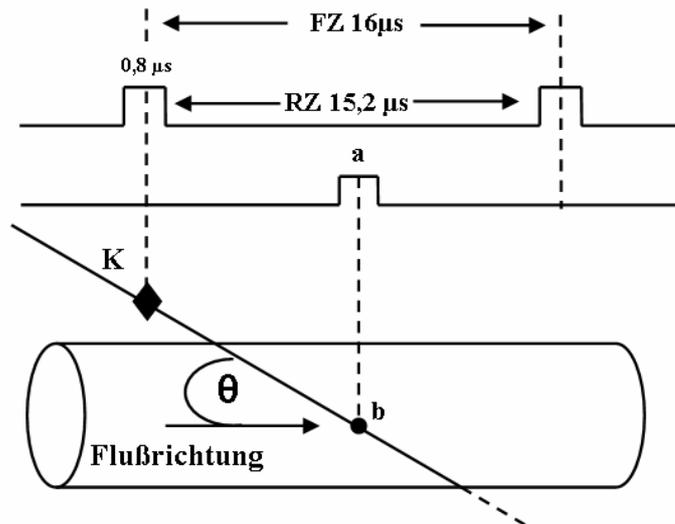


Abb. 2.10: Schematische Darstellung eines Funktionszyklus. Die Erklärung erfolgt im Text. FZ: Funktionszyklus, RZ: Restzeit innerhalb der das Echo empfangen werden kann. K: Transducerkristall; θ : Winkel zwischen Flußrichtung und der Ultraschallwelle. a: Echo der Ultraschallwelle (0,8 μs); b: Position des Probenvolumens im Gefäß. Die Position kann mit Hilfe der RANGE-Funktion justiert werden. (Verändert nach West, 1989).

Festlegung des Abstandes wird durch die maximale Reichweite des Transducerkristall limitiert. Die Reichweite beträgt, anhand der Formel (2.2) berechnet, 1,13 cm.

$$R_{max} = \frac{(t_{FZ} - (t_{E_1} + t_{E_2})) \cdot c}{x} = 1,13\text{cm} \quad (2.2)$$

R_{max} = maximale Reichweite des Transducerkristalls

t_{FZ} = Zeitspanne des Funktionszyklus [16 μs]

t_{E_1} = Zeitspanne der Ultraschallemission [0,8 μs]

t_{E_2} = Zeitspanne des Ultraschallempfangs [0,8 μs]

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

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

Innerhalb dieser Reichweite lässt sich die Geschwindigkeit der Hämolymphe bestimmen und über die Gleichung (2.3) nach Hartley und Cole (1974) sowie Reiber (1992) berechnen.

$$v = \frac{\Delta f \cdot c}{2 \cdot f_0 \cdot \cos \theta} \quad (2.3)$$

v = Geschwindigkeit der Hämocyten [mm s^{-1}]

Δf = Frequenzänderung/Doppler-Verschiebung [kHz]

c = Geschwindigkeit des Schalls in der Hämolymphe [1565 m s^{-1}]

f_0 = emittierte Frequenz [20 MHz]

θ = Winkel zwischen Schallrichtung und der Richtung des Hämolympfflusses, Optimal $\cos 45^\circ$

Im Idealfall beträgt der Winkel, mit dem der Kristall an das Gefäß angenähert wurde 45° (Hartley und Cole, 1974; West, 1989; Reiber, 1992). Unter diesen Bedingungen wäre die Frequenzänderung (Δf) nur noch von der Geschwindigkeit der Hämolymphe abhängig. Das zeigt sich durch Gleichung 2.4 nach Einsetzen der Konstanten (c , f_0 , θ) in die Formel (2.3).

$$v [\text{mm s}^{-1}] = 55,33 [\text{mm s}^{-1} \text{ kHz}^{-1}] \cdot \Delta f [\text{kHz}] \quad (2.4)$$

Das 545C-4 Directional-Pulsed-Doppler-Flowmeter wandelt das Frequenzsignal in elektrische Spannung um. Unter Berücksichtigung eines gerätespezifischen Faktors, der für das analoge Spannungssignal [V] pro kHz Doppler-Verschiebung 0,5 beträgt, entsteht ein doppelt so großes Spannungssignal (Gleichung 2.5 und 2.6)

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

$$\Delta f[\text{kHz}] = \frac{E[\text{V}]}{0,5} \quad (2.6)$$

Durch Einsetzen der Gleichung (2.6) in Gleichung (2.4), zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Hämolympffließgeschwindigkeit v und dem analogen Ausgangssignal E .

$$v [\text{mm s}^{-1}] = 110,66 [\text{mm s}^{-1} \text{ kHz}^{-1}] \cdot E [\text{V}] \quad (2.7)$$

2.4.6 Datenerfassung und Auswertung

Über den PHASIC-Ausgang des Pulsed-Doppler-Flowmeters wurden die analogen Signale über ein PowerLab 4/25 (ADInstruments Pty Ltd. Australia) digitalisiert und zur Datenverarbeitung auf einem Computer mit Hilfe der Software Chart V.4.2.3 (ADInstruments Pty Ltd. Australia) aufgezeichnet.

Anhand der Signalanzahl konnte die Herzfrequenz [bpm] ermittelt werden. Die Fließgeschwindigkeit [mm s^{-1}] wurde, nachdem die Flächen aller Signale über eine Minute integriert worden waren, über Gleichung 2.6 berechnet.

2.5 Bestimmung der Konzentrationen von Dopamin, Octopamin und Serotonin aus der Hämolymphe unter dem Einfluß von Adenosin

2.5.1 Präparation der Versuchstiere

Die Konzentrationen von Dopamin, Octopamin und Serotonin wurden in der Hämolymphe unter Ruhebedingungen und Adenosineinfluß bestimmt. Dazu wurde den Hummern nach hypothermaler Anästhesie ein Infusionskatheter zwischen das dritte und vierte Schreitbeinpaar in den ventralen Blutsinus eingeführt (siehe 2.4.2.1). Der Katheter wurde mit einer Spritze verbunden und die Infusion durch einem Perfusor (Precidor Infors AG, Basel, CH) kontrolliert.

Um die Konzentration einiger dieser Hormone direkt am Herzen erfassen zu können, wurde die Hämolymphe aus dem Perikard entnommen, da lateral zum Herzen das Perikardialorgan angesiedelt ist. Das Perikardialorgan ist einer der Hauptfreisetzungsorte für Neurohormone (Alexandrowicz, 1953). Durch seine Nähe zum Herzen können die Hormone direkt auf das Herz einwirken, und die Konzentration sollte hier entsprechend hoch sein.

Mit einem Zahnarztbohrer (KaVo EWL, Leutkirch i. A., 2 mm Bohrkopf: Meisinger, USA) wurde den Tieren oberhalb des Herzens eine Vertiefung in den Cephalothorax gebohrt, ohne jedoch die Hypodermis zu verletzen. Um ein Auslaufen der Hämolymphe während der Blutabnahme zu vermeiden, wurde das Loch mit Neopren verschlossen.

2.5.2 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau zur Hämolymphentnahme wurde im Grundaufbau von den Dopplermessungen übernommen (Abb. 2.11). Die Tiere wurden mit Hilfe einer Klammer fixiert, so daß die Kiemen sich unter Wasser befanden, jedoch die vorpräparierte Blutentnahmestelle aus dem Wasser ragte. Zum einen wurde dadurch die Bewegungsfreiheit der Tiere soweit ein-

geschränkt, daß eine zeitgenaue Hämolympfabnahme gewährleistet werden konnte. Zum anderen konnte so verhindert werden, daß versehentlich Seewasser aufgezogen wurde. Um den Hummern ohne größere visuelle Störungen Hämolymphe zu entnehmen, wurde das Versuchsbecken mit einer Moosgummiplatte abgedeckt. Ein Teil der Abdeckung war im Bereich des Cephalothorax und des Abdomens ausgespart, so daß die vorperforierte Stelle gut erreichbar war.



Abb. 2.11: Darstellung des Versuchsaufbaus zur Bestimmung von Dopamin, Octopamin und Serotonin aus der Hämolymphe von *Homarus americanus*. 1: Luftzufuhr, 2: Filterpumpe, 3: Klammer, 4: Versuchsbecken, 5: Infusionskatheter mit Spritze 6: Perfusor.

2.5.3 Versuchsprotokoll

Die Versuchstiere wurden am Vorabend präpariert (2.5.1) und in der Versuchsaapparatur befestigt. Infusion und Probenentnahme fanden frühestens 12 Stunden nach der Präparation statt.

2.5.4 Probenentnahme

Durch die mit Neopren verschlossene, vorpräparierte Stelle konnten mittels einer Kanüle (0,6 · 30 mm; Nr. 14) mehrfach, ohne daß Hämolymphe auslief, Proben entnommen werden. Den Hummern wurde zu den Zeitpunkten t_0 ; $t_{2,5}$; t_5 ; $t_{7,5}$; t_{10} ; $t_{12,5}$; t_{15} ; t_{20} und t_{30} Hämolymphe abgenommen. Nach Entnahme des Ruhewertes (t_0) wurde die Infusion mit Adenosin [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$] bei einer Infusionsgeschwindigkeit von $0,156 \text{ mm s}^{-1}$ für zehn Minuten gestartet. Um zur Quantifizierung der Amine ausreichend Hämolymphe zu erhalten, je-

doch die Belastung für die Tiere so gering wie möglich zu halten, wurde maximal 1 mL pro Zeitpunkt entnommen.

2.5.5 Probenvorbereitung zur Quantifizierung von Dopamin, Serotonin und Octopamin

Die Hämolympheproben wurden in vorgekühlte Spritzen aufgezogen und nach Entnahme sofort auf Eis gelagert. Um ein Koagulieren der Hämolymphe zu vermeiden, wurden die Proben schnellstmöglich für 5 min bei 2500 x g in einer Kühlzentrifuge (5417R, Eppendorf, Hamburg) bei 4 °C zentrifugiert. Im Anschluß wurden die Proben für Dopamin und Serotonin sowie Octopamin unterschiedlich weiterbehandelt.

2.5.5.1 Dopamin und Serotonin

Nach der unter 2.5.5 genannten Zentrifugation wurde ein Aliquot von 200 µL Hämolymphe mit 180 µL Ringer verdünnt. Zusätzlich wurden als interner Standard 20 µL Isoprotenerenol [1µM] zugesetzt. Das gesamte Volumen von 400 µL wurde in eine Ultrafree[®]-MC Zentrifugationseinheit mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa (Millipore, Bedford, USA) überführt und anschließend bei 5000 x g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Das so von Proteinen (≥ 10 kDa) befreite Eluat wurde sofort zur Bestimmung von Dopamin und Serotonin eingesetzt. Proben, die nicht direkt gemessen werden konnten, wurden bei -80°C eingefroren. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

2.5.5.2 Octopamin

Zur Bestimmung von Octopamin wurde ein Aliquot der zentrifugierten Hämolymphe mit 0,1 mol L⁻¹ PCA im Verhältnis von 1 : 5 versetzt. Präzipitiertes Protein wurde nach erneuter Zentrifugation (20 min; 16400 rpm; 5417R Kühlzentrifuge, Eppendorf, Hamburg) abgetrennt. Der Überstand wurde bis zur Bestimmung bei -80°C eingefroren.

2.5.6 Bestimmung der Aminkonzentration mittels RP-HPLC und elektrochemischer Detektion

2.5.6.1 Bestimmung der Dopamin- und Serotoninkonzentration

Zur Bestimmung von Dopamin und Serotonin wurde eine HPLC-Anlage bestehend aus einer Niederdruckgradientenpumpe (L-6200A Intelligent Pump), Autosampler (LS-7200 LaChrom) beides Merck/Hitachi (Darmstadt/Tokio) sowie einem elektrochemischen Detektionssystem (Modell 5100A Coulochem II Multi-Electrode Electrochemical Detector mit einer

High-sensitivity Analytical cell Modell 5011, ESA, Bedford, Massachusetts, USA.) verwendet. Zusätzlich wurde ein Pulsdämpfer (Modell 5563, SSI-ESA, Bedford, Massachusetts, USA) zwischen Pumpe und Autosampler geschaltet. Über eine AID-Wandlerkarte wurde das analoge Signal digitalisiert. Die Chromatogramme wurden mit dem Software-Programm D-6000 HSM (Merck/ Hitachi) als Spannung (mV) pro Zeiteinheit (min) aufgezeichnet und ausgewertet. Die Peakidentifizierung fand über den jeweiligen Standard statt.

Die Niederdruckgradienten Pumpe wurde in einem isokratischen Modus bei $0,75 \text{ mL min}^{-1}$ betrieben. Der zwischen Pumpe und Autosampler geschaltete Pulsdämpfer sorgte für eine gleichmäßige, laminare Strömung des Laufmittels und damit für ein rauschärmeres Signal. Das Laufmittel bestand aus $0,75 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Heptansulfonsäure, $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ EDTA und 25 % Methanol, pH 5.6. Es wurde abgewandelt nach einer Anleitung von ESA (Coulochem Applications, Bedford, Massachusetts, USA) hergestellt.

Über den Autosampler wurden im Abstand von 15 Minuten jeweils $20 \text{ } \mu\text{L}$ Probe injiziert. Die Proben und Standards wurden dann über eine Purospher[®] STAR RP-18e Säule ($150 \cdot 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) mit einer Vorsäule gleichen Materials ($4 \cdot 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) bei $18 \text{ } ^\circ\text{C}$ Raumtemperatur getrennt.

Bei dem Durchgang durch die analytische Meßzelle wurden Dopamin und Serotonin bei positiven Potentialen oxidiert. Die coulometrischen Elektrode (E1) wurde auf 50 mV und die amperometrischen Elektrode (E2) auf 300 mV gesetzt (Berenbrink, 1994).

Im Vorfeld der Versuche wurde ein hydrodynamisches Voltamogramm erstellt (Abb. 2.13), mit dem überprüft werden konnte, ob das übernommene Potential auch für Serotonin galt. Das Voltamogramm wurde erstellt, indem das Potential der Elektrode E2 auf 0 mV festgesetzt wurde, während an E1 das Potential kontinuierlich pro Lauf um 50 bis 100 mV gesteigert wurde. Nachdem keine Zunahme der Peakfläche mehr erreicht worden war, wurde das Potential an E1 auf ein geeignetes hohes Meßpotential gesetzt. An E2 wurde die Spannung pro Lauf um 50 bis 100 mV reduziert. Dabei wiesen Serotonin und Dopamin bei 300 mV ein gutes Oxidationsvermögen auf.

Die Abbildung 2.12 enthält zusätzlich das Voltamogramm für Octopamin. Octopamin wurde allerdings nicht mit der angegebenen Anlage gemessen, da keine geeignete Nachweisgrenze erreicht werden konnte. Es sollte lediglich gezeigt werden, daß für die Oxidation von Octopamin vergleichsweise höhere Potentiale (siehe 2.5.6.2) nötig sind. Durch die gewählten Potentiale wurden an E1 interferierende Substanzen und ein Teil der gesuchten Amine oxidiert. An der Meßelektrode (E2) wurden dann die gesuchten Substanzen zu 100% oxidiert. Für Dopamin wurde so eine Nachweisgrenze von 1 nmol L^{-1} und für Serotonin von $0,5 \text{ nmol L}^{-1}$ erreicht.

L^{-1} erreicht. Abbildung 2.13 zeigt ein Beispielchromatogramm einer Hämolympheprobe unter Adenosineinfluß und eines Standards.

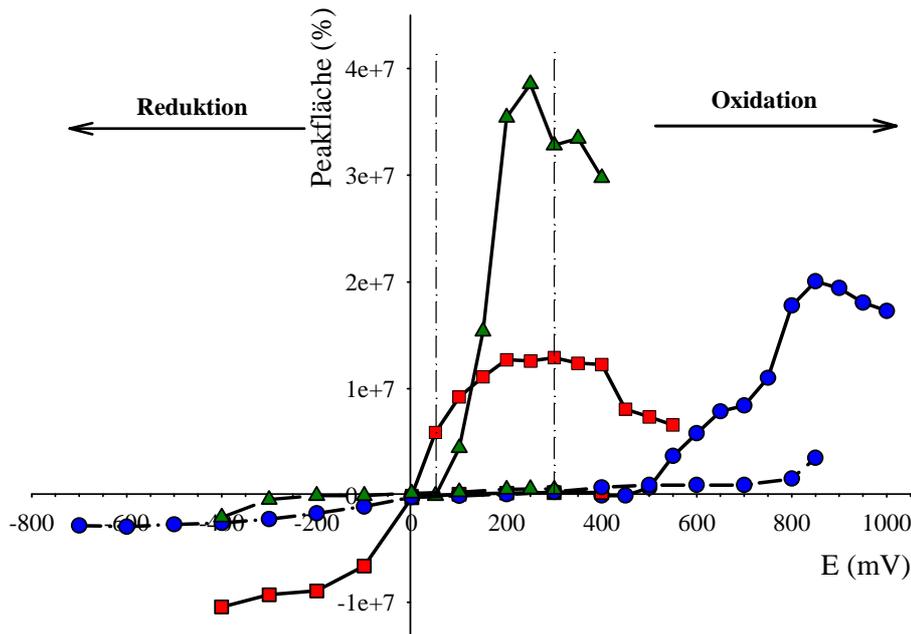


Abb. 2.12: Hydrodynamisches Voltammogramm zur Ermittlung der Meßpotentiale für Dopamin (■), Serotonin (▲) und Octopamin (●). Die Linien geben die Potentiale an, die später für die Versuche gewählt wurden (E1 50 mV und E2 300 mV). Angegeben ist ebenfalls Octopamin. Octopamin wurde nicht unter diesen Bedingungen in den Proben gemessen, da hier höhere Potentiale zur Oxidation notwendig waren. Weitere Erklärungen finden sich im Text.

Um die Konzentration der Substanzen in den Proben zu berechnen, wurde eine Kalibrierungsgerade mit den jeweiligen Standards erstellt. Die Standards wurden in Ringer-Lösung frisch angesetzt und am gleichen Tag gemessen. Zusätzlich wurde die tatsächlich in der Hämolymphe enthaltene Konzentration über die Wiederfindungsrate des internen Standards (Isoproterenol), der als 100% gesetzt wurde, berechnet.

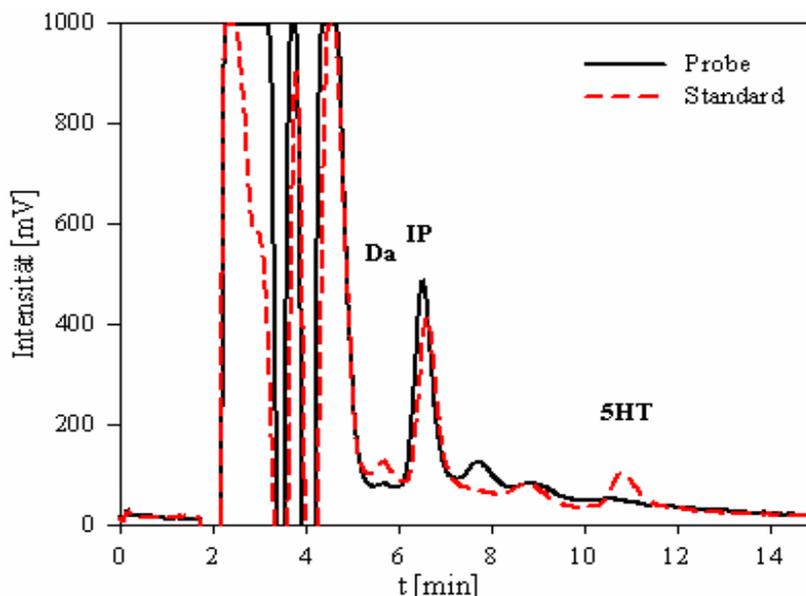


Abb. 2.13: Bestimmung von Dopamin und Serotonin mittels HPLC-EC. Die Chromatogramme zeigen die Auftrennung einer Hämolympheprobe unter Adenosineinfluß (schwarze Linie) sowie einen Standard mit Dopamin (Da) und Serotonin (5HT) [5 nmol L^{-1}] und dem internen Standard Isoproterenol (IP) [50 nmol L^{-1}] (rote Linie).

2.5.6.2 Bestimmung der Octopaminkonzentration

Octopamin konnte, mit der unter 2.5.6.1 beschriebenen Methode, nicht mit geeigneter Nachweisrate detektiert werden. Wie aus Abbildung 2.12 zu entnehmen ist, wurde ein Potential von mindestens 800 mV an der Meßelektrode benötigt, um Octopamin zu oxidieren. Bei diesem Potential war das Rauschen der Basislinie jedoch so hoch, daß kein geeignetes Signal erhalten werden konnte.

Ein geeignetes Meßsignal wurde unter Verwendung einer HPLC-Pumpe (LC-125 Solvent Moduls), eines LC-507e Autosamplers mit nachfolgendem LC-Säulenofen (alle Beckmann, Instruments, Inc. USA) sowie eines elektrochemischen Detektors (Bioquant PAM2, Bischoff, Analysetechnik und -geräte GmbH, Leonberg) erreicht. Datenerfassung und Auswertung fanden über die Software Gold Nouveau Chromatography Data System Ver. 1.6 (Beckman Instruments, Inc. USA) statt.

Die Hämolympfproben, das injizierte Volumen betrug 20 μL , wurden isokratisch bei 0,5 ml min^{-1} über eine Purospher[®]STAR RP-18e Säule (150 \cdot 4,6 mm, 5 μm) (2.5.6.1) innerhalb von 30 Minuten bei einer Temperatur von 30 $^{\circ}\text{C}$ getrennt. Das Laufmittel bestand aus 0,75 mmol L^{-1} NaH_2PO_4 , 3 mmol L^{-1} Heptansulfonsäure, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ M EDTA und 15 % Methanol. Der pH wurde mit konzentrierter Phosphorsäure auf 3.0 eingestellt.

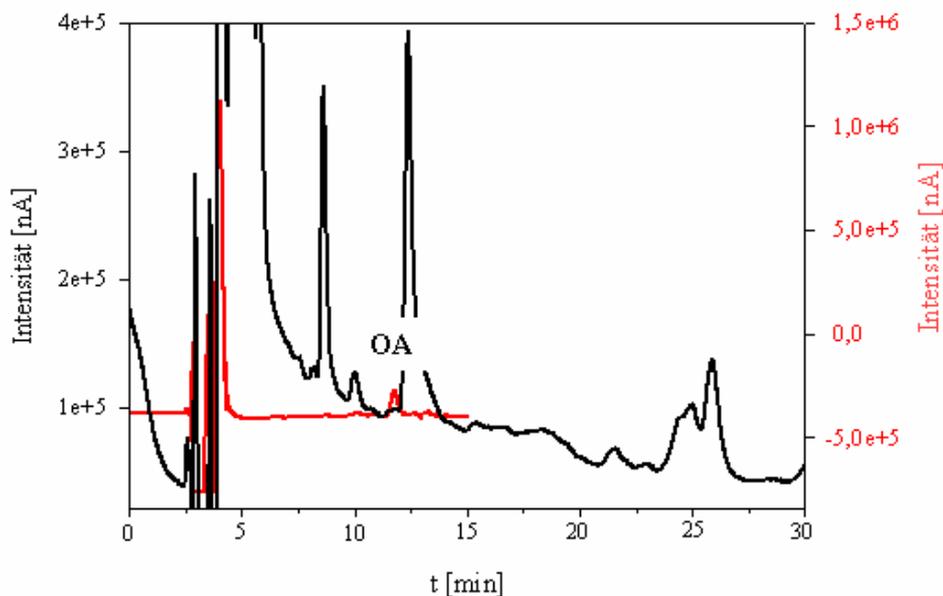


Abb. 2.14: Bestimmung von Octopamin mittels HPLC-EC. Das Chromatogramm zeigt die Auftrennung einer Hämolympfprobe (schwarz) unter Adenosineinfluß und eines Standards (OA) [100 nmol L^{-1}] (rote Linie).

Ein Meßpotential von 750 mV wurde verwendet, um Octopamin an der ‚glassy carbon‘ Elektrode des elektrochemischen Detektors zu oxidieren (Abb. 2.14). Dieses Potential,

das unter Berücksichtigung obigen Voltamogramms und durch Austesten ermittelt wurde, stellt einen Kompromiß zwischen günstiger Signalstärke und Basislinienrauschen dar. Dadurch wurde eine Nachweisgrenze von 2 nmol L^{-1} erreicht. Zur Berechnung der Octopaminkonzentration wurde eine Standardkalibrierung durchgeführt.

2.6 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms Sigma Stat (Version 3.1, Sigma, Jandel Scientific, Erkrath) auf Signifikanz überprüft. Alle Daten wurden auf Normalverteilung und Varianzgleichheit überprüft.

Die Ergebnisse der semi-isolierten Herzpräparationen und der Dopplermessungen wurden mit Hilfe der One Way Repeated Measures ANOVA ($P < 0,05$) getestet. Als Kontrollgruppe dienten alle Vorlaufswerte der einzelnen Tiere, die gegen die anderen Meßwerte getestet wurden. Signifikante Änderungen wurden mit Hilfe der Holm-Sidak Methode ermittelt. Wurde die Differenz zwischen den Vorlaufwerten (t_0 - t_{10}) zur maximalen Abweichung untersucht, fand eine Überprüfung der Daten mittels unpaarigen t-Tests auf Signifikanz statt. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test angewendet.

Die Hämolyphmessungen wurden ebenfalls mit der One Way Repeated Measures ANOVA Methode auf vorhandene Signifikanzen untersucht. Als signifikant verschieden bewertet und mit einem * gekennzeichnet wurden die Werte, deren Wahrscheinlichkeit für einen zufälligen Unterschied $P < 0,05$ war.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, auf welchem Weg Adenosin und seine Nukleotide ihre regulatorischen Wirkungen auf das Herz des Amerikanischen Hummers, *Homarus americanus*, vermitteln. Sowohl Stegen und Grieshaber (2001) als auch van de Meer (2004; *Astacus leptodactylus*) riefen durch die Infusion von Adenosin und den Adeninnukleotiden in den Peribranchialsinus *in vivo* eine signifikant gesteigerte Herzfrequenz und eine signifikant erhöhte Fließgeschwindigkeit in decapoden Crustaceen hervor. Zusätzlich akkumulierte Adenosin signifikant unter funktionsbedingter Hypoxie in der Abdominalmuskulatur des Amerikanischen Hummers (Stegen, Maurer und Grieshaber, in Vorbereitung) und des galizischen Flusskrebsses (van de Meer, 2004). In der Hämolymphe hingegen konnten unter funktionsbedingter Hypoxie keine signifikant geänderten Adenosinkonzentrationen gefunden werden (Stegen, 2001; van de Meer, 2004). Deshalb sollte geklärt werden, ob Adenosin und seine Nukleotide *in vivo* einen direkten Einfluß auf die Herzaktivität ausüben oder ob indirekte, z. B. nervöse und oder hormonelle Effekte, modulierend wirken.

3.1 Untersuchungen am semi-isolierten (*in situ*) Herzen

Die semi-isolierte (*in situ*) Herzpräparation nach Wilkens und Mercier (1993) ermöglicht es, die direkten Wirkungen verschiedener Metabolite des ATP-Katabolismus auf das Herz des Hummers zu untersuchen. Nur unterstützt durch die intakten Ligamente und das intakte Perikardialseptum sowie angetrieben durch das Herzganglion, schlug das Herz völlig unabhängig von nervösen und hormonellen Einflüssen für mehrere Stunden. Somit war es möglich, eine direkte Wirkungsvermittlung von Adenosin, AMP, ADP und ATP auf das Herz zu untersuchen.

Nach einem fünfminütigen Vorlauf wurde das semi-isolierte (*in situ*) Herz mit drei Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen unterschiedlicher Konzentrationen für eine Minute perfundiert. Während des insgesamt 25 Minuten währenden Versuchszeitraumes wurden der ventrikuläre Druck [kPa] und das Herzminutenvolumen [mL min^{-1}] simultan aufgezeichnet. Mittels dieser beiden Parameter konnte die Herzfrequenz [bpm] und das Schlagvolumen [Schlag min^{-1}] bestimmt werden.

3.1.1 Vergleich der Wirkung von Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen auf das semi-isolierte (*in situ*) Herz

3.1.1.1 Perfusion der semi-isolierten (*in situ*) Herzen mit Adenosinlösung

Der Einfluß von Adenosin auf die Herzaktivität wurde überprüft, indem die Herzen mit Adenosinlösungen in Konzentrationen von 1 mmol L^{-1} (A), $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) und 5 mmol L^{-1} (C) für jeweils eine Minute perfundiert und die Herzparameter aufgezeichnet wurden (Abb. 3.1).

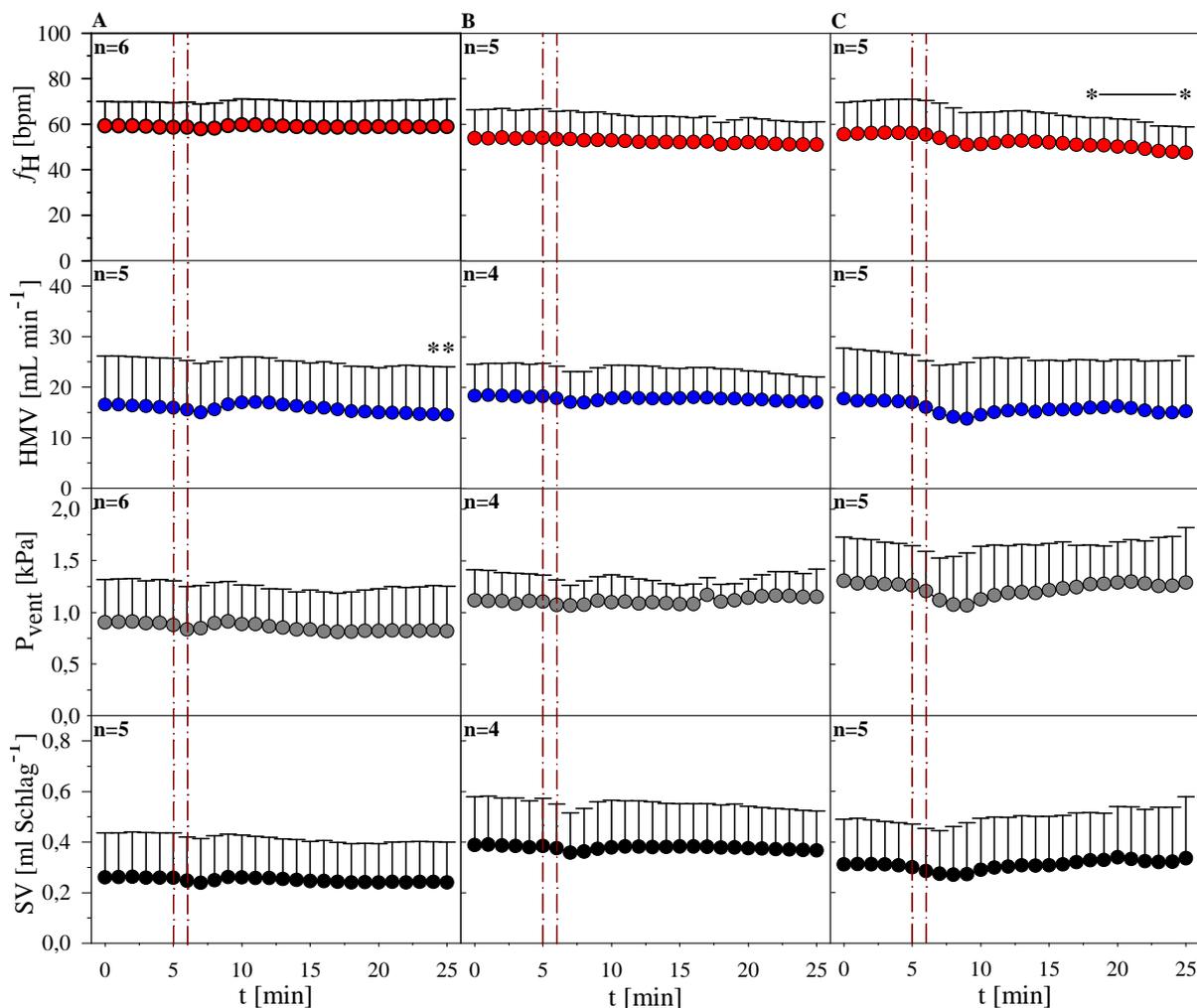


Abb. 3.1: Vergleich der Wirkungen unterschiedlich konzentrierter Adenosinlösungen auf die Herzfrequenz [bpm], das Herzminutenvolumen [mL min^{-1}], den ventrikulären Druck [kPa] und das Schlagvolumen [mL Schlag^{-1}] der semi-isolierten (*in situ*) Herzen des Amerikanischen Hummers, *Homarus americanus*. Nach einem Vorlauf von fünf Minuten wurde das Herz für eine Minute mit einer 1 mmol L^{-1} (A), $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) und 5 mmol L^{-1} (C) Adenosinlösung perfundiert. (angegeben als Mittelwert \pm SD; n = Anzahl der verwendeten Herzen. * = signifikant verändert zu allen Vorlaufwerten).

In das Herz perfundiertes Adenosin [1 mmol L^{-1}] (A) veränderte die Herzfrequenz nicht. Während des gesamten Versuchszeitraums schwankte die Herzrate um ein bis zwei

Schläge um den Vorlaufswert von 59 ± 13 bpm. Nach Applikation von $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Adenosin (B) fiel die Herzrate innerhalb des 25 minütigen Versuchszeitraumes von 54 ± 13 bpm auf 51 ± 10 bpm ab. Wurde eine 5 mmol L^{-1} Adenosinlösung (C) verwendet, sank beginnend mit der Perfusion, die Rate ausgehend von den gemittelten Vorlaufswerten (56 ± 14 bpm) innerhalb von drei Minuten nach dem Perfusionsende auf 51 ± 14 bpm. Nach einem geringfügigen Anstieg fiel die Frequenz kontinuierlich ab, so daß sie in den letzten acht Minuten der Erholungsphase signifikant zum Kontrollwert erniedrigt war.

Das Herzminutenvolumen [mL min^{-1}] wies für alle drei Konzentrationen einen vergleichbaren Verlauf auf. Bei A fiel das Herzminutenvolumen ausgehend von $16,23 \pm 9,72 \text{ mL min}^{-1}$ mit Beginn der Perfusion innerhalb von zwei Minuten nicht signifikant auf $14,97 \pm 9,71 \text{ mL min}^{-1}$ ab. Nach einem erneuten geringen Anstieg fiel das Herzminutenvolumen stetig ab, so daß die letzten zwei Minuten der Erholungsphase zum Vorlaufswert signifikant erniedrigt waren. Durch eine Adenosinkonzentration von $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) waren die Schwankungen nach der Perfusion nicht so stark ausgeprägt, wie unter A beobachtet. Insgesamt nahm das Herzminutenvolumen ausgehend vom Vorlaufswert ($18,26 \pm 6,43 \text{ mL min}^{-1}$) bis zum Ende des Versuchszeitraumes nicht signifikant auf $17,02 \pm 5,05 \text{ mL min}^{-1}$ ab. Im Vergleich zu A und B waren die unter C beobachteten Änderungen am stärksten ausgeprägt. Ausgehend von dem gemittelten Vorlaufswert ($17,3 \pm 9,76 \text{ mL min}^{-1}$) kam es innerhalb von drei Minuten nach dem Perfusionsende zu einem nicht signifikant reduzierten Herzausstoß von $13,72 \pm 11,19 \text{ mL min}^{-1}$. Bis zum Versuchsende blieben die Werte geringfügig aber nicht signifikant unter den Werten des Vorlaufs.

Der ventrikuläre Druck [kPa] fiel unter A um $0,05 \text{ kPa}$ ausgehend von $0,9 \pm 0,42 \text{ kPa}$ innerhalb einer Minute auf $0,85 \pm 0,41 \text{ kPa}$. Innerhalb der nächsten ein bis zwei Minuten stieg der Druck wieder an, sank aber bis zum Versuchsende kontinuierlich und nicht signifikant ab. Durch die Perfusion mit einer $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Adenosinlösung (B) nahm der ventrikuläre Druck zum Versuchsende hin langsam nicht signifikant von $1,07 \pm 0,24 \text{ kPa}$ auf $1,17 \pm 0,17 \text{ kPa}$ zu. Eine Erhöhung der Adenosinkonzentration auf 5 mmol L^{-1} (C) führte mit Beginn der Applikation der Lösung zu einer Abnahme des Drucks von $1,29 \pm 0,53 \text{ kPa}$ auf $1,07 \pm 0,51 \text{ kPa}$. Im weiteren Verlauf stieg der Druck dann bis zum Versuchsende auf $1,29 \pm 0,53 \text{ kPa}$ an.

Das Schlagvolumen [mL Schlag^{-1}] wurde unter A und B, ausgehend von den Vorlaufswerten, geringfügig reduziert (A: von $0,26 \pm 0,18 \text{ mL Schlag}^{-1}$ auf $0,24 \pm 0,18 \text{ mL Schlag}^{-1}$; B: von $0,39 \pm 0,19 \text{ mL Schlag}^{-1}$ auf $0,37 \pm 0,16 \text{ mL Schlag}^{-1}$). Nach einem erneuten geringen Anstieg sank das Schlagvolumen bis zum Versuchsende stetig ab. Durch die einminütige Perfusion einer 5 mmol L^{-1} Adenosinlösung (C) nahm das Schlagvolumen innerhalb

von drei Minuten nach dem Perfusionsende von $0,31 \pm 0,17 \text{ mL Schlag}^{-1}$ auf $0,27 \pm 0,19 \text{ mL Schlag}^{-1}$ ab. Im weiteren Verlauf stieg das Schlagvolumen kontinuierlich an und war zum Ende hin leicht erhöht.

3.1.1.2 Perfusion der semi-isolierten (*in situ*) Herzen mit AMP-Lösung

In Abbildung 3.2 ist der Einfluß verschieden konzentrierter AMP-Lösungen auf die untersuchten Herzkreislaufparameter dargestellt.

In einem von sechs getesteten semi-isolierten (*in situ*) Herzen wurde durch die Perfusion mit einer 1 mmol L^{-1} AMP-Lösung die Herzfrequenz gesteigert. Dabei nahm die Frequenz von 27 auf 40 bpm zu. Bei den anderen fünf Herzen wurde keine Änderung der Herzfrequenz durch AMP hervorgerufen.

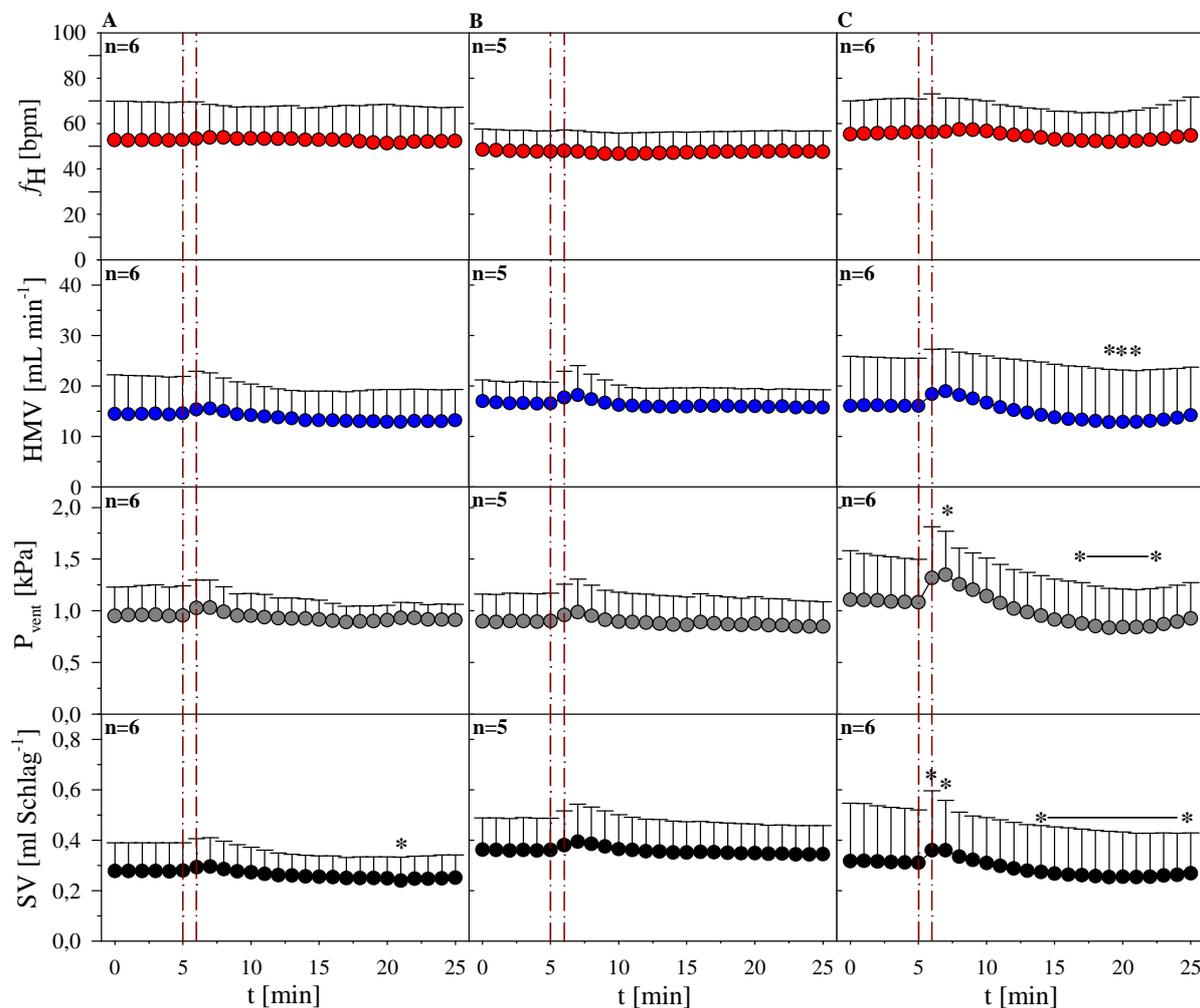


Abb. 3.2: Wirkungen unterschiedlich konzentrierter AMP-Lösungen auf die Herzfrequenz [bpm], das Herzminutenvolumen [mL min^{-1}], den ventrikulären Druck [kPa] und das Schlagvolumen [mL Schlag^{-1}] semi-isolierter (*in situ*) Herzen des Hummers, *Homarus americanus*. Nach einem Vorlauf von fünf Minuten wurde das Herz für eine Minute mit einer 1 mmol L^{-1} (A), $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) und 5 mmol L^{-1} (C) AMP-Lösung perfundiert. (angegeben als Mittelwert \pm SD; n = Anzahl der verwendeten Herzen. * = signifikant verändert zu allen Vorlaufswerten).

Insgesamt blieb die Herzfrequenz durch die Perfusion der AMP-Lösung unbeeinflusst in einem Bereich von 53 ± 17 bpm. In B schwankte die Herzfrequenz um den gemittelten Vorlaufswert von 48 ± 9 bpm mit maximal einem Schlag pro Minute. Nach der Perfusion mit der 5 mmol L^{-1} Lösung (C) kam es allerdings während der Erholungsphase zu einer nicht signifikanten langsamen Abnahme der Frequenz von 65 ± 15 bpm auf 52 ± 12 bpm (t_{18}), gefolgt von einem erneuten Anstieg auf 55 ± 17 bpm.

Das Herzminutenvolumen [mL min^{-1}], der ventrikuläre Druck [kPa] und das Schlagvolumen [mL Schlag^{-1}] wurden durch eine 1 mmol L^{-1} AMP-Lösung (A) eine Minute nach Perfusionsende nicht signifikant um den Faktor 1,07, 1,09 und 1,07 gesteigert. Für die Perfusion mit einer $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ AMP-Lösung (B) waren die Parameter um das 1,09, 1,09 und 1,08fache erhöht. Bei der Applikation der 5 mmol L^{-1} AMP-Lösung (C) erhöhte sich das Herzminutenvolumen nicht signifikant um den Faktor 1,18. Ventrikulärer Druck und Schlagvolumen wurden im Vergleich zum Mittelwert des Vorlaufs signifikant gesteigert. Der Druck nahm im Vergleich zum Vorlauf um $0,26$ kPa (von $1,09 \pm 0,44$ auf $1,35 \pm 0,42$ kPa) und das Schlagvolumen um $0,05 \text{ mL Schlag}^{-1}$ (von $0,31 \pm 0,22$ auf $0,36 \pm 0,21$) zu. Fünf Minuten nach Perfusionsende fielen die Parameter unter die gemittelten Vorlaufswerte und wurden im Verlauf der Erholungsphase zwischen der 19. und 21. Minute (Herzminutenvolumen), der 17. und 23. Minute (Druck) und der 14. bis 25. Minute (Schlagvolumen) signifikant erniedrigt.

3.1.1.3 Perfusion der semi-isolierten (*in situ*) Herzen mit ADP-Lösung

Der Einfluß der ADP-Lösungen ($1, 2,5$ und 5 mmol L^{-1}) auf die untersuchten Parameter ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Bei A und B wurden nur geringe Schwankungen der Herzfrequenz um den Ruhewert von 49 ± 5 bpm (A) und 48 ± 10 bpm (B) beobachtet. Bei C kam es in Bezug auf den Vorlauf (50 ± 16 bpm (t_7)) nach einem leichten Anstieg zu einer nicht signifikant verringerten Herzrate (42 ± 18 bpm (t_{15})). Im weiteren Verlauf der Erholungsphase stieg die Herzfrequenz aber erneut auf 46 ± 17 Schläge pro Minute an.

Das Herzminutenvolumen wurde unter dem Einfluß der 1 mmol L^{-1} ADP-Lösung während der Perfusion nur geringfügig von $14,98 \pm 2,97 \text{ mL min}^{-1}$ auf $15,74 \pm 3,45 \text{ mL min}^{-1}$ gesteigert. Das entspricht einer Zunahme von 5 %. Im weiteren Verlauf fiel das Herzminutenvolumen innerhalb von zehn Minuten unter den Vorlaufswert, blieb bis zum Ende erniedrigt und war zwischen der 20. und 21. Minute signifikant erniedrigt. Der ventrikuläre Druck wurde ebenfalls nur um 5% von $0,65 \pm 0,22$ kPa auf $0,68 \pm 0,22$ kPa erhöht, wohingegen es zu keiner Änderung des Schlagvolumens während der Perfusion kam. Hier ergab sich ebenfalls zwischen der 20. und 21. Minute ein signifikant erniedrigtes Schlagvolumen.

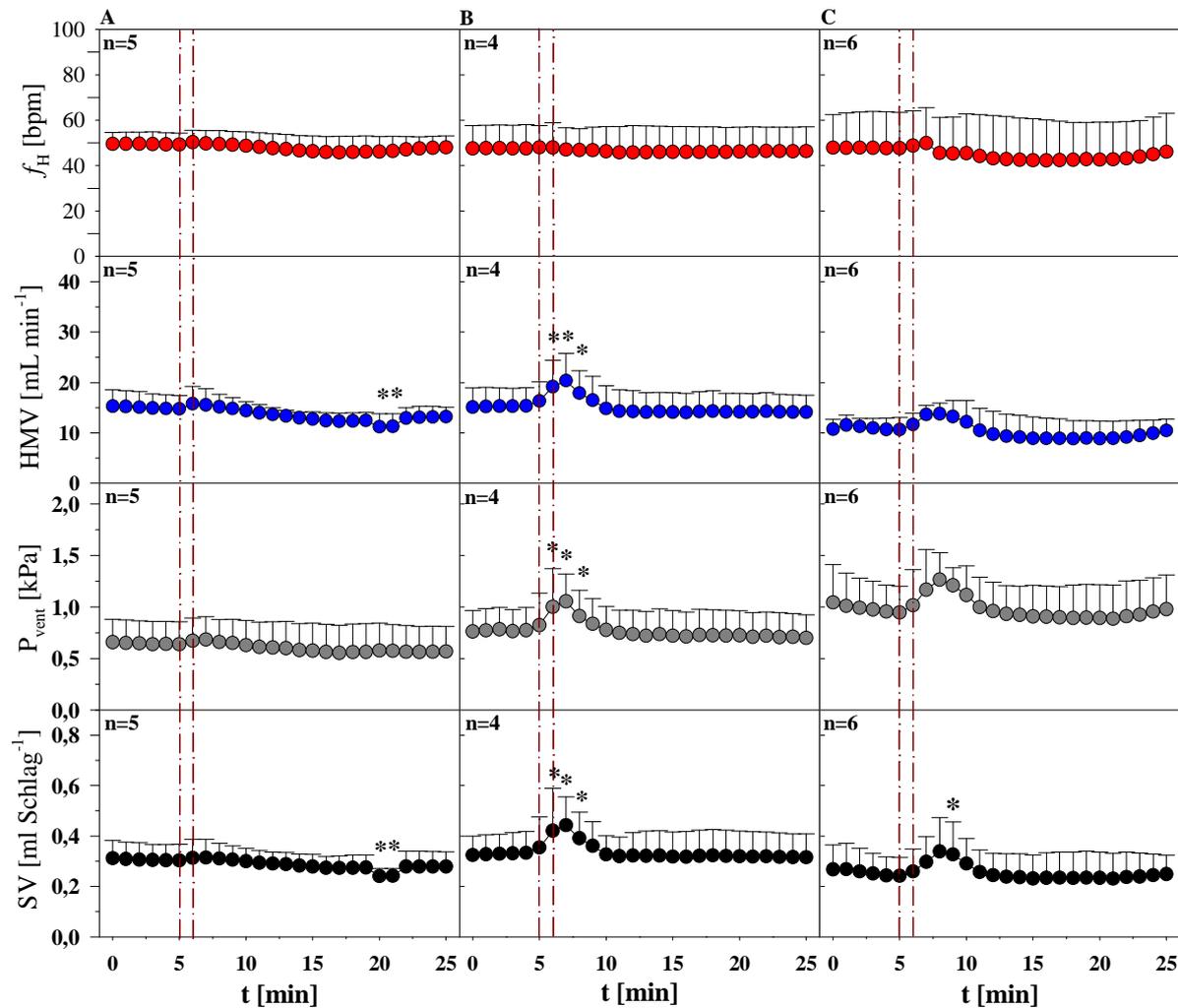


Abb. 3.3: Vergleich der Wirkungen unterschiedlich konzentrierter ADP-Lösungen auf die verschiedenen Herzparameter semi-isolierter (*in situ*) Herzen von *Homarus americanus*. Nach einem Vorlauf von fünf Minuten wurde das Herz für eine Minute mit einer 1 mmol L^{-1} (A), $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) und 5 mmol L^{-1} (C) ADP-Lösung perfundiert. (angegeben als Mittelwert \pm SD; n = Anzahl der verwendeten Herzen. * = signifikant verändert zu allen Vorlaufswerten).

Durch die Applikation einer $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ADP-Lösung (B) nahm das Herzminutenvolumen zwischen t_6 und t_8 signifikant von $15,4 \pm 3,65 \text{ mL min}^{-1}$ auf $20,35 \pm 5,43 \text{ mL min}^{-1}$ zu. Der ventrikuläre Druck wurde ebenfalls zwischen t_6 und t_8 signifikant von $0,78 \pm 0,23 \text{ kPa}$ auf $1,05 \pm 0,27 \text{ kPa}$ gesteigert, genauso wie das Schlagvolumen, das von $0,33 \pm 0,09$ auf $0,46 \pm 0,15 \text{ kPa}$ signifikant erhöht war. Durch die Perfusion mit einer 5 mmol L^{-1} Lösung (C) konnten die Parameter nicht weiter gesteigert werden. Das Herzminutenvolumen nahm nicht signifikant von $10,95 \pm 1,84 \text{ mL min}^{-1}$ auf $13,77 \pm 2,18 \text{ mL min}^{-1}$ zu und der ventrikuläre Druck stieg nicht signifikant von $0,99 \pm 0,29 \text{ kPa}$ auf $1,26 \pm 0,26 \text{ kPa}$ an.

Das aus der Herzfrequenz und dem Herzminutenvolumen berechnete Schlagvolumen nahm drei Minuten nach Perfusionsende signifikant von $0,25 \pm 0,09$ auf $0,36 \pm 0,14 \text{ mL Schlag}^{-1}$ zu. Im Vergleich zur Perfusion mit der $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Lösung (B) wurden die maxi-

malen Effekte jedoch um eine Minute verzögert erreicht. Bei B wurde der maximale Wert zum Zeitpunkt t_7 gemessen, wohingegen bei C der maximale Wert bei t_8 erreicht wurde.

Unabhängig davon waren die erhöhten Werte der geänderten Parameter innerhalb von zwei Minuten (B) bzw. drei Minuten in C (Schlagvolumen) nach dem Perfusionsende abgeklungen.

3.1.1.4 Perfusion der semi-isolierten (*in situ*) Herzen mit ATP-Lösung

Abbildung 3.4 stellt den Einfluß dreier ATP-Lösungen (A, B und C) auf die semi-isolierten (*in situ*) Herzen dar.

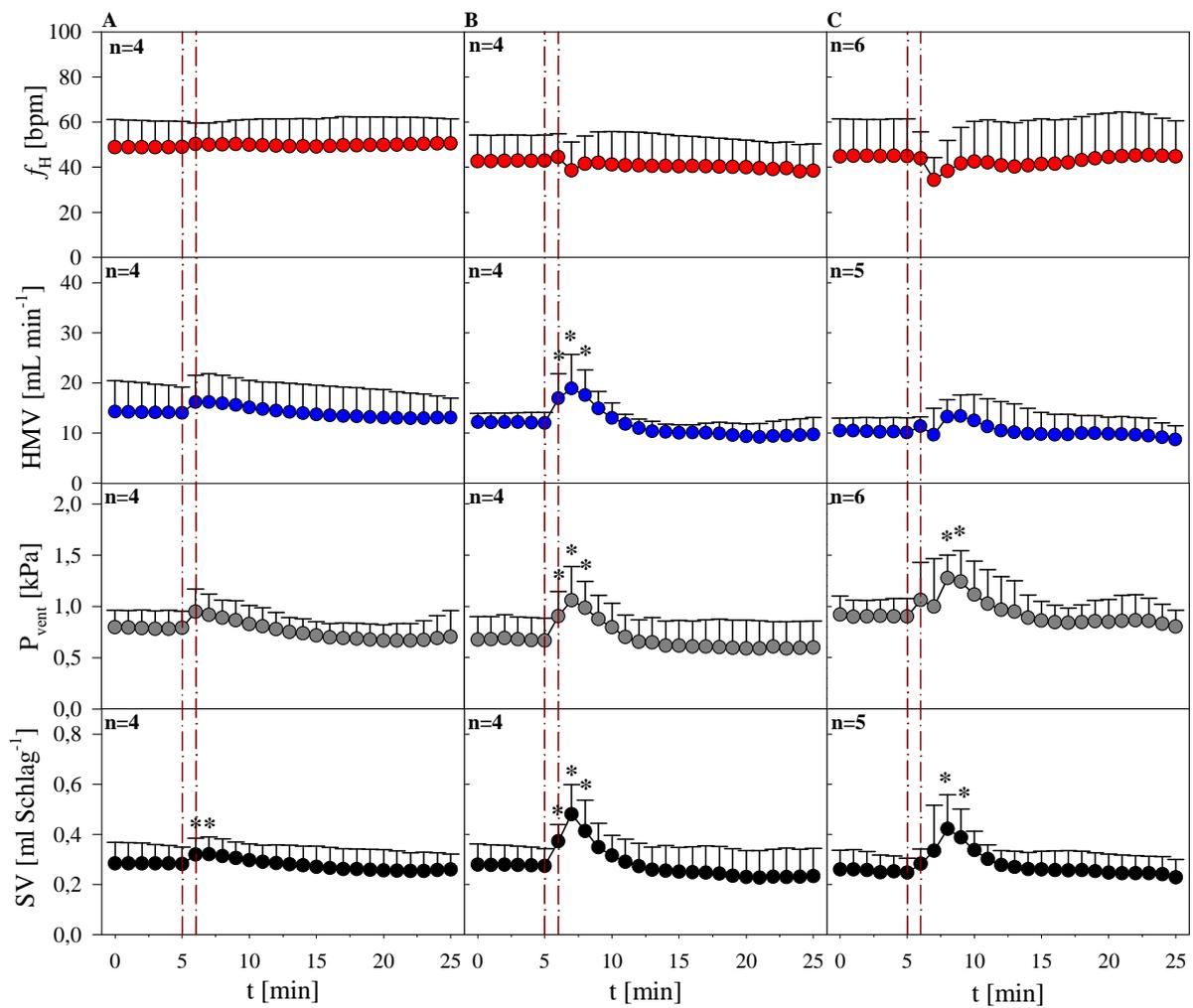


Abb. 3.4: Änderung der Herzparameter der semi-isolierten (*in situ*) Herzen, von *H. americanus*, in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration. Nach einem Vorlauf von fünf Minuten wurde das Herz für eine Minute mit einer 1 mmol L^{-1} (A), $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (B) und 5 mmol L^{-1} (C) ATP-Lösung perfundiert. (angegeben als Mittelwert \pm SD; n = Anzahl der verwendeten Herzen. * = signifikant verändert zu allen Vorlaufswerten).

Die Perfusion einer 1 mmol L^{-1} ATP-Lösung (A) hatte keinen Einfluß auf die Herzfrequenz. Die Herzrate betrug über den gesamten Versuchszeitraum gemittelt $50 \pm 10 \text{ bpm}$. Dagegen kam es bei der $2,5$ - (B) und 5 mmol L^{-1} ATP-Lösung (C) eine Minute nach der Perfusi-

on zu einem kurzfristigen Abfall der Herzfrequenz. Durch die 5 mmol L⁻¹ ATP-Lösung (C) war der Abfall ausgehend vom Vorlauf mit 45 ± 16 bpm auf 34 ± 10 bpm stärker ausgeprägt als durch die 2,5 mmol L⁻¹ ATP-Lösung (B), hier fiel die Herzrate von 46 ± 11 bpm auf 42 ± 12 bpm. Des Weiteren sank bei B die Herzfrequenz bis zum Ende der Erholungsphase kontinuierlich, aber nicht signifikant bis auf 42 ± 12 bpm ab. Dagegen stieg bei C die Herzfrequenz bis zum Versuchsende erneut auf 45 ± 16 bpm an.

Unter dem Einfluß einer 1 mmol L⁻¹ ATP-Lösung wurde das Herzminutenvolumen ausgehend von 14,11 ± 4,76 mL min⁻¹ um das 1,15fache gesteigert. Bei B kam es zwischen der sechsten und neunten Versuchsminute zu einer signifikanten Zunahme um das 1,6fache, von 12,14 ± 1,67 auf 19,64 ± 7,53 mL min⁻¹. Bei C konnte eine 1,3fache Steigerung des Herzminutenvolumens von 10,29 ± 2,77 auf 13,37 ± 4,2 mL min⁻¹ verzeichnet werden.

Die Perfusion einer 1 mmol L⁻¹ ATP-Lösung (A) steigert den ventrikulären Druck um 20%. Die Zunahme von 0,79 ± 0,17 auf 0,96 ± 0,22 kPa war dabei nicht signifikant. 2,5 mmol L⁻¹ ATP (B) erhöhte den ventrikuläre Druck von 0,63 ± 0,21 auf 1,09 ± 0,289 kPa. Das entspricht einer Zunahme von 70%. Durch die 5 mmol L⁻¹ Lösung (C) wurde die Amplitude nicht weiter gesteigert. Der Druck nahm lediglich um 40% von 0,9 ± 0,17 auf 1,38 ± 0,31 kPa zu.

Das Schlagvolumen stieg durch die Perfusion mit einer 1 mmol L⁻¹ Lösung (A) von 0,28 ± 0,08 mL Schlag⁻¹ auf 0,32 ± 0,07 mL Schlag⁻¹ (14%) an. 2,5 mmol L⁻¹ ATP (B) führten zu einer Zunahme von 0,28 ± 0,08 mL Schlag⁻¹ auf 0,49 ± 0,12 mL Schlag⁻¹ (75%). Eine ATP-Konzentration von 5 mmol L⁻¹ (C) steigerte das Schlagvolumen von 0,25 ± 0,07 mL Schlag⁻¹ auf 0,42 ± 0,14 mL Schlag⁻¹ und somit um 68%.

Bei B und C ist zusätzlich zu erkennen, daß die durch ATP hervorgerufenen Effekte zwischen der zweiten und dritten Minute abgeklungen waren. Danach verliefen die Werte im Bereich des Vorlaufniveaus.

3.1.1.5 Vergleich der Wirkung von Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen auf die semi-isolierte (*in situ*) Herzaktivität

Abbildung 3.5 zeigt den Einfluß von Adenosin und seiner Nukleotide auf die Herzfrequenz [bpm] und den ventrikulären Druck [kPa]. Nach einem Vorlauf von fünf Minuten wurden die Herzen für eine Minute mit einer 2,5 mmol L⁻¹ Lösung von Adenosin und den Adeninnukleotiden perfundiert. Es schloss sich eine 19 minütige Erholungsphase an.

Die Herzfrequenzen lagen während der Vorläufe zwischen 54 ± 13 bpm (Adenosin) und 46 ± 11 bpm (ATP) und zeigten für den restlichen Versuchszeitraum nur geringe Abwei-

chungen von maximal 2-3 Schlägen. Lediglich für ATP kam es gegen Ende der Erholungsphase zu einer nicht signifikanten Abnahme der Frequenz von 46 ± 11 bpm auf 41 ± 12 bpm.

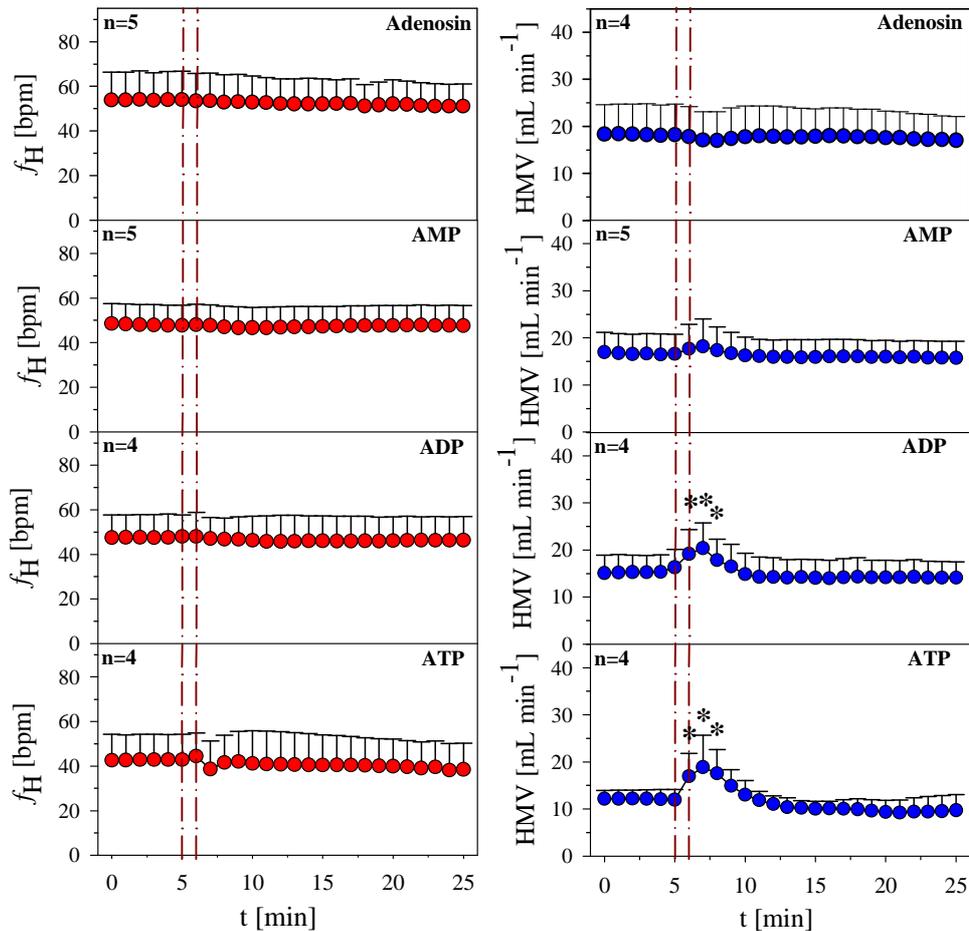


Abb. 3.5: Vergleich der Wirkungen von Adenosin- und Adeninucleotidlösungen auf die Herzfrequenz [bpm], das Herzminutenvolumen [mL min^{-1}], der semi-isolierten (*in situ*) Herzen des Amerikanischen Hummers, *Homarus americanus*. Nach einem Vorlauf von fünf Minuten wurde das Herz für eine Minute mit einer $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Adenosin-, AMP-, ADP-, und ATP-Lösung perfundiert. (angegeben als Mittelwert \pm SD; n = Anzahl der verwendeten Herzen. * = signifikant verändert zu allen Vorlaufswerten).

Vergleicht man die Wirkungen von Adenosin und den Adeninucleotiden auf das Herzminutenvolumen, so wurde dieses, ausgehend von Adenosin in der Reihenfolge AMP, ADP und ATP, erhöht. Durch die Adenosin Perfusion wurde der Herzausstoß nicht signifikant von $1,56 \pm 1,01 \text{ mL min}^{-1}$ reduziert und AMP erhöhte das Herzminutenvolumen nicht signifikant um $1,76 \pm 1,61 \text{ mL min}^{-1}$. ADP und ATP steigerten beginnend mit der Perfusion den Herzausstoß signifikant um den Faktor 1,32 und 1,62.

Die gemittelten Vorlaufswerte (t_0 - t_5) und die maximalen Werte des Herzminutenvolumens und die daraus berechneten Differenzen (Δ [mL min^{-1}]) sind für Adenosin und die Adeninucleotide in Tabelle 3.1 wiedergegeben. Zusätzlich ist der Zeitraum bis zum Erreichen des maximalen Wertes (t_{max} [s]) und der Zeitraum bis zum Ausklang des gesteigerten Herzmi-

nutenvolumens (t_{Er} [s]), ausgehend vom Perfusionsbeginn, angegeben. Zur Ermittlung der Zeiträume wurde der Vorlauf eines jeden Einzelexperimentes gemittelt (t_0 - t_5) und ausgehend von diesem Mittelwert wurde die Zeit bis zur maximalen Änderung bestimmt. Die Erholungszeitspanne wurde festgestellt, indem erneut vom Vorlaufsmittelwert und dessen Standardabweichung der Zeitpunkt ermittelt wurde, an dem das Herzminutenvolumen wieder innerhalb der Standardabweichung des Vorlaufs lag.

Ausgehend von Adenosin nahm die Differenz zwischen Vorlauf und maximalen Wert zum ATP hin zu. Die Zeit (s), die dabei benötigt wurde, lag zwischen 105 ± 30 (ADP) und 195 ± 57 Sekunden (Adenosin).

Tab. 3.1: Vergleich der gemittelten Vorlaufswerte des Herzminutenvolumens [mL min^{-1}] mit den maximal erreichten Werten [mL min^{-1}] und der daraus berechneten Differenz [$\Delta \text{mL min}^{-1}$] für die Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$]. Ebenfalls angegeben ist die Zeit [s] bis der maximale Wert (t_{\max} [s]), und der Erholungszeitraum (t_{Er} [s]) erreicht wurde. Die Werte wurden anhand der Einzelläufe ermittelt.

	MW Vorlauf [mL min^{-1}]	max. HMV [mL min^{-1}]	$\Delta[\text{mL min}^{-1}]$	t_{\max} [s]	t_{Er} [s]	n
Adenosin	$18,26 \pm 6,43$	$16,70 \pm 6,00$	$-1,56 \pm 1,01$	$195 \pm 57,0$	$270 \pm 232,4$	4
AMP	$16,65 \pm 4,24$	$18,62 \pm 5,51$	$1,76 \pm 1,61$	$180 \pm 169,7$	$180 \pm 84,9$	5
ADP	$15,40 \pm 3,65$	$20,87 \pm 5,41$	$5,47 \pm 2,09$	$105 \pm 30,0$	$255 \pm 90,0$	4
ATP	$12,14 \pm 1,65$	$19,94 \pm 7,37$	$7,81 \pm 6,26$	$150 \pm 34,6$	$310 \pm 66,0$	4

Der durch die Perfusion der Nukleotide hervorgerufene Anstieg des Herzminutenvolumens wurde in der Reihenfolge AMP < ADP < ATP terminiert.

Der Einfluß von Adenosin- und den Adeninnukleotidlösungen auf den ventrikulären Druck [kPa] und das Schlagvolumen [mL Schlag^{-1}] ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Der ventrikuläre Druck lag zu Beginn der Adenosinperfusion bei $0,39 \pm 0,19$ kPa und nahm während der Erholungsphase nicht signifikant um 0,02 kPa ab. Durch die AMP-Lösung nahm der ventrikuläre Druck circa eine Minute nach Perfusionsbeginn ausgehend von $0,36 \pm 0,13$ kPa nicht signifikant auf $0,39 \pm 0,19$ kPa zu.

Erst die Perfusionen mit ADP und ATP führten im Vergleich zum Vorlauf zu einem um das 1,35fache (ADP) und 1,7fache (ATP) signifikant gesteigerten ventrikulären Druck. Die in Tabelle 3.2 dargestellten Werte geben den Einfluß von Adenosin und den Adeninnukleotiden auf den ventrikulären Druck wider.

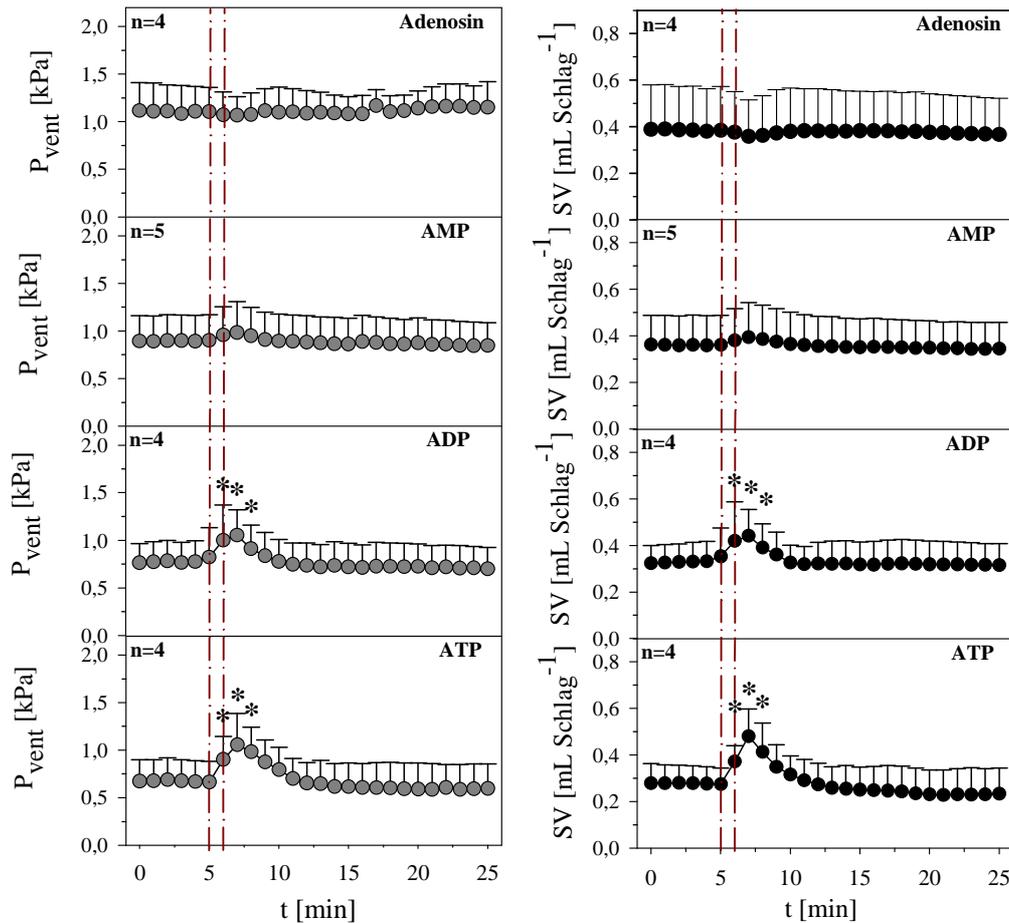


Abb. 3.6: Dargestellt ist die Wirkungen von Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen auf den ventrikulären Druck [kPa] und das Schlagvolumen [mL Schlag⁻¹], semi-isolierter Herzen des Amerikanischen Hummers. Nach einem Vorlauf von fünf Minuten wurde das Herz für eine Minute mit einer 2,5 mmol L⁻¹ Adenosin, AMP-, ADP- und ATP-Lösung perfundiert. (angegeben als Mittelwert ± SD; n = Anzahl der verwendeten Herzen. * = signifikant verändert zu allen Vorlaufswerten).

Die Zeiten (t_{\max}), die dabei benötigt wurden, bis die maximalen Effekte eingetreten waren, lagen zwischen 105 ± 30 (ADP) und $180 \pm 203,5$ Sekunden (AMP). Der Anstieg des ventrikulären Drucks wurde in der Reihenfolge Adenosin < AMP ≤ ADP < ATP beendet.

Tab. 3.2: Vergleich der gemittelten Vorlaufwerte des ventrikulären Drucks [kPa] mit den maximal erreichten Werten [kPa] und der daraus berechneten Differenz [Δ mL min⁻¹] für die Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen [2,4 nmol min⁻¹ g⁻¹FG]. Ebenfalls angegeben ist die Zeit [s] bis der maximale Wert (t_{\max} [s]) und der Erholungszeitraum (t_{Er} [s]) erreicht wurde. Die Werte wurden anhand der Einzelläufe ermittelt.

	MW Vorlauf [kPa]	max. P.vent [kPa]	Δ [kPa]	t_{\max} [s]	t_{Er} [s]	n
Adenosin	1,11 ± 0,28	1,04 ± 0,22	-0,07 ± 0,06	105 ± 57,0	105 ± 123,7	4
AMP	0,90 ± 0,27	1,00 ± 0,24	0,11 ± 0,06	180 ± 203,5	240 ± 49,0	5
ADP	0,78 ± 0,23	1,10 ± 0,33	0,32 ± 0,11	105 ± 30,0	240 ± 109,5	4
ATP	0,63 ± 0,21	1,09 ± 0,28	0,46 ± 0,30	150 ± 34,6	375 ± 75,0	4

Das Schlagvolumen [mL Schlag⁻¹] wurde durch Adenosin nicht signifikant um $-0,03 \pm 0,04$ mL Schlag⁻¹ reduziert, während durch AMP das Schlagvolumen um $0,04 \pm 0,02$ mL Schlag⁻¹ zunahm (Abb. 3.6 und Tab. 3.3). ADP und ATP hingegen erhöhten das Schlagvolumen signifikant um $0,13 \pm 0,06$ (ADP) und um $0,2 \pm 0,09$ mL Schlag⁻¹ (ATP).

In Tabelle 3.3 sind die Änderungen für das Schlagvolumen angegeben. Ebenfalls sind die Zeiten angegeben, in denen der maximale Wert erreicht wurde und der Effekt wieder abgeklungen war. Die maximalen Änderungen wurden zwischen 120 ± 0 (ATP) und $168 \pm 143,2$ (AMP) Sekunden erreicht.

Tab. 3.3: Vergleich der gemittelten Vorlaufswerte des Schlagvolumens [mL Schlag⁻¹] mit den maximal erreichten Werten [mL Schlag⁻¹] und der daraus berechneten Differenz [Δ mL min⁻¹] für die Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen [2,4 nmol min⁻¹ g⁻¹FG]. Ebenfalls angegeben ist die Zeit [s] bis der maximale Wert (t_{\max} [s]) und der Erholungszeitraum (t_{Er} [s]) erreicht wurde. Die Werte wurden anhand der Einzelläufe ermittelt.

	MW Vorlauf [mL Schlag ⁻¹]	max. SV [mL Schlag ⁻¹]	Δ [mL Schlag ⁻¹]	t_{\max} [s]	t_{Er} [s]	n
Adenosin	$0,39 \pm 0,19$	$0,36 \pm 0,16$	$-0,03 \pm 0,04$	$120 \pm 49,0$	$210 \pm 103,9$	4
AMP	$0,36 \pm 0,13$	$0,40 \pm 0,14$	$0,04 \pm 0,02$	$168 \pm 143,2$	$225 \pm 150,0$	5
ADP	$0,33 \pm 0,09$	$0,46 \pm 0,15$	$0,13 \pm 0,06$	$105 \pm 30,0$	$255 \pm 90,0$	4
ATP	$0,28 \pm 0,08$	$0,48 \pm 0,12$	$0,20 \pm 0,09$	$120 \pm 0,0$	$390 \pm 77,5$	4

Das durch die Perfusion von Adenosin- und den Adeninnukleotidlösungen geänderte Schlagvolumen erreichte in der Reihenfolge Adenosin < AMP \leq ADP < ATP wieder den Ruhewertebereich.

3.2 *In vivo* Messungen mit dem Pulsed-Doppler-Flowmeter: Vergleich zwischen intakten Tieren und Tieren denen die kardioregulatorischen Nerven durchtrennt wurden (denervierte Hummer)

Die Wirkung von Adenosin und seinen Nukleotiden auf die Herzfrequenz [bpm] und die Fließgeschwindigkeit [mm s⁻¹] der Hämolymphe in verschiedenen Gefäßen von *Homarus americanus* wurde mit Hilfe der Pulsed-Doppler Flowmetrie (siehe 2.4, Seite 19) *in vivo* in intakten und denervierten Hummern untersucht. Dabei wurden Adenosin und die Adeninnukleotide in unterschiedlichen Konzentrationen über zehn Minuten in den Peribranchialsinus infundiert. Für die Messungen bei denervierten Tieren wurden, basierend auf einer Methode nach Guirguis und Wilkens (1995), den Hummern die kardioregulatorischen Nerven durchtrennt (siehe 2.4.2.2, Seite 21). Durch diesen Eingriff wurden neuronale Einflüsse seitens des zentralen Nervensystems unterbunden. Im weiteren Verlauf des Ergebnisteils werden diese Hummer als denervierte Tiere bezeichnet. In Verbindung mit den Ergebnissen aus der semi-

isolierten (*in situ*) Herzpräparation sollte es möglich sein, weitere Rückschlüsse auf die Wirkungsvermittlung von Adenosin und den Adennukleotiden zu ziehen.

3.2.1 Vergleich der Herzfrequenz und der Fließgeschwindigkeit unter Adenosineinfluß

Im folgenden sollen die Einflüsse von Adenosin auf das Herzkreislaufsystem des Amerikanischen Hummers dargestellt werden. In Abb. 3.7 ist der Gesamtvergleich unter Adosineinfluß mit einer Konzentration von $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ dargestellt. Neben dieser Konzentration wurde der Einfluß durch eine $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ und $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ Adosinlösung getestet. Diese Abbildungen zum Gesamtvergleich finden sich im Anhang. Der Einfluß der verschiedenen Adosinkonzentrationen auf die Herzfrequenz sowie die Fließgeschwindigkeit in den A. descendens, A posterior und A. laterales werden unter 3.2.1.2 und unter 3.2.1.3. beschrieben.

3.2.1.1 Gesamtvergleich unter dem Einfluß von Adenosin [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$]

Abbildung 3.7 zeigt die durch Adosininfusion [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$] hervorgerufenen Effekte auf die Herzfrequenz [bpm] und die Fließgeschwindigkeit [mm s^{-1}] für die A. posterior, A. descendens und die A. lateralis für intakte (A) und denervierte Hummer (B).

In intakten Amerikanischen Hummern stieg innerhalb von ein bis zwei Minuten nach Infusionsbeginn die Herzfrequenz ausgehend von $73 \pm 6 \text{ bpm}$ schnell und signifikant auf $87 \pm 5 \text{ bpm}$ an. Zwölf Minuten nach Ende der Infusion war die Herzfrequenz auf $75 \pm 8 \text{ bpm}$ abgesunken. Bis zum Ende der Erholungsphase blieb die Herzrate im Vergleich mit den Vorlaufswerten um 4 bis 7% erhöht. Im Gegensatz dazu kam es bei den denervierten Hummern zu einem langsamen, gleichmäßigen, nicht signifikanten Anstieg der Herzfrequenz bis zum Ende der Infusion von 81 ± 16 auf $85 \pm 14 \text{ bpm}$. Während der Erholungsphase blieb sie um ca. 5% erhöht.

Der Verlauf der Fließgeschwindigkeit in den drei untersuchten Gefäßen bei intakten und denervierten Tieren verlief nach einem ähnlichen, aber unterschiedlich ausgeprägten Reaktionsmuster. Die Fließgeschwindigkeit in der Aorta posterior intakter Tiere (A) lag während des Vorlaufs bei $29,23 \pm 10,12 \text{ mm s}^{-1}$. Eine Minute nach dem die Infusion gestartet worden war, stieg die Fließgeschwindigkeit an und war ab der zweiten Infusionsminute bis zur dritten Minute nach der Infusion signifikant erhöht. Die maximale Fließgeschwindigkeit ($98,88 \pm 43,17 \text{ mm s}^{-1}$) wurde zum Zeitpunkt t_{17} erreicht. Bevor die Infusion beendet wurde, begann

die Fließgeschwindigkeit zu fallen und erreichte nach sechs Minuten einen leicht erhöhten Vorlaufswert von $35,99 \pm 14,4 \text{ mm s}^{-1}$, der bis zum Versuchsende erhöht blieb.

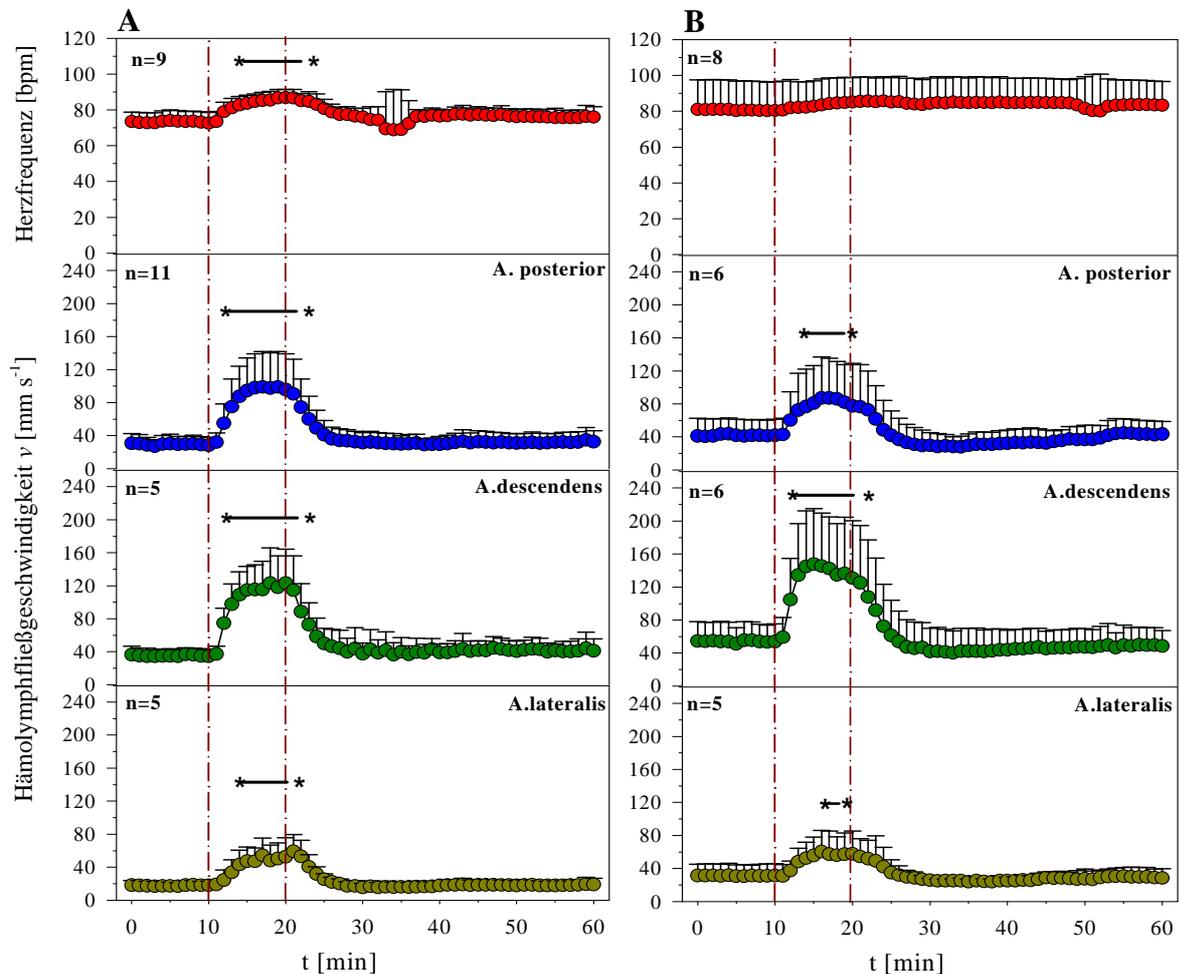


Abb. 3.7: *In vivo* Vergleich zwischen intakten (A) und denervierten (B) Amerikanischen Hummern, *Homarus americanus* unter dem Einfluß von $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ FG Adenosinlösung auf die Herzfrequenz [bpm] und die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [mm s^{-1}] in verschiedenen Gefäßen. Nach einem zehninütigen Vorlauf wurden $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ FG Adenosinlösung über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

Die Fließgeschwindigkeit in der A. posterior für denervierte Tiere (B) wurde ausgehend von einem Ruhewert ($41,86 \pm 19,83 \text{ mm s}^{-1}$) maximal auf $87,36 \pm 49,36 \text{ mm s}^{-1}$ gesteigert und war ab der vierten Infusionsminute bis eine Minute nach der Infusion signifikant erhöht. Auch hier begann die Geschwindigkeit bereits während der Infusion abzunehmen. Im Gegensatz zum intakten Tier wurde bereits nach drei Minuten der Vorlaufwertbereich erreicht. Im weiteren Verlauf sank die Fließgeschwindigkeit unter den Vorlaufwert, stieg aber bis zum Ende der Erholungsphase erneut an.

Für die A. descendens nahm die Fließgeschwindigkeit um das 3,5fache im Vergleich zum Vorlauf ($35,29 \pm 8,79 \text{ mm s}^{-1}$) zu und war ab der zwölften bis zur 23. Minute signifikant

erhöht. Acht Minuten nach Ende der Infusion war die Geschwindigkeit der Hämolymphe auf $40,14 \pm 16,11 \text{ mm s}^{-1}$ abgesunken.

In denervierten Tieren wurde die Hämolympffließgeschwindigkeit um das 2,73fache zum Vorlaufswert beschleunigt. Die Geschwindigkeit nahm von $54,06 \pm 22,24$ auf $147,65 \pm 67,6 \text{ mm s}^{-1}$ zu und war auch hier ab der zwölften Minute bis zur 23. Minute signifikant gesteigert. Vier Minuten nach der beendeten Infusion wurde der Vorlaufwertebereich erreicht. Die Fließgeschwindigkeit fiel aber im Gegensatz zum intakten Tier unter den Wert des Vorlaufs ($40,18 \pm 26,85 \text{ mm s}^{-1}$, 13 Minuten nach der Infusion), um dann langsam wieder auf $48,48 \pm 18,85 \text{ mm s}^{-1}$ anzusteigen.

Ein vergleichbares Bild lieferte die *A. lateralis* unter Adenosineinfluß. Die Geschwindigkeit der Hämolymphe wurde in intakten Tieren um das 3,07fache ausgehend von $17,69 \pm 5,34$ auf $54,32 \pm 20,72 \text{ mm s}^{-1}$ (t_{17}) gesteigert. In denervierten Tieren nahm sie um das 1,94fache von $31,13 \pm 14,13$ auf $60,40 \pm 25,67 \text{ mm s}^{-1}$ (t_{16}) zu. Signifikant erhöht war die Fließgeschwindigkeit zwischen der 14. und 23. Minute (intakt) und zwischen der 16. und 20. Minute (denerviert). Im intakten Hummer wurde der Vorlaufswert sechs Minuten nach Ende der Infusion erreicht, während im denervierten Tier bereits nach vier Minuten die Fließgeschwindigkeit im Bereich des Ruhewertes lag.

3.2.1.2 Vergleich der Herzfrequenz unter dem Einfluß verschieden konzentrierter Adenosinlösungen

Stegen und Grieshaber (2001) konnten in intakten Hummern einen konzentrationsabhängigen Effekt durch die Infusion von Adenosin auf die Herzfrequenz zeigen. Eine Konzentrationsabhängigkeit der Effekte in denervierten Tieren wurde durch zehnmünütige Infusionen von $0,5$, $1,2$ und $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ Adenosin, untersucht.

Die Wirkung der unterschiedlichen Adenosinlösungen auf die *in vivo* Herzfrequenz [bpm] für intakte (A) und denervierte Hummer (B) wird in (Abb. 3.8) wiedergegeben.

In intakten Tieren wurden durch die Adenosininfusionen innerhalb von ein bis zwei Minuten die Herzfrequenzen rapide gesteigert und erreichten gegen Ende der Infusionsperioden maximale Raten. Durch $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ Adenosin war der chronotrope Effekt verzögert, da diese Konzentration zuerst zu einer kurzfristigen Abnahme der Herzfrequenz führte. Danach nahm die Herzfrequenz nicht signifikant, aber durch einen raschen Anstieg gekennzeichnet, um das 1,15fache zu. Durch die Infusionen von $1,2$ und $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ Adenosin wurden die Herzfrequenzen signifikant zum Vorlauf um das 1,19fache erhöht. Die Erholungszeiträume (t_{ER}) betragen drei, fünf bzw. sechs Minuten.

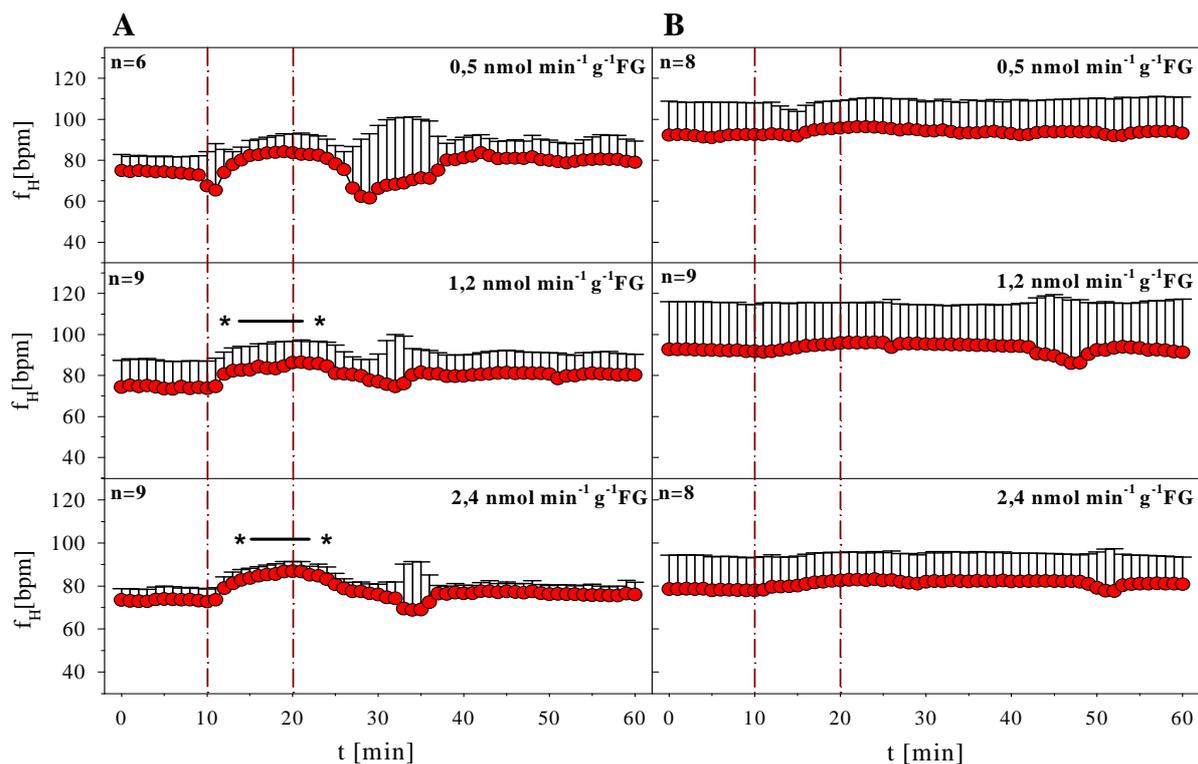


Abb. 3.8: *In vivo* Vergleich der Herzfrequenz [bpm] bei intakten (A) und denervierten (B) Hummern, *Homarus americanus* unter dem Einfluß verschieden konzentrierter Adenosinlösungen. Nach einem zehnmütigen Vorlauf wurden Adenosinlösungen mit einer Konzentration von 0,5, 1,2 und 2,4 $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$ über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere. In der rechten oberen Ecke ist die jeweils eingesetzte Konzentration angegeben.) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

Bei denervierten Tieren (B) wurden ausgehend von den gemittelten Kontrollwerten (0,5 $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$: 89 ± 17 ; 1,2 $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$: 92 ± 23 und 2,4 $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$: 81 ± 16 bpm) die Herzfrequenzen langsamen während der Infusionsphasen gesteigert. Dabei wurde während der Infusion von 0,5 $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$ Adenosinlösung die Herzfrequenz nicht signifikant um das 1,03fache gesteigert. Durch 1,2 $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$ war gegen Ende der Infusion (t_{20}) die Herzfrequenz nicht signifikant um das 1,04fache gesteigert und durch 2,4 $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$ Adenosin wurde im Vergleich zu den beiden anderen Konzentrationen nur eine geringfügig höhere Rate (1,06fach) erreicht. Bis zum Ende der Versuchsperiode blieben die Herzfrequenzen auf diesem Niveau.

3.2.1.3 Vergleich der Fließgeschwindigkeit in der A. descendens unter dem Einfluß verschieden konzentrierter Adenosinlösungen

Wie aus Abbildung 3.7 zu entnehmen ist, steigerte Adenosin in allen untersuchten Gefäßen die Hämolympffließgeschwindigkeit mit einem ähnlichen, jedoch nicht identischen Reaktionsmuster. Da der Effekt in der A. descendens am ausgeprägtesten war, soll dieses Gefäß

exemplarisch gezeigt werden (Abb. 3.9). Die Abbildungen für die beiden anderen Gefäße finden sich im Anhang, werden aber im Text besprochen.

Nach Vorläufen von zehn Minuten wurden Adenosinlösungen ($0,5; 1,2; 2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$) in die Hämolymphe infundiert. Aufgezeichnet wurde dabei die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [mm s^{-1}] während der Kontrollperiode (t_0 - t_{10}), unter Adenosineinfluß (t_{11} - t_{20}) und in der Erholungsphase (t_{21} - t_{60}).

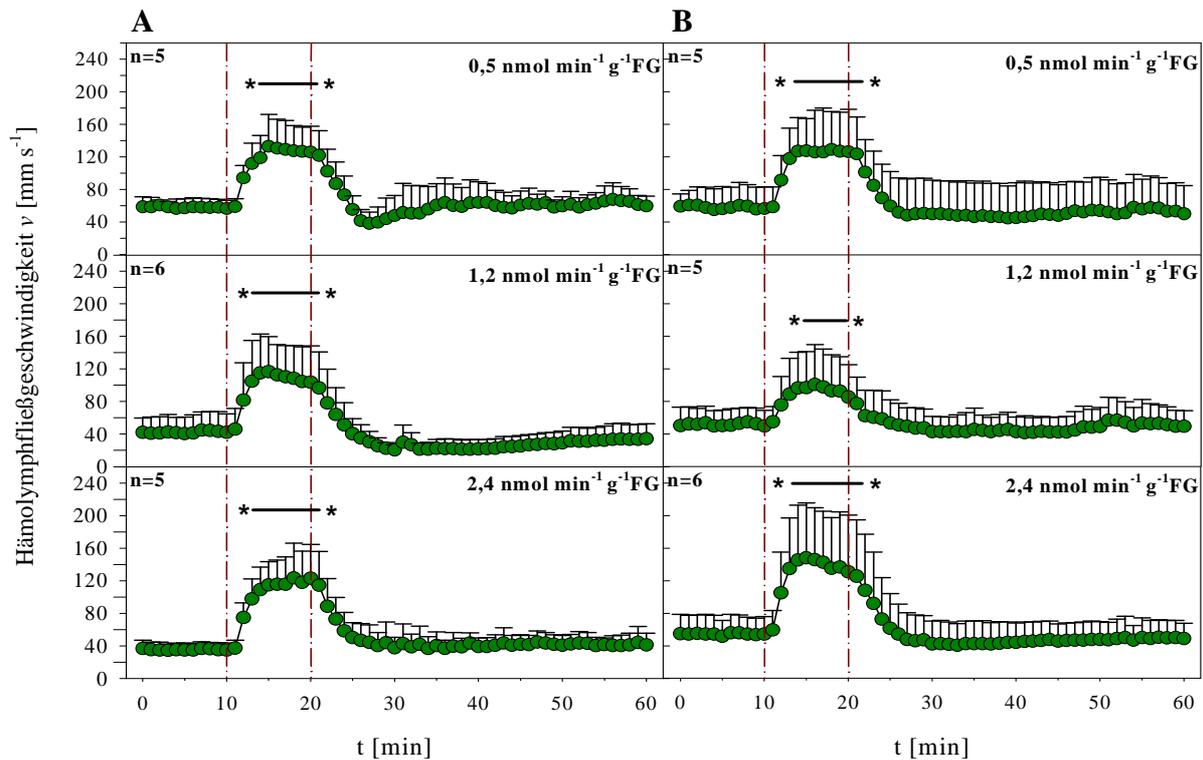


Abb. 3.9: *In vivo* Vergleich der Hämolympf-fließgeschwindigkeit [mm s^{-1}] in der Arteria descendens, intakter (A) und denervierter (B) Hummer unter Einfluß verschieden konzentrierter Adenosinlösungen. Nach einem zehnminütigen Vorlauf wurden Adenosinlösungen mit Konzentrationen von $0,5, 1,2$ und $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$ über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere. In der rechten oberen Ecke ist die jeweils eingesetzte Konzentration angegeben.) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

In intakten Tieren (A) lagen die Vorlaufwerte bei $57,99 \pm 10,39$, $42,21 \pm 21,21$ und $35,29 \pm 8,79 \text{ mm s}^{-1}$ ($0,5; 1,2; 2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$). Während der Infusionen wurde die Fließgeschwindigkeit ab der zweiten bzw. dritten ($0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$) Infusionsminute signifikant erhöht und blieb bis zwei Minuten nach Ende der Infusion signifikant gesteigert. Die Vorlaufswerte wurden zwischen der vierten ($1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$), fünften ($0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$) und zwischen der siebten und achten Minute ($2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$) erreicht. Durch die Infusionen wurde die Hämolymphe signifikant zum Vorlauf konzentrationsabhängig durch $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$ um das 2,29fache ($132,71 \pm 39,4 \text{ mm s}^{-1}$), durch $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$

um das 2,76fache ($116,64 \pm 43,21 \text{ mm s}^{-1}$) und durch $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ um das 3,49fache ($123,18 \pm 42,88 \text{ mm s}^{-1}$) beschleunigt.

Bei denervierten Tieren (Abb. 3.9, B) ergab sich durch die Infusionen der verschiedenen Konzentrationen vergleichbare Verläufe der Versuchszyklen wie in intakten Tieren. Ausgehend von den Vorlaufswerten ($57,96 \pm 24,49 \text{ mm s}^{-1}$; $51,59 \pm 19,75 \text{ mm s}^{-1}$; $54,06 \pm 22,24 \text{ mm s}^{-1}$) wurde die Hämolympffließgeschwindigkeit zwischen der zweiten ($0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) und dritten Minute ($1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) signifikant gesteigert und blieb bis eine ($1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) bzw. zwei Minuten ($0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) nach Ende der Infusion signifikant erhöht. Zwei ($1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) bzw. vier Minuten ($0,5$ und $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) nach den Infusionen wurden die Vorlaufswerte wieder erreicht. Für die denervierten Tiere wurde die Fließgeschwindigkeit dabei durch die Infusion der $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ betragenden Lösung um das 2,2fache auf $127,23 \pm 39,79 \text{ mm s}^{-1}$ gesteigert. Eine Erhöhung der Konzentration auf $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ steigerte die Fließgeschwindigkeit nur um das 1,95fache auf $100,5 \pm 49,28 \text{ mm s}^{-1}$. Durch die Infusion der nächsthöheren Konzentration ($2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) konnte die Hämolymphe um das 2,73fache auf $147,65 \pm 67,6 \text{ mm s}^{-1}$ gesteigert werden.

Vergleichbare, wenn auch nicht identische Verläufe zeigten die A. posterior und die A. lateralis unter Adenosineinfluß (Abb. 7.2, Seite 115). In beiden nahm die Fließgeschwindigkeit in intakten Tieren in der aufsteigenden Konzentrationsreihenfolge signifikant zum Vorlaufswert um das 2,6fache, 2,74fache und das 3,36fache zu. Bereits zwischen der vierten und sechsten Minute nach Ende der Infusion war der Effekt für alle Konzentrationen abgeklungen. In denervierten Tieren wurde die Fließgeschwindigkeit ebenfalls signifikant um das 1,67; 2,15 und 2,09fache gesteigert. Hier konnte durch $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ keine konzentrationsabhängige Zunahme erreicht werden. Die Zeiträume über denen die Fließgeschwindigkeit erhöht ist, waren verglichen mit intakten Tieren wesentlich kürzer. Die Werte erreichen bereits zwischen der zweiten und dritten Minute nach Infusionsende den Vorlaufswertebereich.

In der A. lateralis konnte in intakten Tieren, ausgehend von den Vorläufen, ebenfalls eine signifikant gesteigerte Fließgeschwindigkeit ($0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$: von $26,27 \pm 15,27$ auf $60,91 \pm 20,72$; $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$: von $21,38 \pm 6,88$ auf $51,36 \pm 51,36$; $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$: von $17,69 \pm 5,34$ auf $54,32 \text{ mm s}^{-1}$) ermittelt werden, wohingegen in denervierten Tieren erst ab $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ eine signifikant gesteigerte Geschwindigkeit beobachtet wurde. $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ Adenosin änderte bei denervierten Tieren die Fließgeschwindigkeit

nicht, hier wurden starke Schwankungen innerhalb der Messung beobachtet, wie sie auch schon von Stegen Maurer und Grieshaber (2001) für die *A. lateralis* beschrieben worden sind.

3.2.2 Vergleich der Herzfrequenz und der Fließgeschwindigkeit unter AMP-Einfluß

3.2.2.1 Gesamtvergleich unter dem Einfluß von AMP [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$]

Der Einfluß auf die Herzfrequenz [bpm] und die Fließgeschwindigkeit [mm s^{-1}] durch die Infusion der AMP-Lösung ($2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) in intakten (A) und denervierten (B) ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

Nach einem zehnminütigen Vorlauf ($63 \pm 10 \text{ bpm}$) wurde die Herzrate der intakten Tiere innerhalb von zwei bis drei Minuten schnell erhöht und zum Zeitpunkt t_{21} eine maximale Herzfrequenz von $82 \pm 12 \text{ bpm}$ erreicht. Ab der sechsten Infusionsminute bis zur 42. Minute und zwischen der 47. und 51. Minute war die Frequenz signifikant erhöht. Nach der 51. Minute wurden wieder Kontrollwerte erreicht.

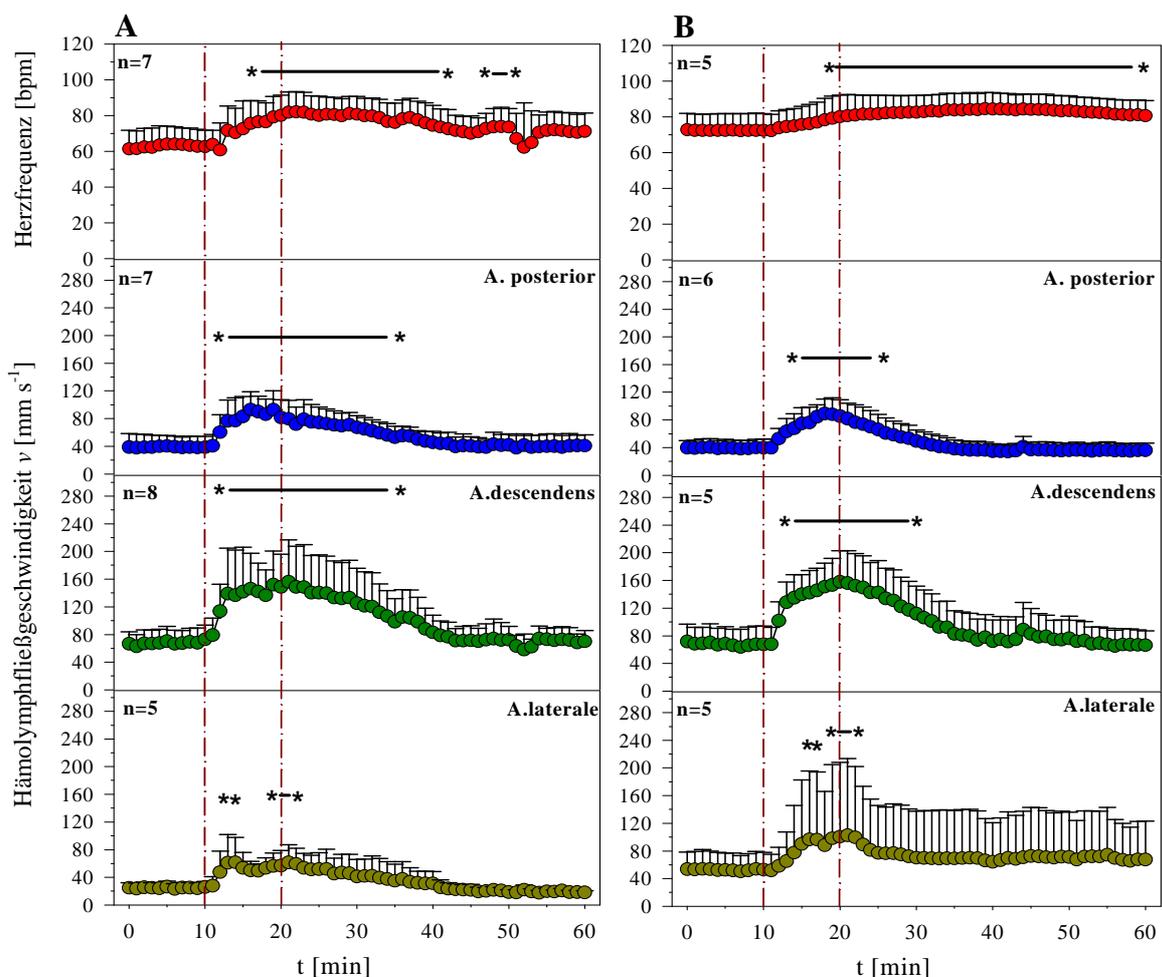


Abb. 3.10: Einfluß von $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ AMP-Lösung auf Herzfrequenz [bpm] und die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [mm s^{-1}] bei intakten (A) und denervierten (B) Tieren. Nach einem zehnminütigen Vorlauf wurden $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ AMP-Lösung über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere). * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

Im Vergleich zu den intakten Tieren (A) war das Ausgangsniveau der Herzfrequenz in denervierten Tieren (Abb. 3.10, B) erhöht. Der Kontrollwert lag, berechnet aus t_0 bis t_{10} , bei 72 ± 9 bpm und wurde durch die AMP-Infusion langsam bis zum Ende der Infusion auf 80 ± 12 bpm (t_{20}) gesteigert. Im weiteren Verlauf stieg die Frequenz an und erreichte zum Zeitpunkt t_{34} einen maximalen Wert von 84 ± 9 bpm. Die Herzfrequenz war dabei ab der achtzehnten Minute bis zum Versuchsende signifikant erhöht.

In intakten Tieren nahm die Fließgeschwindigkeit in der A. posterior von $38,67 \pm 16,86$ auf $92,91 \pm 25,79$ mm s⁻¹ zu und war ab der 13. bis zur 31. Minute signifikant erhöht. Die Fließgeschwindigkeit erreichte zum Zeitpunkt t_{35} wieder den Vorlaufwertebereich. In denervierten Tieren wurde die Hämolympffließgeschwindigkeit ausgehend von $39,34 \pm 11,80$ mm s⁻¹ auf $88,90 \pm 21,27$ mm s⁻¹ beschleunigt. Zwischen t_{14} und t_{26} wurde die Fließgeschwindigkeit signifikant erhöht und erreichte zehn Minuten nach dem Ende der Infusion wieder den Ruhewertbereich.

In intakten und denervierten Tieren kam es zu einem schnellen Anstieg der Fließgeschwindigkeit in der A. descendens von $67,66 \pm 19,52$ auf $151,95 \pm 48,62$ mm s⁻¹ (intakt) und von $67,71 \pm 25,18$ auf $157,81 \pm 45,19$ mm s⁻¹ (denerviert). Die Hämolympfgeschwindigkeit war von der zwölften bis zu 33. Minute (intakt) und von der 13. bis zur 30. Minute (denerviert) zum Ruhewert signifikant erhöht. Die Zeit, bis der Ruhewert erreicht wurde, betrug für die intakten Tiere 19 bis 20 Minuten und für die denervierten Tiere 13 Minuten.

In der A. lateralis intakter Tiere wurde die Hämolymphe signifikant um das 2,5fache und in denervierten Tieren signifikant um das 1,9fache beschleunigt. Im Vergleich zu intakten Hummern kehrten die Werte in denervierten Tieren nicht mehr auf den Ausgangswert von $52,74 \pm 25,35$ (t_{10}) zurück, sondern blieben mit $69,35 \pm 2,38$ mm s⁻¹ (Mittelwert aus den letzten 30 Minuten) in etwa 17 mm s⁻¹ darüber. Die lateralis zeigte, wie auch schon von Stegen (2001) beschrieben, kein einheitliches Bild. Vergleicht man Einzelpräparationen untereinander, so traten starke Schwankungen der gemittelten Werte des Vorlaufs (t_0 bis t_{10}) bei denervierten Hummern in einem Bereich von $22,94 \pm 0,66$ mm s⁻¹ bis $90 \pm 3,91$ mm s⁻¹ auf.

3.2.2.2 Vergleich der Herzfrequenz unter dem Einfluß verschieden konzentrierter AMP-Lösungen

In Abbildung 3.11 ist die Herzfrequenz [bpm] vor, während und 40 Minuten nach der Infusion verschieden konzentrierter AMP-Lösungen dargestellt.

In intakten Hummern wurde die Herzfrequenz in Abhängigkeit von der Konzentration signifikant um das 1,16, 1,23 und 1,3fache erhöht. Die Infusion der niedrigsten AMP-Kon-

zentration steigerte dabei die Herzfrequenz langsamer als durch die anderen beiden Konzentrationen. Für alle drei getesteten Konzentrationen erreichten die Frequenzen ihren maximalen Wert zwischen der 11. und 12. Minute.

In denervierten Hummern wurden durch AMP-Einfluß die Herzfrequenzen um das 1,06, 1,09 und 1,17fache gesteigert. Deren Zunahme erfolgte langsam und gleichmäßig. Mit Ausnahme von $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ AMP-Lösung wurde die Herzfrequenz signifikant erhöht.

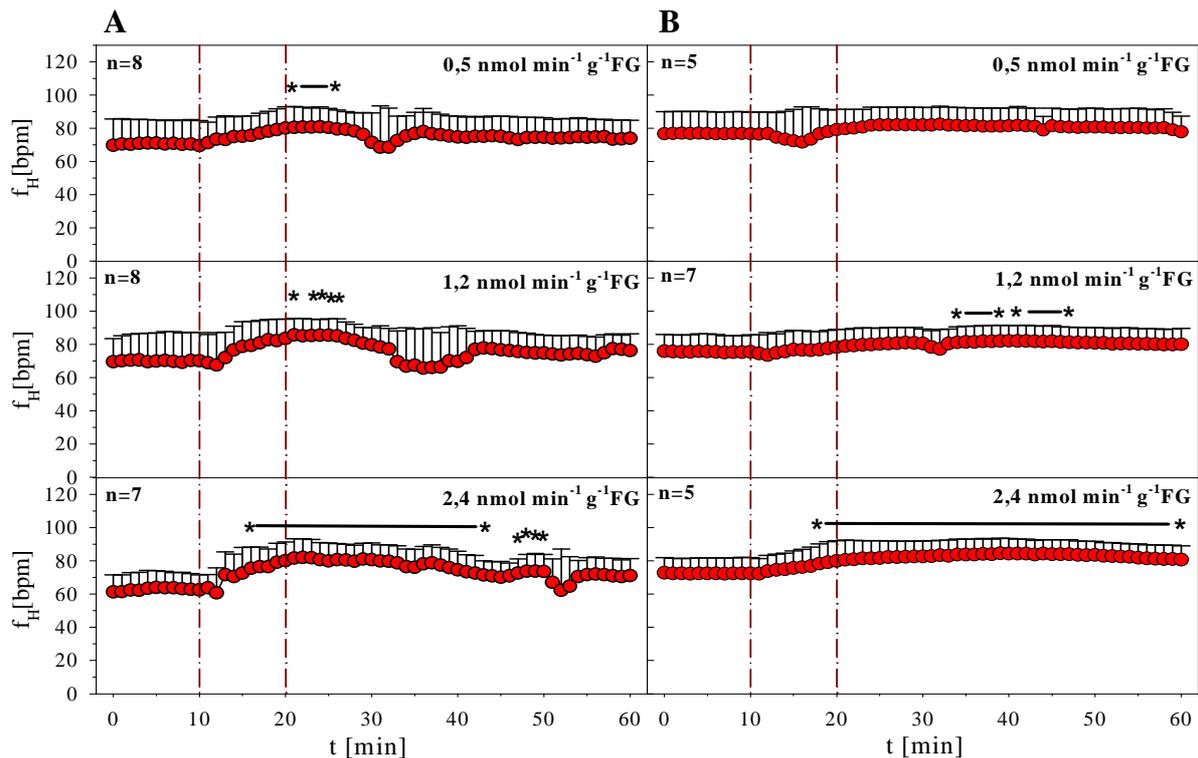


Abb. 3.11: *In vivo* Vergleich der Herzfrequenz [bpm] bei intakten (A) und denervierten (B) Hummern, *H. americanus* unter dem Einfluß verschieden konzentrierter AMP-Lösungen. Nach einem zehnmütigen Vorlauf wurden AMP-Lösungen mit einer Konzentration von $0,5$, $1,2$ und $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere. In der rechten oberen Ecke ist die jeweils eingesetzte Konzentration angegeben.) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

Durch die Infusion der $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ Adenosinlösung kam es im Verlauf der Infusionsphase zu einer nicht signifikanten Abnahme der Herzfrequenz. Gegen Ende der Infusionsperiode stieg die Herzrate erneut an und war, wie bei den anderen beiden Konzentrationen, bis zum Ende des Versuchs erhöht. Die maximalen Frequenzen wurden später als im intakten Tier nach 17 ($0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$), 27 ($1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) und 24 Minuten ($2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) erreicht.

3.2.2.3 Vergleich der Fließgeschwindigkeit in der A. descendens unter dem Einfluß verschieden konzentrierter AMP-Lösungen

Der Einfluß unterschiedlich konzentrierter AMP-Lösungen (0,5, 1,2 und 2,4 nmol min⁻¹ g⁻¹FG) in intakten (A) und denervierten (B) Tieren ist in Abbildung 3.12 wiedergegeben.

Die Fließgeschwindigkeit [mm s⁻¹] wurde dabei konzentrationsabhängig und signifikant zum Vorlauf (immer angegeben in der Reihenfolge 0,5, 1,2 und 2,4 nmol min⁻¹ g⁻¹FG) in intakten Tieren von 68,6 ± 11,67 auf 133,04 ± 61,36 mm s⁻¹, von 89,24 ± 28,09 auf 193,04 ± 43,59 mm s⁻¹ und von 67,66 ± 19,52 auf 151,95 ± 48,62 mm s⁻¹ gesteigert. Im Vergleich dazu nahm die Geschwindigkeit der Hämolymphe in denervierten Tieren ebenfalls konzentrationsabhängig und signifikant zum Vorlauf von 65,59 ± 22,54 auf 98,80 ± 33,71 mm s⁻¹, von 56,69 ± 21,8 auf 118,26 ± 43,33 mm s⁻¹ und von 67,71 ± 25,18 auf 157,81 ± 45,19 mm s⁻¹ zu. In denervierten Tieren waren die Effekte durch 0,5 und 1,2 nmol min⁻¹ g⁻¹FG weniger stark ausgeprägt als in intakten Hummern.

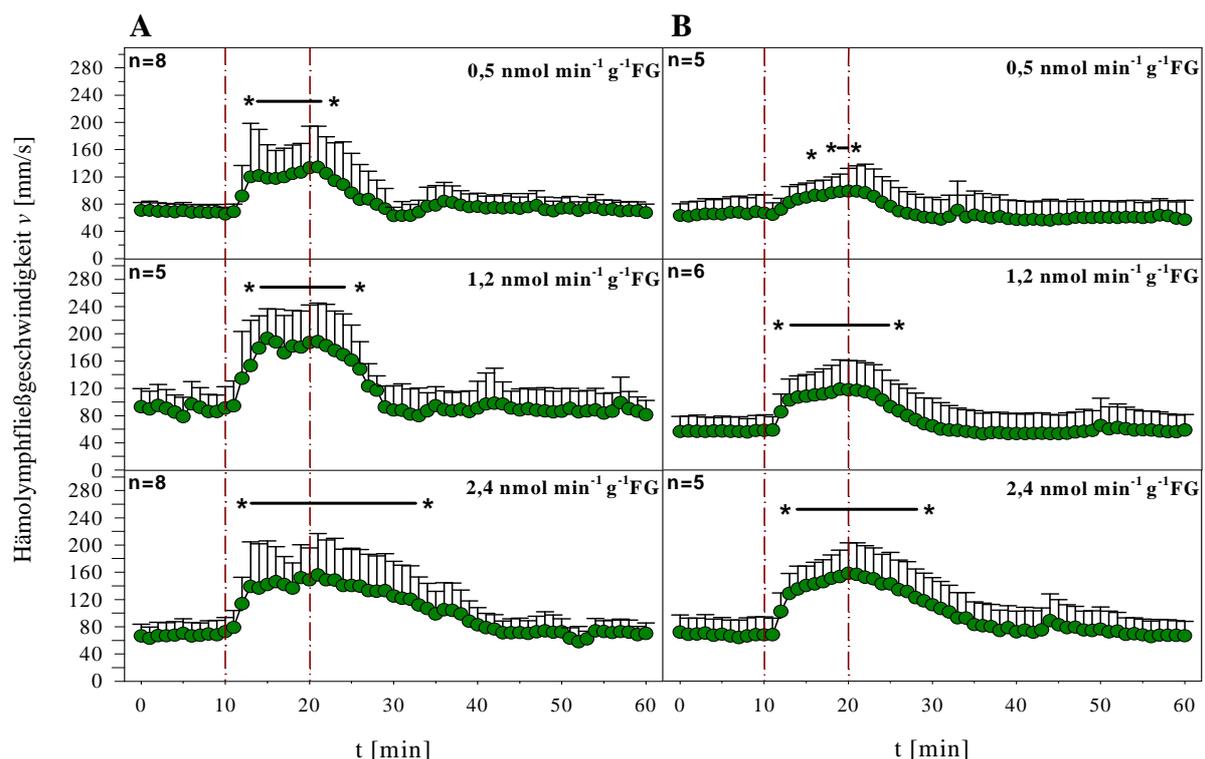


Abb. 3.12: Vergleich der Hämolympf-fließgeschwindigkeit [mm s⁻¹] in der Arteria descendens, zwischen intakten (A) und denervierten (B) Tieren unter Einfluß verschieden konzentrierter AMP-Lösungen. Nach einem zehnminütigen Vorlauf wurden AMP-Lösungen mit Konzentrationen von 0,5, 1,2 und 2,4 nmol min⁻¹ g⁻¹FG über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW ± SD; n = Anzahl der Versuchstiere. In der rechten oberen Ecke ist die jeweils eingesetzte Konzentration angegeben.) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

Vergleicht man die prozentualen Zunahmen, so wurde die Fließgeschwindigkeit bei $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ um 194 (A) bzw. 151 % (B) erhöht. Durch $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ lag die gesteigerte Geschwindigkeit bei 216 (A) und 209 % (B) und bei $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ bei 225 (intakt) und 233 % (denerviert). In intakten Tieren wurden die Effekte für acht ($0,5$ und $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) und 19,5 Minuten aufrechterhalten. Verglichen damit waren in B die Effekte nach vier, acht und dreizehn Minuten abgeklungen.

Die Fließgeschwindigkeit in der A. posterior (Abb. 7.4, Seite 116) für intakte Tiere nahm durch die Infusionen ausgehend von den gemittelten Vorlaufswerten ($0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$: $38,65 \pm 11,65$; $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$: $33,22 \pm 8,96$; $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$: $38,67 \pm 16,86 \text{ mm s}^{-1}$) innerhalb der ersten Minuten der Infusionen signifikant zu und erreichten nach t_{18} ($83,64 \pm 27,51 \text{ mm s}^{-1}$; $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) und für $1,2$ und $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ nach t_{16} ($84,59 \pm 33,83$; $92,91 \pm 25,79 \text{ mm s}^{-1}$) maximale Werte. Eine Konzentration von $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ erhöhte die Amplitude nicht weiter, sondern führte dazu, daß der Effekt länger aufrechterhalten wurde. Nach 7, 11 und 15 Minuten erreichte die Fließgeschwindigkeit das Ausgangsniveau.

In denervierten Hummern steigerte AMP die Fließgeschwindigkeit ausgehend von $39,62 \pm 11,04$ auf $72,61 \pm 18,84 \text{ mm s}^{-1}$ ($0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) von $40,43 \pm 15,05$ auf $69,11 \pm 22,39 \text{ mm s}^{-1}$ ($1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) und von $39,34 \pm 11,8$ auf $88,9 \pm 21,27 \text{ mm s}^{-1}$ ($2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) signifikant. Eine verzögerte Rückkehr auf die Kontrollwerte mit steigenden Konzentrationen ist bei denervierte Tieren ebenfalls beobachtbar. So wurden die gemittelten Vorlaufswerte nach vier ($0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$), fünf ($1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) und zehn Minuten ($2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) erreicht.

AMP steigerte in intakten Tieren in der A. lateralis (Abb. 7.4, Seite 116) die Fließgeschwindigkeit signifikant um das 2,67fache ($0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$); 2,52fache ($1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) und 2,5 ($2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$). In denervierten Tieren wurde die Fließgeschwindigkeit nicht signifikant um das 1,34fache ($0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$), 1,21fache ($1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) und signifikant um das 1,91fache ($2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) gesteigert.

3.2.3 Vergleich der Herzfrequenz und der Fließgeschwindigkeit unter ADP-Einfluß

3.2.3.1 Gesamtvergleich unter dem Einfluß von ADP [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$]

In Abbildung 3.13 ist der Einfluß einer $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ADP-Lösung auf die Herzkreislaufparameter des Amerikanischen Hummers dargestellt. Durch die zehnminütige

Infusion einer $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ FG ADP-Lösung kam es zu einem schnellen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz [bpm] in intakten Tieren von 72 ± 12 auf 93 ± 9 bpm. Die Frequenz blieb bis 24 Minuten nach der Infusion erhöht, wohingegen es in denervierten Tieren zu einer langsam zunehmenden Herzfrequenz von 88 ± 17 auf 96 ± 11 bpm kam, gefolgt von einer geringen Abnahme auf 93 ± 16 bpm (t_{60}).

In der A. posterior intakter Tiere nahm die Fließgeschwindigkeit [mm s^{-1}] der Hämolymphe innerhalb einer Minute signifikant im Vergleich zu dem Vorlaufswert um das 2,76-fache (von $41,76 \pm 14,83$ auf $115,3 \pm 23,48 \text{ mm s}^{-1}$) zu. In denervierten Tieren kam es zu einem signifikanten Anstieg um das 2,05fache (von $29,75 \pm 5,5$ auf $106,35 \pm 49,75 \text{ mm s}^{-1}$). Der ADP-Effekt hielt in intakten Tieren annähernd doppelt so lange an wie in denervierten Tieren (22 zu zehn Minuten), erst dann wurden die Vorlaufswerte erneut erreicht.

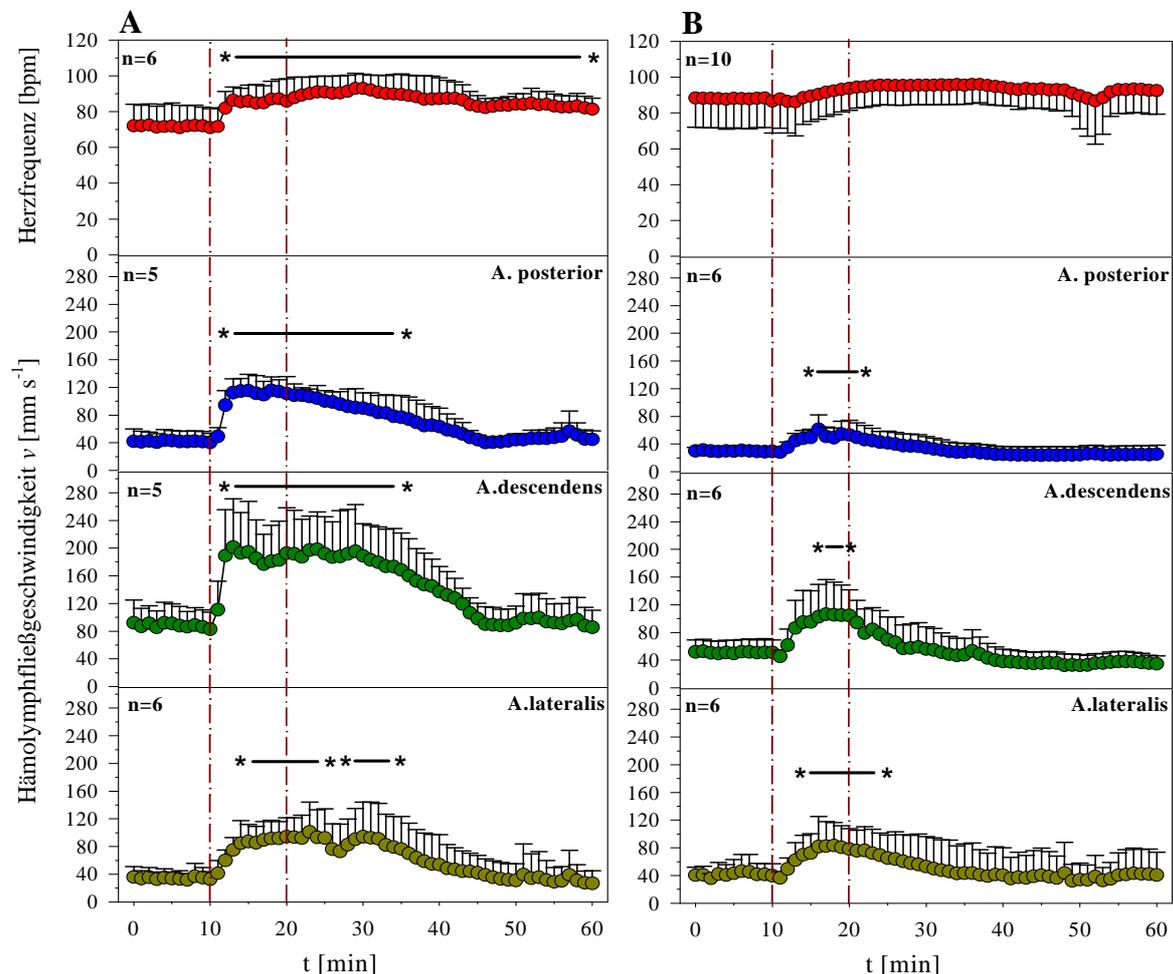


Abb. 3.13: *In vivo* Vergleich zwischen intakten (A) und denervierten (B) *H. americanus*, unter dem Einfluß von $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ FG ADP-Lösung auf die Herzfrequenz [bpm] und die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [mm s^{-1}]. Nach einem zehnmütigen Vorlauf wurden $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ FG ADP-Lösung über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

In der *A. descendens* wurde in intakten Tieren die Fließgeschwindigkeit von $88,1 \pm 26,53$ auf $194,46 \pm 72,94$ mm s⁻¹ signifikant gesteigert und in denervierten Hummern nahm die Fließgeschwindigkeit signifikant von $51,07 \pm 18,09$ auf $106,35 \pm 49,75$ mm s⁻¹ zu. Die Fließgeschwindigkeiten wurden in intakten Tieren länger aufrechterhalten als in denervierten (24 zu fünf Minuten).

In der *A. lateralis* wurde die Fließgeschwindigkeit signifikant von $34,22 \pm 12,62$ auf $94,22 \pm 27,5$ mm s⁻¹ erhöht, während es in denervierten Tieren zu einer signifikanten Zunahme der Geschwindigkeit von $41,56 \pm 16,51$ auf $83,38 \pm 33,17$ mm s⁻¹ kam. Auch hier blieb die Geschwindigkeit der Hämolymphe im Vergleich zu denervierten Hummern länger erhöht (21 zu 8 Minuten).

3.2.3.2 Vergleich der Herzfrequenz unter dem Einfluß verschieden konzentrierter ADP-Lösungen

Die Herzfrequenz wurde während eines zehnminütigen Vorlaufs, einer zehnminütigen Infusion unterschiedlich konzentrierter ADP-Lösungen in den Peribranchialsinus des Hummers und einer 40minütigen wählenden Erholungsphase bestimmt (Abb. 3.14).

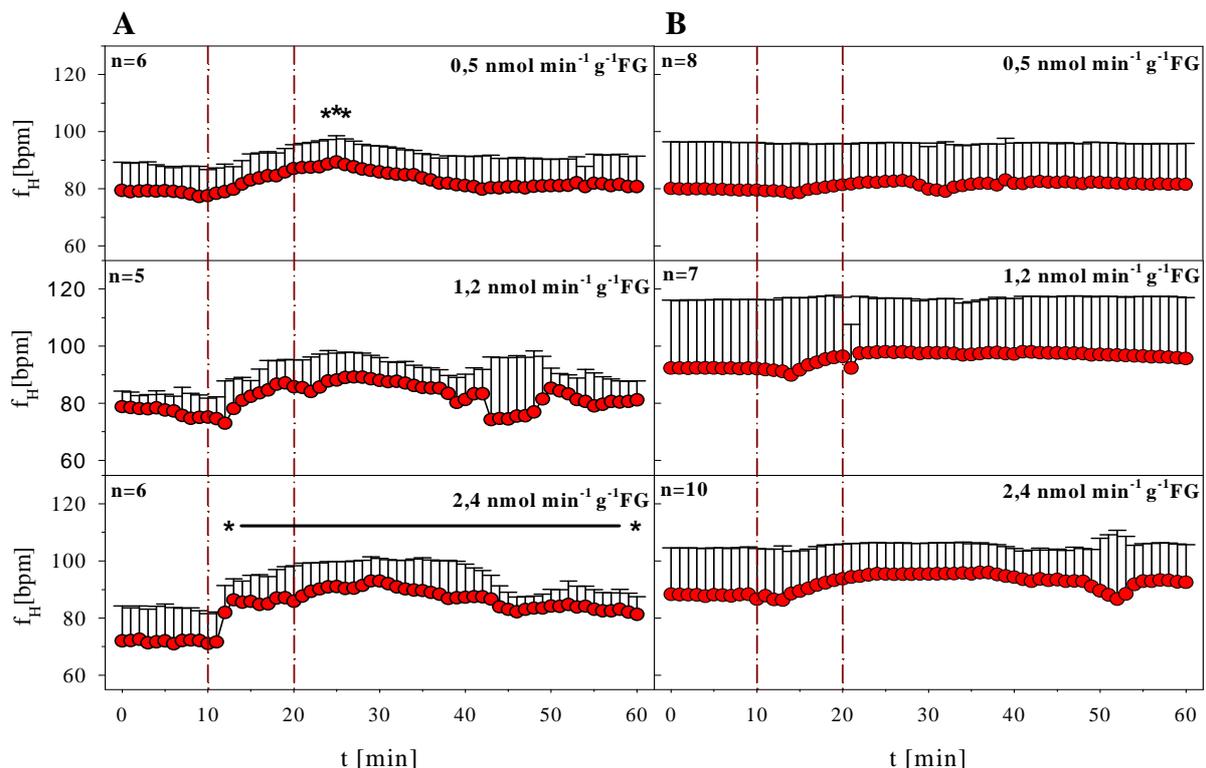


Abb. 3.14: Einfluß verschieden konzentrierter ADP-Lösungen auf die Herzfrequenz [bpm] bei intakten (A) und denervierten (B) Hummern. Nach einem zehnminütigen Vorlauf wurden die Lösungen mit einer Konzentration von 0,5, 1,2 und 2,4 nmol min⁻¹ g⁻¹FG über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere. In der rechten oberen Ecke ist die jeweils eingesetzte Konzentration angegeben.) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

In intakten Tieren wurde bei einer Infusion von $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ADP-Lösung die Frequenz von 79 ± 10 auf 89 ± 9 bpm gesteigert und war zwischen der vierten und sechsten Minute nach Ende der Infusion signifikant erhöht. Danach sank die Frequenz langsam ab und erreichte zum Zeitpunkt t_{60} 81 ± 11 Schläge pro Minute. In denervierten Tieren stieg die Frequenz unter dem Einfluß derselben Konzentration nur geringfügig von 78 ± 17 auf 82 ± 14 bpm an, blieb aber bis zum Ende der Erholungsphase annähernd auf diesem Niveau.

Mit Beginn der ADP-Infusion [$1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$] stieg die Herzfrequenz in intakten Hummern ausgehend von dem Vorlauf nicht signifikant von 77 ± 6 bpm auf 89 ± 9 bpm an. Auch hier sank die Herzfrequenz nach Erreichen eines maximalen Wertes langsam ab. Für denervierte Tiere wurde ab der fünften Minute nach Infusionsbeginn ein nicht signifikanter Anstieg von 92 ± 24 auf 98 ± 20 bpm beobachtet. Wie schon unter 3.2.2.4 beschrieben, wurde die Herzfrequenz während der Infusion einer $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ADP-Lösung in intakten Tieren signifikant um das 1,29fache und in denervierten Tieren nicht signifikant um das 1,09fache gesteigert.

3.2.3.3 Vergleich der Fließgeschwindigkeit in der A. descendens unter dem Einfluß verschieden konzentrierter ADP-Lösungen

In Abb. 3.15 ist die Fließgeschwindigkeit [mm s^{-1}] in der A. descendens unter ADP-Einfluß dargestellt. In intakten Tieren (A) wurde durch die Infusionen von $0,5$ und $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ die Fließgeschwindigkeit konzentrationsabhängig und signifikant ausgehend vom Vorlauf um das 1,74 bzw. um das 2,21fache gesteigert ($66,46 \pm 19,24 \text{ mm s}^{-1}$ auf $115,61 \text{ mm s}^{-1}$ und $83,6 \pm 19,36$ auf $184,4 \pm 50,26 \text{ mm s}^{-1}$). Unter dem Einfluß einer $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ADP-Lösung nahm die Geschwindigkeit ebenfalls signifikant um das 2,21fache von $88,1 \pm 26,53$ auf $194,46 \pm 72,94 \text{ mm s}^{-1}$ zu. Durch die höhere Konzentration wurde zwar nicht die Amplitude gesteigert, aber der Effekt wurde länger aufrechterhalten. So wurden die Vorlaufswerte durch $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ nach acht Minuten, durch $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ nach 17 Minuten und durch $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ nach 24 Minuten erreicht.

In denervierten Tieren (B) waren die Effekte geringer ausgeprägt. ADP in einer Konzentration von $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ änderte die Fließgeschwindigkeit nicht signifikant um den Faktor 1,54 von $39,36 \pm 13,96$ auf $60,71 \pm 29,26 \text{ mm s}^{-1}$. Durch $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ und $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ADP wurde die Geschwindigkeit signifikant zum Vorlauf um die Faktoren 1,85 und 2,08 erhöht (von $50,2 \pm 15,48$ auf $92,84 \pm 47,64 \text{ mm s}^{-1}$ und von $51,07 \pm 18,09$ auf $106,35 \pm 49,75 \text{ mm s}^{-1}$). Der Vergleich zwischen diesen beiden Konzentrationen zeigt keinen verlängerten Effekt (siebeneinhalb und fünf Minuten). Lediglich durch die Infusionen der

ADP-Lösungen ($0,5$ und $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) wurde die Dauer des Effektes mehr als verdoppelt (von drei auf sieben und einhalb Minuten).

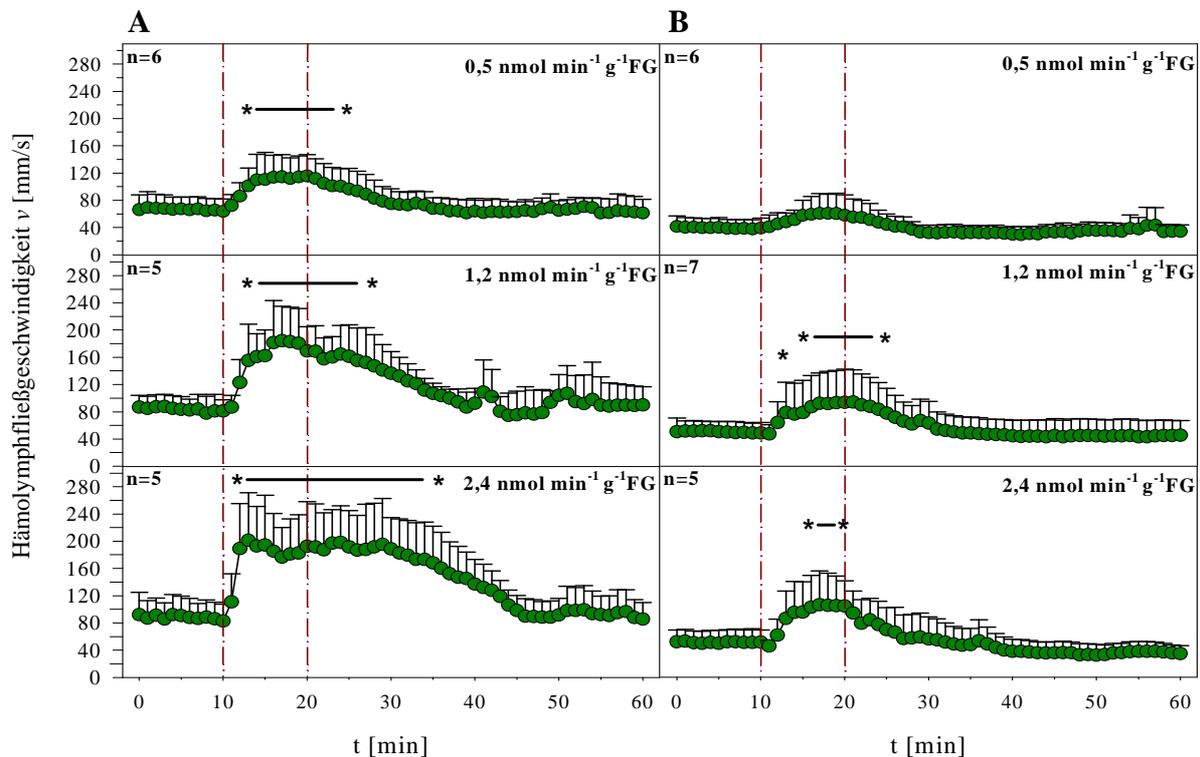


Abb. 3.15: Hämolympfströmgeschwindigkeit [mm s^{-1}] in der Arteria descendens in intakten (A) und denervierten (B) Tieren. Nach einem zehnminütigen Vorlauf wurden ADP-Lösungen mit Konzentrationen von $0,5$, $1,2$ und $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. ($\text{MW} \pm \text{SD}$; n = Anzahl der Versuchstiere. In der rechten oberen Ecke ist die jeweils eingesetzte Konzentration angegeben.) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

In der A. posterior steigerten die verschiedenen ADP-Konzentrationen ($0,5$, $1,2$ und $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) im Vergleich von intakten mit denervierten Hummern die Fließgeschwindigkeit ausgehend vom Vorlauf signifikant um das 2,2, 2,78, 2,76fache bzw. um das 1,49, 1,38, und 2,05fache (Abb. 7.6, Seite 117).

Die Dauer der Effekte war in intakten Tieren nach 9, 11 und 22 Minuten abgeklungen. In denervierten Tieren wurde der Ruhewertbereich für $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ bereits während der Infusion erreicht. Bei $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ zum Ende der Infusion und bei $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ nach zehn Minuten.

In der A. lateralis (Abb. 7.6, Seite 117) war der Versuchsverlauf starken Schwankungen unterworfen. Die Fließgeschwindigkeit wurde im Verhältnis intakt zu denerviert wie folgt gesteigert. $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$: 2,21 zu 1,36; $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$: 2,85 zu 1,54; $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$: 2,75 zu 2,01. Eine Verlängerung der Effekte mit steigender Konzentration wurde in intakten Tieren beobachtet. Die Fließgeschwindigkeit erreichte 5, 9 und 21 Minuten nach dem Ende der Infusion die Kontrollwerte.

3.2.4 Vergleich der Herzfrequenz und der Fließgeschwindigkeit unter ATP-Einfluß

3.2.4.1 Gesamtvergleich unter dem Einfluß von ATP [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$]

Abb. 3.16 zeigt den Einfluß einer $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ATP-Infusion auf die Herzfrequenz [bpm] und die Fließgeschwindigkeit [mm s^{-1}] in verschiedenen Gefäßen des Amerikanischen Hummers.

Innerhalb von zwei bis drei Minuten wurde in intakten Tieren die Herzfrequenz signifikant von 73 ± 6 auf 93 ± 6 bpm erhöht. In denervierten Tieren wurde die Rate langsam von 79 ± 17 auf 91 ± 11 bpm gesteigert und war ab der dritten Minuten nach Ende der Infusion bis zum Ende der Erholungsphase im Vergleich zum Vorlauf signifikant erhöht.

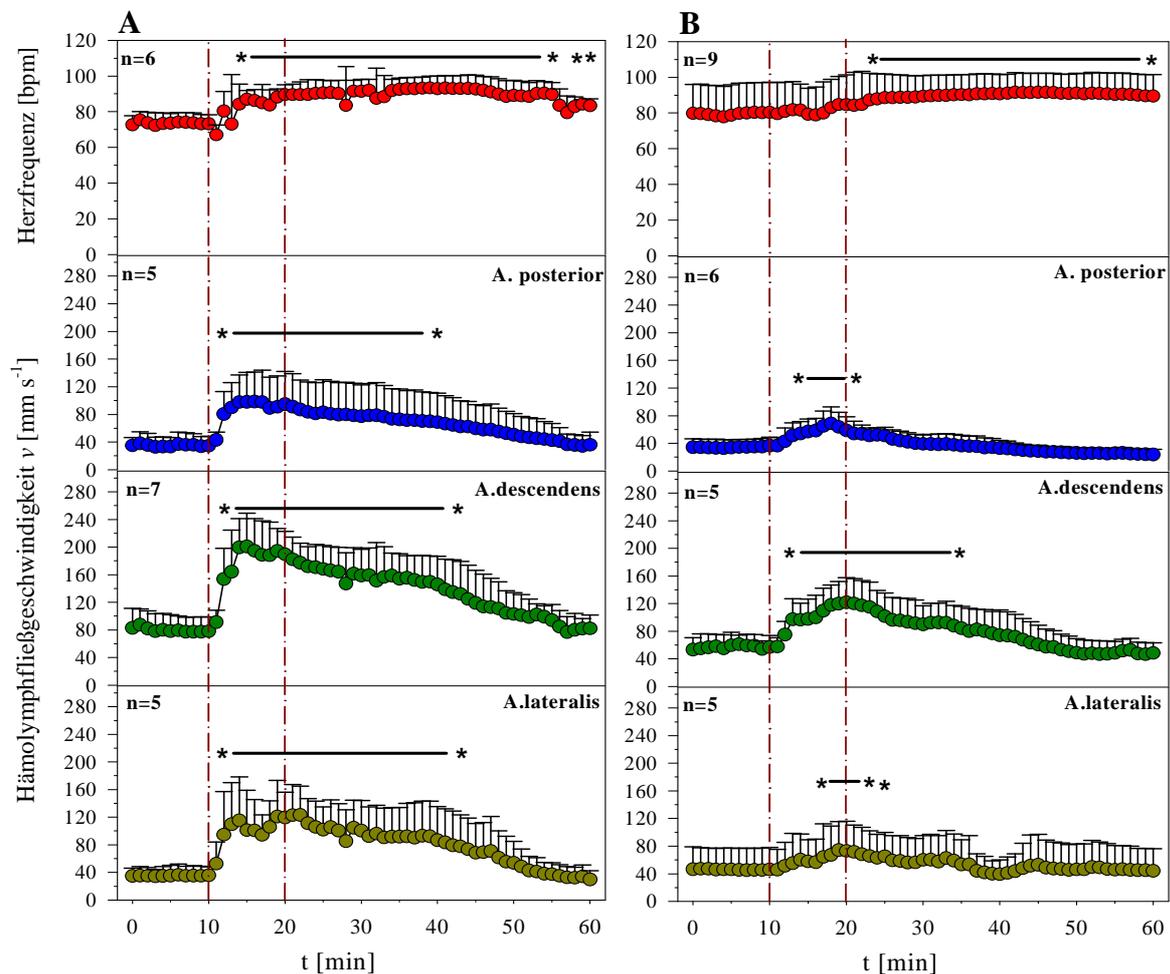


Abb. 3.16: *In vivo* Vergleich zwischen intakten (A) und denervierten (B) Amerikanischen Hummern, *Homarus americanus* unter dem Einfluß von $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ATP-Lösung auf die Herzfrequenz [bpm] und die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [mm s^{-1}] in verschiedenen Gefäßen. Nach einem zehninütigen Vorlauf wurden $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ATP-Lösung über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

Die Fließgeschwindigkeit in der A. posterior wurde signifikant zum Vorlauf um das 2,82fache (intakt) erhöht (von $34,86 \pm 15,09$ auf $98,32 \text{ mm s}^{-1}$ zum Zeitpunkt t_{16}), während in

denervierten Hummern die Geschwindigkeit nur aber signifikant um das 2,01fache gesteigert wurde (ausgehend von $34,23 \pm 11,9$ auf $68,67 \pm 23,95 \text{ mm s}^{-1}$; t_{18}). In der A. descendens nahm die Fließgeschwindigkeit signifikant von $79,75 \pm 23,36$ auf $200,6 \pm 48,45 \text{ mm s}^{-1}$ (2,52-fach) zu. Bei denervierten Tieren erfolgte eine signifikante Zunahme der Fließgeschwindigkeit von $57,04 \pm 17,25$ auf $121,67 \pm 35,8 \text{ mm s}^{-1}$ (2,13fach). In der A. lateralis wurde bei intakten Tieren die Fließgeschwindigkeit signifikant um das 3,27fache beschleunigt und bei denervierten Tieren signifikant um das 1,61fache. In intakten Tieren hielt der Effekt für alle drei Gefäße zwischen 30 und 31 Minuten an. In denervierten Tieren hingegen erreichte die Fließgeschwindigkeit in der A. posterior bereits nach sechs Minuten den Ruhewertbereich, in der A. descendens nach 20 Minuten. In der A. lateralis ist hier aufgrund der hohen Standardabweichung keine Aussage möglich.

3.2.4.2 Vergleich der Herzfrequenz unter dem Einfluß verschieden konzentrierter ATP-Lösungen

Die Infusion unterschiedlich konzentrierter ATP-Lösungen in den Peribranchialsinus des Amerikanischen Hummers ist in Abbildung 3.17 wiedergegeben. In intakten Hummern wurde durch eine Konzentration von $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ausgehend von dem gemittelten Vorlauf die Herzrate signifikant ($t_{12}-t_{20}$) von 71 ± 17 auf $91 \pm 10 \text{ bpm}$ gesteigert. Mit Erhöhung der Konzentration wurde jedoch die Herzfrequenz nicht weiter gesteigert. Durch die $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ konzentrierte ATP-Lösung wurde die Frequenz signifikant von 73 ± 10 auf $90 \pm 10 \text{ bpm}$ zwischen t_{18} und t_{43} erhöht. Die Infusion einer $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ betragenden ATP-Lösung erhöhte die Herzfrequenz signifikant von $73 \pm 6 \text{ bpm}$ auf $93 \pm 6 \text{ bpm}$ zwischen t_{14} und t_{55} .

Zu Beginn der Infusionen mit der $1,2$ und $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ betragenden ATP-Lösungen kam es, wie schon von Stegen und Grieshaber (2001) beobachtet, erst zu einem kurzen Abfall der Herzfrequenzen, bevor diese dann rapide und signifikant anstiegen. Durch $0,5$ und $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ATP wurde noch innerhalb des Versuchszyklusses der Ruhewertbereich erreicht. Durch $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ATP war das nach neun Minuten und für $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ nach 24 Minuten der Fall. Dahingegen blieb durch eine Konzentration von $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ATP die Herzfrequenz über den gesamten Versuchszyklus erhöht.

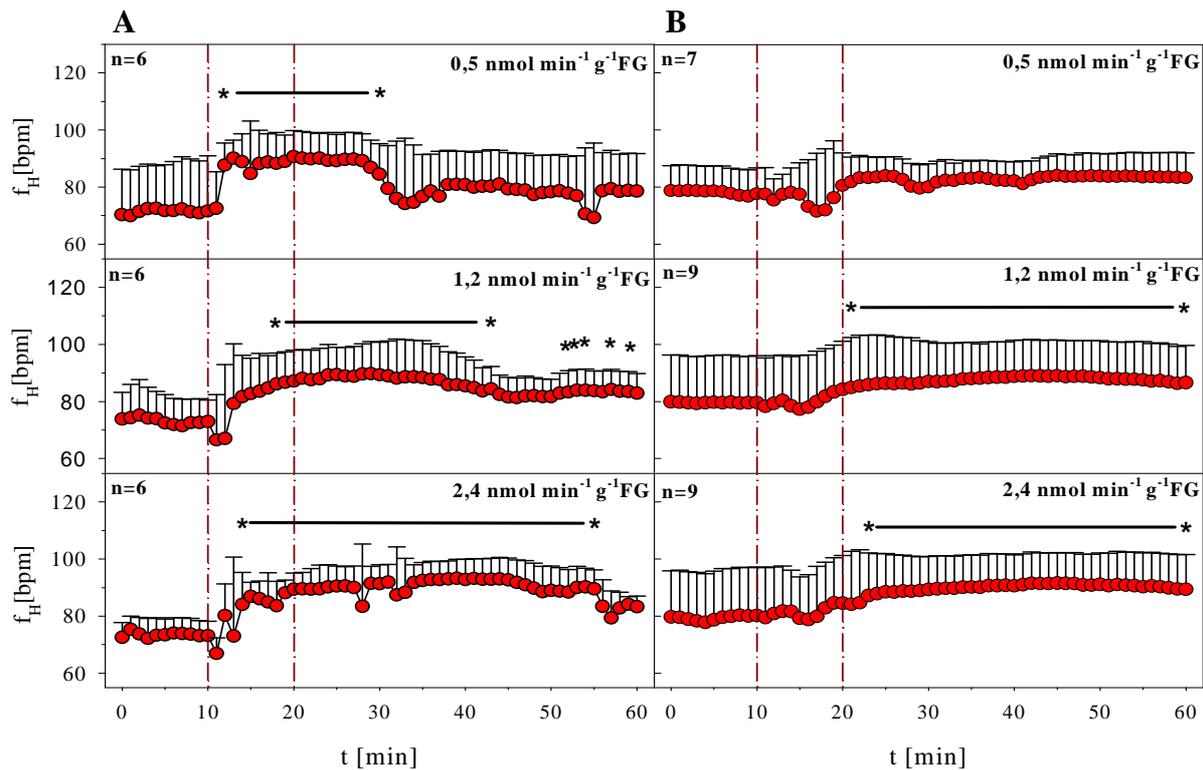


Abb. 3.17: Vergleich der Herzfrequenz [bpm] bei intakten (A) und denervierten (B) Hummern, unter dem Einfluß verschieden konzentrierter ATP-Lösungen ($0,5$, $1,2$ und $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{FG}$). Nach einem zehnmütigen Vorlauf wurden die ATP-Lösungen über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere. In der rechten oberen Ecke ist die jeweils eingesetzte Konzentration angegeben.) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

Im Falle der denervierten Hummer (B) wurde die Herzfrequenz durch eine $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{FG}$ ATP-Infusion nicht signifikant um das 1,08fache (von 78 ± 9 auf 84 ± 7 bpm) gesteigert. Die nächsthöhere Konzentration erhöhte eine Minute nach Ende der Infusion die Herzfrequenz signifikant um das 1,11fache (80 ± 16 auf 89 ± 12 bpm) und eine $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{FG}$ ATP-Infusion steigerte die Herzfrequenz signifikant um das 1,15fache von 79 ± 17 auf 91 ± 11 bpm. Die geänderten Herzfrequenzen blieben in allen Fällen bis zum Versuchsende auf diesem erhöhten Niveau.

3.2.4.3 Vergleich der Fließgeschwindigkeit in der A. descendens unter dem Einfluß verschieden konzentrierter ATP-Lösungen

Abbildung 3.18 stellt die Wirkung der in die Hämolymphe des Amerikanischen Hummers infundierten ATP-Lösungen ($0,5$; $1,2$; und $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{FG}$) bei intakten und denervierten Tieren dar.

In intakten Hummern wurde die Geschwindigkeit der Hämolymphe durch eine $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{FG}$ ATP-Infusion signifikant im Bezug zum Vorlauf von $52,44 \pm 16,61$ auf $131,78 \pm 34,45 \text{ mm s}^{-1}$ gesteigert. Das entspricht einem Faktor von 2,51. ATP mit einer Kon-

zentration von $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ infundiert änderte die Fließgeschwindigkeit nicht weiter. Ausgehend von $82,98 \pm 15,77$ erhöhte die Infusion dieser Konzentration die Geschwindigkeit signifikant auf $183,77 \pm 49,46 \text{ mm s}^{-1}$ (Faktor 2,21). Die höchste ATP-Konzentration ($2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) steigerte die Fließgeschwindigkeit signifikant zum Vorlauf um das 2,52-fache. Der maximale Effekt konnte durch die gesteigerte Konzentration nicht weiter erhöht werden, aber die Effekte wurden länger aufrechterhalten. Mit zunehmender Konzentration wurden die Ruhewerte nach 9, 18 und 30 Minuten erreicht.

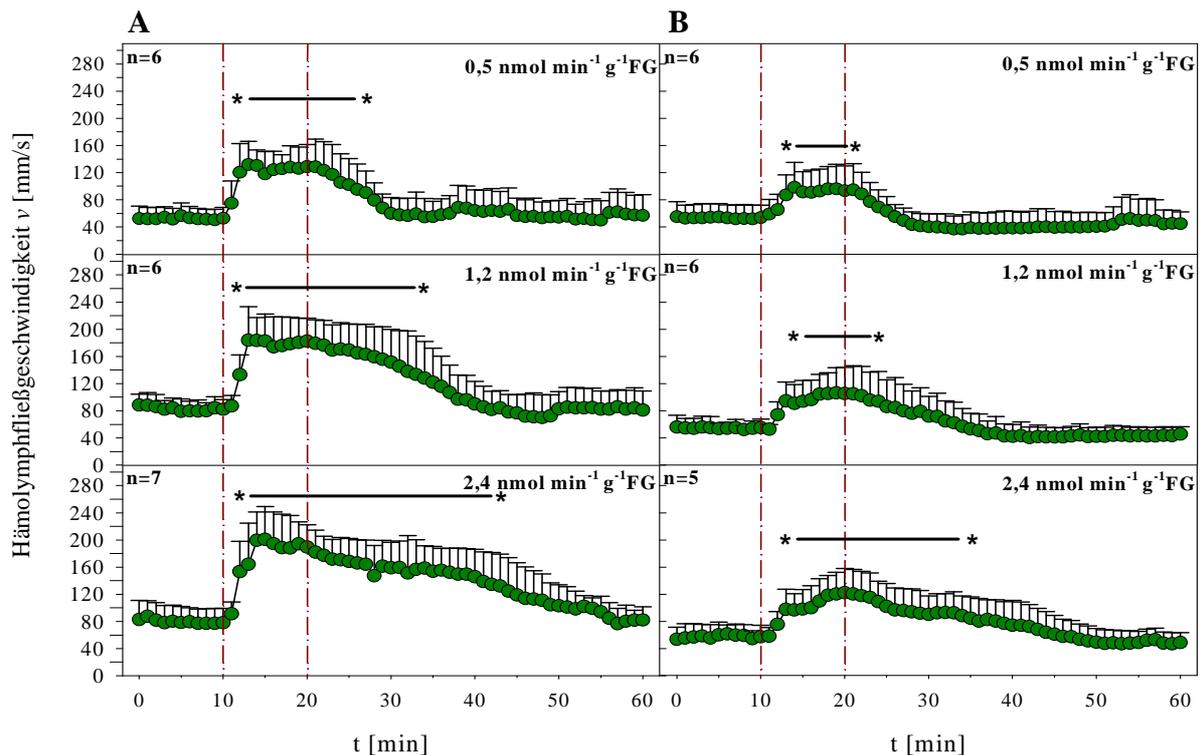


Abb. 3.18: Vergleich der Hämolympffließgeschwindigkeit [mm s^{-1}] in der Arteria descendens zwischen intakten (A) und denervierten (B) Tieren unter Einfluß verschieden konzentrierter ATP-Lösungen ($0,5$, $1,2$ und $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$). Nach einem zehnminütigen Vorlauf wurden die ATP-Lösungen über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere. In der rechten oberen Ecke ist die jeweils eingesetzte Konzentration angegeben.) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

In denervierten Tieren wurde durch $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ATP die Hämolymphe signifikant zum Vorlauf um den Faktor 1,81 von $53,24 \pm 20,20$ auf $96,17 \pm 35,95 \text{ mm s}^{-1}$ beschleunigt. In Anwesenheit von $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ATP wurde die Geschwindigkeit von $54,26 \pm 12,6$ auf $106,06 \pm 37,04 \text{ mm s}^{-1}$ signifikant erhöht. Das entspricht einer Zunahme um das 1,95fache. Eine Konzentration von $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ steigerte die Fließgeschwindigkeit signifikant von $57,04 \pm 17,25$ auf $121,67 \pm 35,8 \text{ mm s}^{-1}$ und damit um den Faktor 2,13. Die Fließgeschwindigkeit kehrte in denervierten Tieren mit zunehmender Konzentration nach 4, 12 und 20 Minuten nach dem Ende der Infusion zum Ruhewertebereich zurück.

In der A. posterior (Abb. 7.8, Seite 118) wurde die Fließgeschwindigkeit in intakten Tieren ausgehend vom Vorlauf signifikant von $31,0 \pm 13,48$ auf $73,89 \pm 23,48$ mm s^{-1} ($0,5$ $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{FG}$), von $42,44 \pm 12,41$ auf $125,37 \pm 34,56$ mm s^{-1} ($1,2$ $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{FG}$) und von $34,86 \pm 15,06$ auf $98,32 \pm 42,78$ mm s^{-1} ($2,4$ $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{FG}$) erhöht. In denervierten Tieren hingegen wurde ein geringerer, aber signifikanter Anstieg, bezogen auf den Vorlauf, von $42,15 \pm 15,01$ auf $60,16 \pm 20,65$ mm s^{-1} ($0,5$ $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{FG}$), von $33,94 \pm 12,44$ auf $58,72 \pm 23,44$ mm s^{-1} ($1,2$ $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{FG}$) und von $34,23 \pm 11,9$ auf $68,67 \pm 23,95$ mm s^{-1} ($2,4$ $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{FG}$) beobachtet. Durch $2,4$ $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{FG}$ ATP wurde die Amplitude in intakten Tieren nicht weiter erhöht, aber der Effekt wurde länger aufrechterhalten (9 min, 16 min und 30,5 min). Dieser Effekt war in denervierten Tiere nicht so deutlich ausgeprägt. Hier waren die Effekte bereits zum Ende der Infusion (t_{20}) bzw. acht und sechs Minuten nach Ende der Infusion abgeklungen.

In intakten Tieren wurde durch die ATP-Infusionen in der A. lateralis (Abb. 7.8, Seite 118) die Fließgeschwindigkeit signifikant zum Vorlauf um die Faktoren 3,44, 2,99 und 3,27 gesteigert. In denervierten Tieren (B) wurde die Fließgeschwindigkeit durch eine $0,5$ $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{FG}$ ATP-Lösung nicht signifikant um die Faktoren 1,29 gesteigert. Ab $1,2$ $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{FG}$ nahm die Fließgeschwindigkeit signifikant um das 1,38 und 1,61fache ($2,4$ $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{FG}$) zu. Mit steigenden Konzentrationen wurden die Effekte in intakten Tieren länger aufrechterhalten (10, 16 und 31 Minuten). Durch die geringe Amplitude in denervierten Tieren konnte dieser Einfluß nicht erkannt werden.

3.2.4.4 Kontrollversuche (Scheinpräparation)

In den Scheinpräparationen wurde den Tieren der Carapax geöffnet, die Hypodermis entfernt und der Panzer wie unter 2.4.2.3 beschrieben wieder verschlossen. Die dorsalen Nerven selbst blieben unversehrt, so daß eine Modulation der Herzaktivität ausgehend vom zentralen Nervensystem über die kardioregulatorischen Nerven möglich war. Mit Hilfe dieser Präparation sollte ein Einfluß durch den Eingriff auf die Herzaktivität ausgeschlossen werden.

In Abb. 3.19 sind die Herzfrequenz [bpm] und die Fließgeschwindigkeit [mm s^{-1}] in der Aorta posterior, Arteria descendens und der Arteria lateralis vor, während und nach der Infusion von $2,4$ $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{FG}$ Adenosin in den Peribranchialsinus scheinpräparierter Hummer dargestellt. Die Herzfrequenz stieg mit beginnender Infusion ausgehend von 70 ± 10 bpm innerhalb von einer Minute an und war nach drei Minuten für zwölf Minuten signifikant auf 93 ± 3 bpm erhöht. Fünf Minuten nach Ende der Infusion fiel die Herzfrequenz rasch ab, war aber bis zum Versuchsende gegenüber den Vorlaufswerten erhöht.

Die Hämolympfließgeschwindigkeit wurde in der A. posterior signifikant von $27,52 \pm 9,4$ auf $104,07 \pm 43,66 \text{ mm s}^{-1}$ erhöht. Bereits nach Erreichen des maximalen Wertes (t_6) begann die Fließgeschwindigkeit wieder zu sinken und erreichte neun Minuten nach Ende der Infusion den Ruhewertbereich.

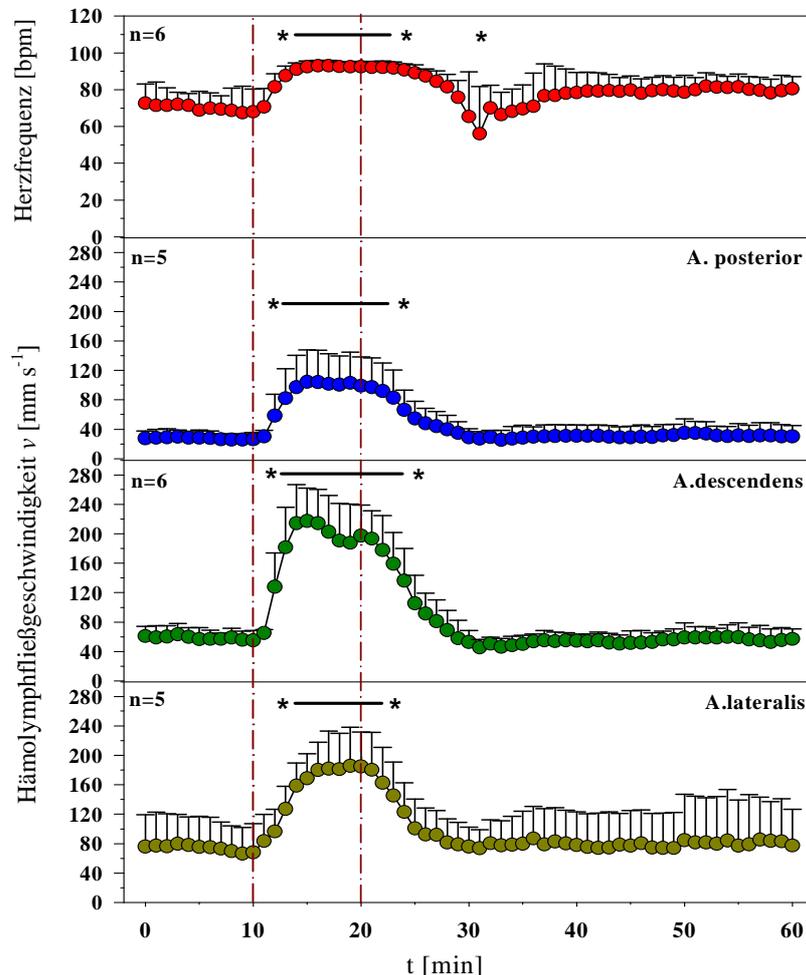


Abb. 3.19: Änderungen der Herzfrequenz [bpm] und Fließgeschwindigkeit [mm s^{-1}] in verschiedenen Gefäßen unter Einfluß von $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ FG Adenosinlösung bei scheinpräparierten Amerikanischen Hummern, *Homarus americanus*. Bei diesen Versuchen wurde den Tieren eine circa ein Quadratzentimeter große Öffnung, dorsal zum Herzen, geschnitten und wieder verschlossen ohne die dorsalen Nerven zu durchtrennen. Nach einem zehnmütigen Vorlauf wurden $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ FG Adenosinlösung über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

Für die A. descendens lag die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe in den ersten zehn Minuten bei $58,54 \pm 13,18 \text{ mm s}^{-1}$. Die Geschwindigkeit stieg durch die Infusion auf $217,26 \pm 44,57 \text{ mm s}^{-1}$ signifikant an, fiel bereits während der Infusion ab und erreichte den Ruhewert acht Minuten nach Ende der Infusion. Die Fließgeschwindigkeit in der A. lateralis zeigte einen vergleichbaren Verlauf, der ausgehend vom Vorlaufswert ($74,02 \pm 39,98 \text{ mm s}^{-1}$) signifikant auf $185,59 \pm 52,68 \text{ mm s}^{-1}$ gesteigert wurde. Allerdings war hier die erhöhte Fließgeschwindigkeit schon nach fünf Minuten abgeklungen.

3.2.4.5 Ringerinfusionen

Als weiterer Kontrollversuch wurde intakten (A), scheinoperierten (B) und denervierten (C) Hummern Ringer-Lösung (pH 8.0) über zehn Minuten infundiert (Abb. 3.20). Es sollte ausgeschlossen werden, daß die Grundlage der Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen bei den verschiedenen Präparationen für die gesteigerten Herzkreislaufparameter verantwortlich ist.

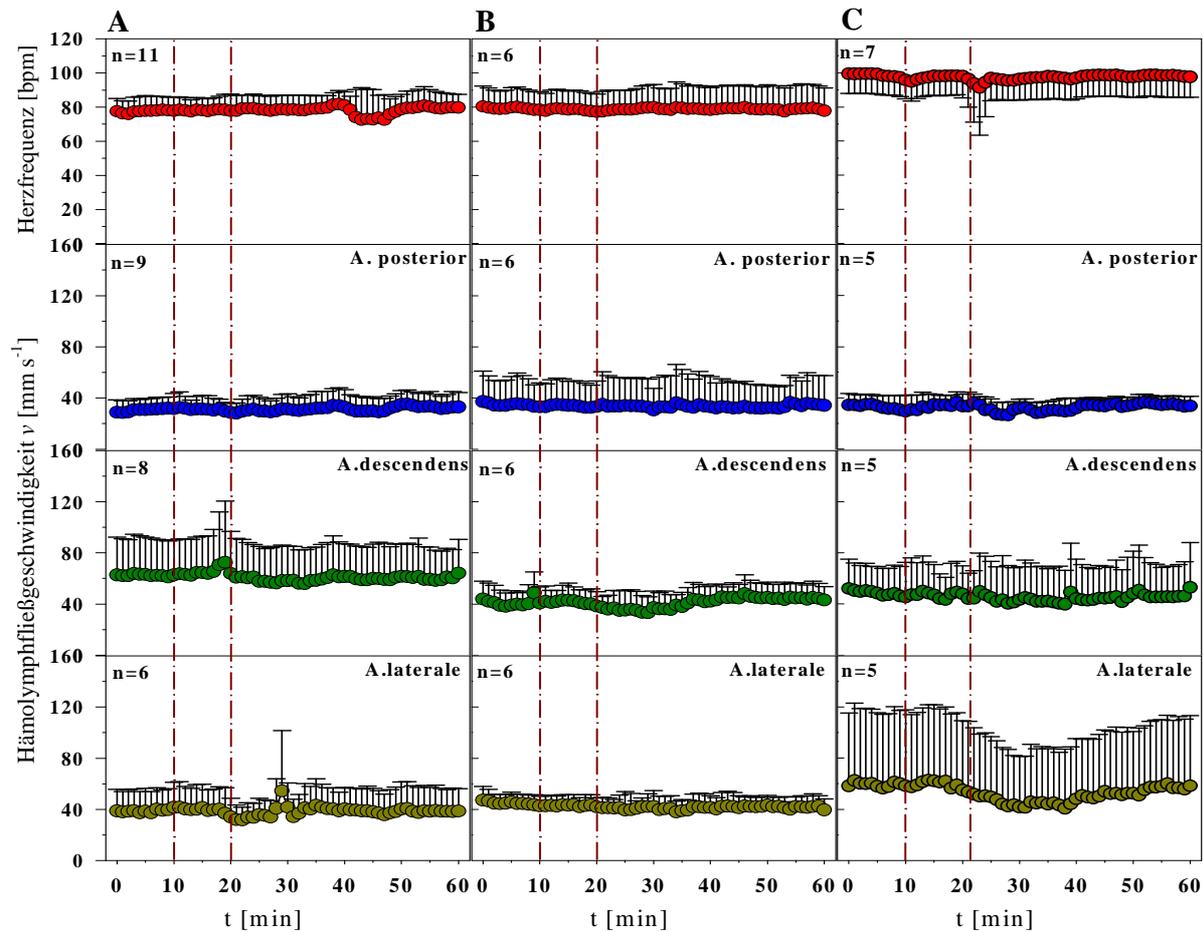


Abb. 3.20: *In vivo* Vergleich der Effekte von Ringerinfusionen (pH 8.0) zwischen intakten (A), scheinoperierten (B) und denervierten (C) Tieren, auf die Herzfrequenz [bpm] und die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [mm s^{-1}] in verschiedenen Gefäßen. Nach einem zehnmütigen Vorlauf wurde Ringerlösung pH 8.0 über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere)

In keiner der Präparationen änderte die Ringerinfusion die Herzfrequenz [bpm]. Die beobachteten Schwankungen während des gesamten Versuchszyklusses lagen in einem Bereich zwischen 77 und 81 Schlägen pro Minute (intakt), in scheinoperierten Tieren zwischen 77 und 80 bpm und in denervierten Tieren lag die Frequenz zwischen 95 und 99 bpm.

Die Fließgeschwindigkeit der gemittelten Vorläufe in der A. posterior lag bei $30,53 \pm 8,82$ (intakt), $34,66 \pm 18,85$ (scheinoperiert) und $34,53 \pm 10,2$ (denerviert) mm s^{-1} und der A. descendens bei $62,37 \pm 27,31$ (intakt), $41,0 \pm 11,98$ (scheinoperiert) und $49,88 \pm 22,84$ (de-

nerviert) mm s^{-1} und blieb durch die Ringerinfusion ebenfalls unbeeinflusst. Alle Schwankungen lagen im Bereich der Schwankungen, die unter Ruhebedingungen beobachtet wurden.

In der A. lateralis wurde in intakten und scheinoperierten Hummer ebenfalls die Fließgeschwindigkeit durch die Infusionen nicht beeinflusst (Mittelwerte t_0 - t_{10} : $38,82 \pm 15,43$ (A), $44,73 \pm 7,31$ (B)). Lediglich in denervierten Tieren kam es nach Infusionsende zu einem nicht signifikanten Absinken der Fließgeschwindigkeit von $59,2 \pm 52,72$ auf $49,27 \pm 41,63 \text{ mm s}^{-1}$.

3.2.5 Infusion von Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen

3.2.5.1 Vergleich der Herzfrequenz unter dem Einfluß von Adenosin- und den Adeninnukleotidlösungen [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$]

Um die Wirkung der Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen auf die Herzfrequenz [bpm] in den *in vivo* Präparationen (intakt und denerviert) besser vergleichen zu können, ist in Abb. 3.21 die Herzfrequenzen vor (t_0 - t_{10}), während (t_{11} - t_{20}) und nach (t_{21} - t_{60}) der Infusion von $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ der Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen dargestellt.

In intakten Amerikanischen Hummern lag die gemittelte Ruhefrequenz (t_0 - t_{10}) aller Adenosin- und Adeninnukleotidinfusionen bei $70 \pm 9 \text{ bpm}$, die für die denervierten Tiere bei $79 \pm 15 \text{ bpm}$.

Während der Infusion von Adenosin und den Adeninnukleotiden wies die Herzfrequenz in intakten Hummern (A) einen anderen Verlauf auf als in denervierten Tieren (B). Mit Einsetzen der Infusion wurde in intakten Tieren zwischen der zweiten und dritten Minute die Herzfrequenz abrupt gesteigert, nahm im Verlauf der Infusion und darüber hinaus weiter zu, so daß Adenosin und die Adeninnukleotide in intakten Tieren die Herzfrequenz signifikant steigerten (Adenosin: t_{14-24} ; AMP: t_{16-42} und t_{47-50} , ADP: t_{12-60} und ATP: t_{14-54} , t_{58-59}). Nach Erreichen einer maximalen Herzrate zu den Zeitpunkten t_{19} (Adenosin: $87 \pm 5 \text{ bpm}$), t_{21} (AMP: $82 \pm 12 \text{ bpm}$), t_{29} (ADP: $93 \pm 9 \text{ bpm}$) und t_{36} (ATP: $93 \pm 6 \text{ bpm}$) begann diese zu sinken und kehrte in oben genannter Reihenfolge nach 6, 21, 24 in den Bereich der Ruhefrequenz zurück. Unter dem Einfluß der $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ betragenden ATP-Lösung kehrte die Herzfrequenz innerhalb der Erholungsphase nicht wieder zum Ausgangswert zurück.

In denervierten Hummern nahm die Herzfrequenz beginnend mit den Infusionen von Adenosin und den Adeninnukleotiden langsam, aber in der Regel kontinuierlich zu. Dabei wurde für Adenosin und ADP keine signifikante Änderung ermittelt, nur für AMP und ATP waren die gesteigerten Raten signifikant verschieden zu den gemittelten Vorlaufswerten (AMP: t_{18-60} ; ATP: t_{23-60}).

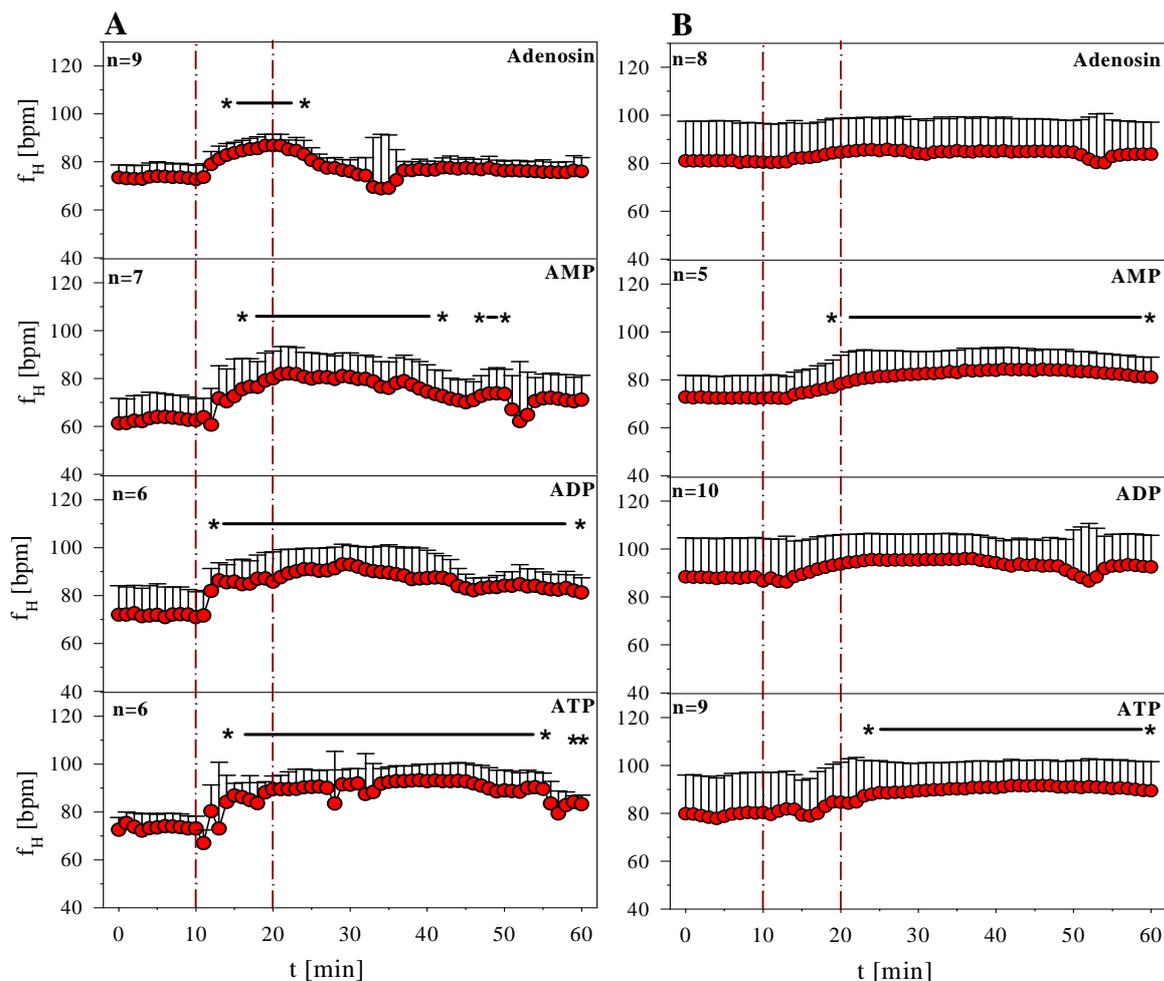


Abb. 3.21: *In vivo* Vergleich der Herzfrequenz [bpm] bei intakten (A) und denervierten (B) *Homarus americanus*, unter dem Einfluß von Adenosin und den Adeninnucleotiden. Nach einem zehnminütigen Vorlauf wurden Adenosin-, AMP-, ADP- und ATP-Lösungen [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$] über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

Im Vergleich zu den entsprechenden intakten Tieren wurden die Maxima geringfügig später erreicht. Während der Adenosininfusionen wurde die Herzfrequenz maximal, ausgehend vom Versuchsbeginn, zum Zeitpunkt t_{22} ($86 \pm 16 \text{ bpm}$) gesteigert. Durch die Infusion der AMP-Lösung wurde das Maximum zum Zeitpunkt t_{34} ($84 \pm 9 \text{ bpm}$) erreicht, durch ADP nach 31 Minuten ($96 \pm 11 \text{ bpm}$) und für ATP zum Zeitpunkt t_{37} ($91 \pm 11 \text{ bpm}$). Bis zum Versuchsende blieben die Herzfrequenzen erhöht.

Abbildung 3.22 zeigt die Differenz zwischen dem gemittelten Vorlauf und dem Zeitpunkt t_{20} für intakte und denervierte Tiere. Dabei entspricht der Zeitpunkt dem Ende der Infusionsperiode. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, um den Unterschied zwischen intakt und denerviert Tieren im Anstieg der Herzfrequenz zu verdeutlichen. Dabei ist die Differenz der Herzfrequenzen in intakten Tieren für Adenosin, AMP und ATP zum Zeitpunkt t_{20} signifikant höher als zur Zunahme in denervierten Tieren.

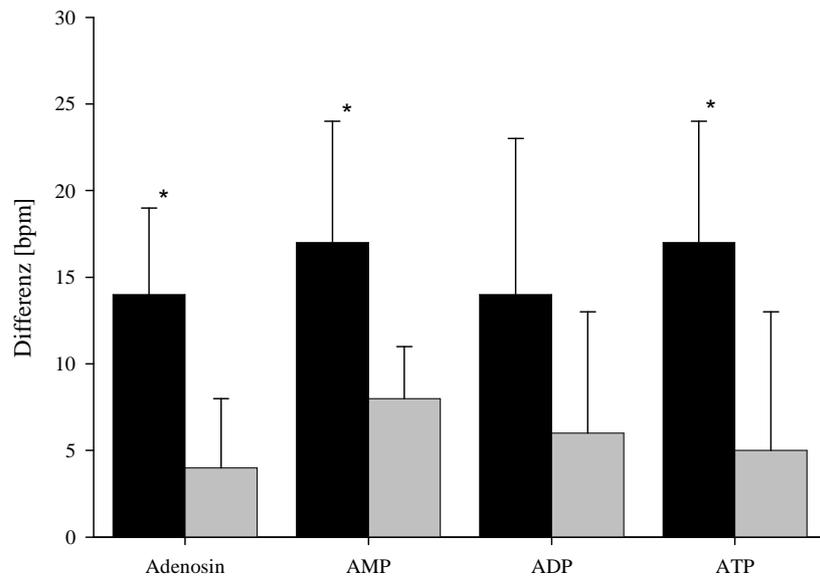


Abb. 3.22: Differenz [bpm] zwischen dem gemittelten Vorlauf und dem Zeitpunkt t_{20} (A) für intakte \blacksquare und denervierte \square Amerikanische Hummer, *Homarus americanus*. Der Zeitpunkt t_{20} entspricht dem Ende der Infusionsperiode. ($X \pm SD$; * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die Anzahl (n) der Versuchstiere betrug für intakt/denerviert: Adenosin: 9/8; AMP: 7/5; ADP: 6/10; ATP: 7/8.

3.2.5.2 Vergleich der Fließgeschwindigkeit in der A. descendens unter dem Einfluß von Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen

Abbildung 3.23 gibt die Einflüsse der Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen mit einer Konzentration von $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$ auf die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe in der Arteria descendens von *H. americanus* wieder.

Die A. descendens ist hier als Beispiel für die anderen Gefäße gezeigt. Abbildungen zu den jeweiligen Gefäßen und Konzentrationen finden sich im Anhang. Eine vergleichende Zusammenfassung der Einflüsse der verschiedenen konzentrierten Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen auf die Fließgeschwindigkeit in den verschiedenen Gefäßen findet sich in Tabelle 3.4. Mit Beginn der Infusion beschleunigte Adenosin in intakten Tieren die Hämolymphefließgeschwindigkeit innerhalb von ein bis zwei Minuten signifikant um das 3,49fache. Durch die Nukleotide wurde die Fließgeschwindigkeit zwar signifikant, aber nicht stärker erhöht als durch Adenosin (AMP: 2,25; ADP: 2,21 und ATP: 2,52fache). Dabei nahm die Fließgeschwindigkeit durch die ATP-Infusion deutlicher zu als durch die Infusion von AMP und ADP. Die Fließgeschwindigkeit wurde dennoch ausgehend von Adenosin zum ATP hin länger aufrechterhalten. Durch Adenosin wurde zwischen der siebten und achten Minute nach Ende der Infusion der Vorlaufswert erreicht. Durch AMP hingegen erst zwischen der 19. und 20. Minute. 24 Minuten nach Ende der Infusion wurde durch ADP der Ruhewertbereich erreicht und durch ATP nach 30 Minuten.

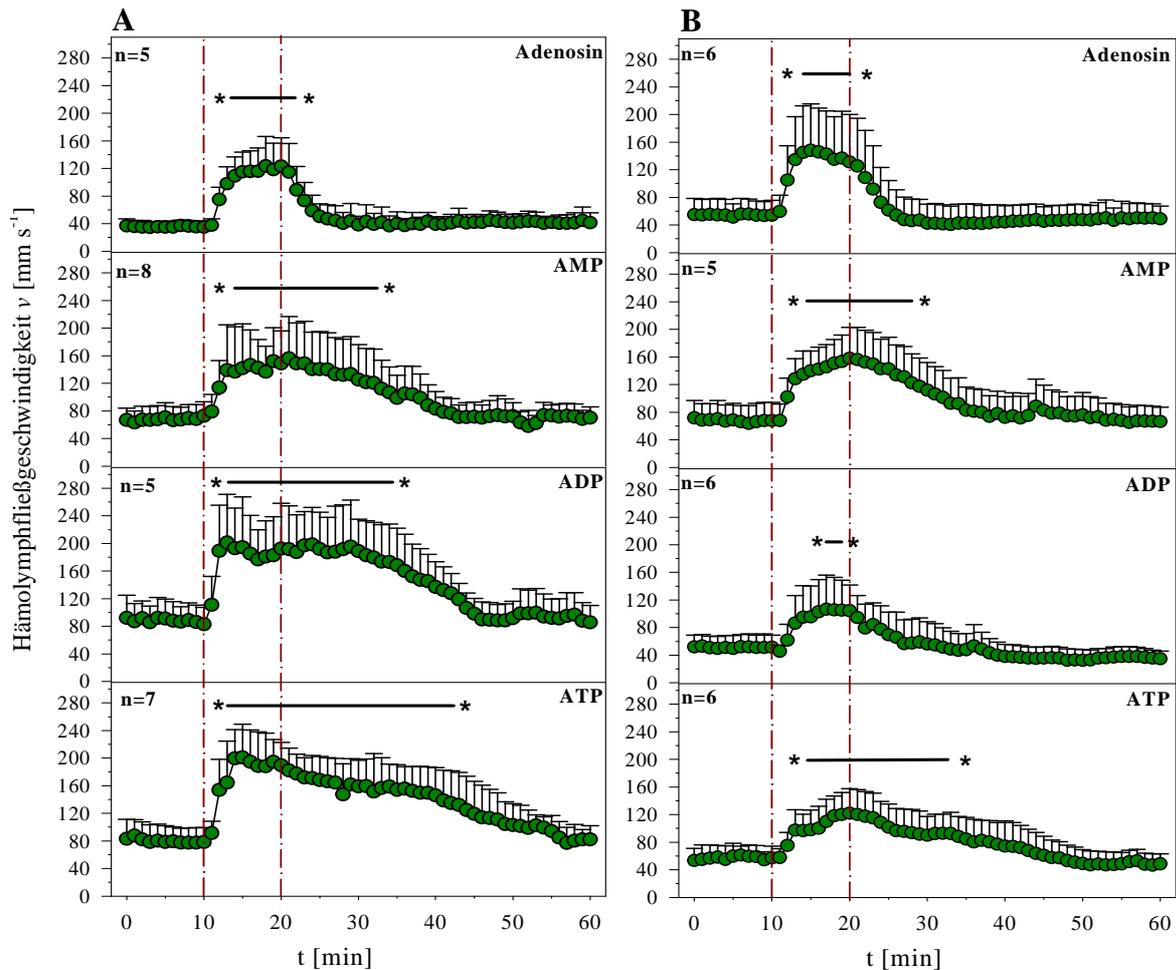


Abb. 3.23: Vergleich der Hämolympffließgeschwindigkeit [mm s^{-1}] in der Arteria descendens, intakter (A) und denervierter (B) Amerikanischer Hummer, *Homarus americanus* unter Einfluß von Adenosin und den Adeninnukleotiden. Nach einem zehnmütigen Vorlauf wurden Adenosin-, AMP-, ADP- und ATP-Lösungen [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$] über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich für denervierte Tiere. Wobei die maximalen Effekte, mit Ausnahme durch die AMP-Lösung, schwächer ausgeprägt waren. Adenosin steigerte die Fließgeschwindigkeit um das 2,73fache, AMP um das 2,33fache, ADP um das 2,08fache und ATP um das 2,13fache.

Vergleicht man den Zeitraum, über den die Fließgeschwindigkeit erhöht blieb, so ist der durch die Infusionen ausgelöste Effekt nach vier (Adenosin), zehn (AMP), fünf (ADP) und nach 20 Minuten (ATP) beendet.

Der Vergleich der Verhältnisse zwischen intakten und denervierten Tieren (Tab. 3.4) zeigt, daß in intakten Hummern die Fließgeschwindigkeit bis auf eine Ausnahme (AMP; $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$; A. descendens) stärker gesteigert wurde als in denervierten. Des weiteren führte Adenosin unabhängig von der Konzentration und der Präparation oft zu den am deutlichsten ausgeprägten gesteigerten Fließgeschwindigkeiten.

In der Aorta posterior in intakten Tieren erhöhten die Nukleotide die Fließgeschwindigkeit in der Reihenfolge von AMP < ADP < ATP. In denervierten Tieren ist durch 0,5 und 2,4 nmol min⁻¹ g⁻¹FG der umgekehrte Effekt sichtbar. Durch die Infusion der 1,2 nmol min⁻¹ g⁻¹FG betragenden Nukleotidlösungen wurde durch AMP und ATP annähernd die gleiche Effektstärke ausgelöst und durch ADP-Infusion wurde der Effekt nur um den Faktor 1,38 gesteigert.

Für die A. descendens konnte sowohl in intakten als auch in denervierten Tieren kein direkter Zusammenhang zwischen der Effektstärke sowie Adenosin und den Adeninnukleotiden beobachtet werden. Zum Beispiel steigerte die Infusion mit einer Konzentration von 2,4 nmol min⁻¹ g⁻¹FG die Fließgeschwindigkeit in der Reihenfolge ADP < AMP < ATP < Adenosin (A) und ADP < ATP < AMP < Adenosin (B). Wohingegen eine Infusion von 1,2 nmol min⁻¹ g⁻¹FG die Fließgeschwindigkeit in intakten Tieren in der Reihenfolge AMP < ADP = ATP < Adenosin steigerte und in denervierten in der Reihenfolge ADP < ATP = Adenosin < AMP zunahm.

Tabelle 3.4: Vergleich der Verhältnisse zwischen der Fließgeschwindigkeit v [mm s⁻¹] in der A. posterior, A. descendens und der A. lateralis für intakte (A) und denervierte (B) Amerikanische Hummer, *Homarus americanus* unter dem Einfluß verschieden konzentrierter Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen (c [nmol min⁻¹ g⁻¹FG]). Das Verhältnis wurde aus dem gemittelten Vorlauf (t_0 - t_{10}) und dem Zeitpunkt, an dem die Fließgeschwindigkeit maximal war bestimmt. Die mit einem # gekennzeichneten Werte, zeigen die Läufe an, in der keine signifikante Steigerung der Fließgeschwindigkeit im Vergleich zum Vorlauf erreicht wurde.

		A. posterior		A. descendens		A. lateralis	
c [nmol min ⁻¹ g ⁻¹ FG]		A	B	A	B	A	B
0,5	Adenosin	2,6	1,67	2,29	2,2	2,28	1,48 [#]
	AMP	2,16	1,83	1,94	1,51	2,67	1,34 [#]
	ADP	2,2	1,49	1,74	1,54 [#]	2,21	1,36
	ATP	2,38	1,43	2,51	1,81	3,44	1,29 [#]
1,2	Adenosin	2,74	2,15	2,76	1,95	2,4	1,85
	AMP	2,55	1,71	2,16	2,09	2,52	1,21 [#]
	ADP	2,78	1,38	2,21	1,85	2,85	1,54
	ATP	2,95	1,73	2,21	1,95	2,99	1,38
2,4	Adenosin	3,36	2,09	3,49	2,73	3,7	1,94
	AMP	2,4	2,26	2,25	2,33	2,5	1,91
	ADP	2,76	2,05	2,21	2,08	2,75	2,01
	ATP	2,82	2,01	2,52	2,13	3,27	1,61

In intakten Tieren nahm die Fließgeschwindigkeit in der A. lateralis in der Reihenfolge ADP < Adenosin < AMP < ATP (0,5 nmol min⁻¹ g⁻¹FG) und Adenosin < AMP < ADP <

ATP ($1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) zu. Durch $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ wurde die Fließgeschwindigkeit in der Reihenfolge AMP < ADP < ATP < Adenosin gesteigert.

In denervierten Tieren wurde die Fließgeschwindigkeit in der Reihenfolge ATP < AMP < ADP < Adenosin ($0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$), AMP < ATP < ADP < Adenosin ($1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) und ATP < AMP < Adenosin < ADP ($2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) erhöht.

In Tabelle 3.5 sind die Zeiträume angegeben, über welche die Fließgeschwindigkeit aufrechterhalten wurde. In intakten Tieren und unter dem Einfluß von $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ Adenosin- und Adeninnukleotidlösung wurde der Effekt unabhängig vom Gefäß in der Reihenfolge Adenosin < AMP < ADP < ATP aufrechterhalten. Lediglich für die A. lateralis kann für ATP aufgrund des unruhigen Verlaufes keine Aussage über die Dauer getätigt werden.

Tabelle 3.5: Dauer der durch die Infusionen von Adenosin und den Adeninnukleotiden c [$\text{nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{FG}$] hervorgerufenen Effekte (t_{ER}). Angegeben ist die Dauer der Fließgeschwindigkeitserhöhung für die A. posterior, A. descendens und der A. lateralis für intakte (A) und denervierte (B) Hummer. Der Effekt galt als beendet, wenn die gemittelte Fließgeschwindigkeit wieder auf den Wert zurückfiel, der innerhalb der Standardabweichung der Ruhephase (t_0-t_{10}) lag. Für die mit einem - gekennzeichneten Werte, konnten keine Zeiten ermittelt werden. 0 entspricht dem Infusionsende und -3 bedeutet, daß der Effekt bereits während des Infusionszeitraumes abgeklungen war.

c [$\text{nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$]	A. posterior		A. descendens		A. lateralis		
	A t_{ER} (min)	B t_{ER} (min)	A t_{ER} (min)	B t_{ER} (min)	A t_{ER} (min)	B t_{ER} (min)	
0,5	Adenosin	4,5	2	5	4	2	-
	AMP	7	4	8	4	8	-
	ADP	9	-3	8	3	5	-
	ATP	9	0	9	4	10	-
1,2	Adenosin	5,5	3	4	2	7,5	4
	AMP	11	5	8	8	7	-
	ADP	11	0	17	7,5	9	-
	ATP	16	8	18	12	17	-
2,4	Adenosin	6	3	7,5	4	6	4
	AMP	15	10	19,5	13	18	5
	ADP	22	10	24	5	21	8
	ATP	30,5	6	30	20	31	-

Mit sinkenden Konzentrationen ($1,2$ und $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$) waren in den verschiedenen Gefäßen nur noch Tendenzen dieser Reihenfolge erkennbar. Die Zeiten näherten sich immer weiter aneinander an. Besonders deutlich wird das für die Fließgeschwindigkeit in der A. posterior denervierter Hummer bei einer Konzentration von $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$. Hier wurde der Effekt bereits während der Infusionsphase terminiert.

3.3 Bestimmung von Dopamin, Serotonin und Octopamin

Die Infusionen von Adenosin und den Adeninnukleotiden führten in denervierten Hummern neben dem langsamen Anstieg der Herzfrequenzen zu zum Teil signifikant erhöhter Fließgeschwindigkeit. Diese Effekte könnten ihren Ursprung in der Freisetzung von Neurohormonen aus dem Perikardialorgan haben. Die modulierende Wirkung der Neurohormone auf das Herzkreislaufsystem für verschiedene decapode Crustaceen wurde oft beschrieben (Cooke und Sullivan, 1982; Guirguis und Wilkens, 1995; Wilkens et al., 1996; Saver und Wilkens, 1998; Wilkens und Kuramoto, 1998).

Es sollte daher überprüft werden, ob es während der Adenosininfusion zu einer Änderung der Dopamin-, Serotonin- und auch Octopaminkonzentration in der Hämolymphe des Amerikanischen Hummers kam. Hämolympheproben wurden vor, während und nach einer $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ Adenosininfusion genommen. In Abb. 3.24 sind die Konzentrationen von Dopamin (A), Serotonin (B) und Octopamin (C) dargestellt.

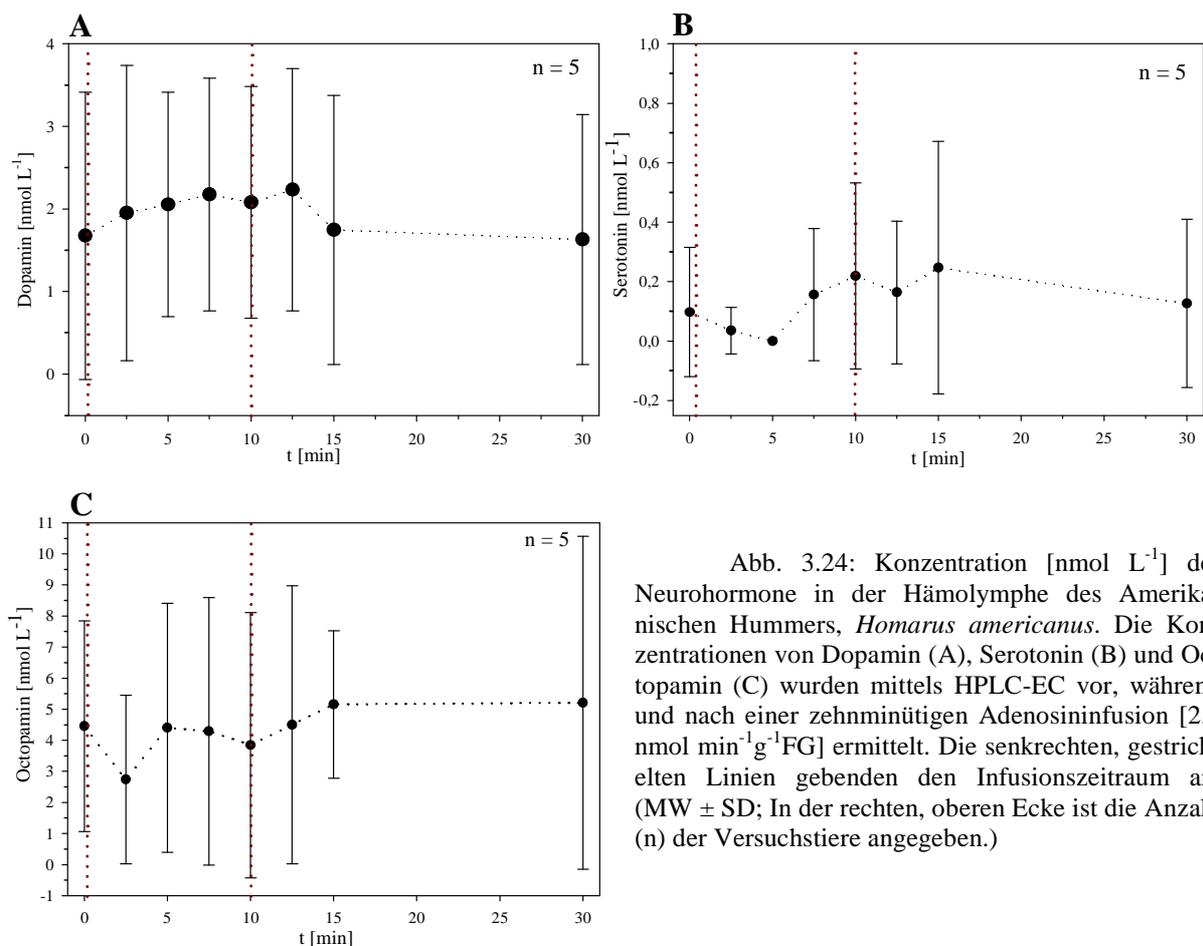


Abb. 3.24: Konzentration [nmol L^{-1}] der Neurohormone in der Hämolymphe des Amerikanischen Hummers, *Homarus americanus*. Die Konzentrationen von Dopamin (A), Serotonin (B) und Octopamin (C) wurden mittels HPLC-EC vor, während und nach einer zehnmütigen Adenosininfusion [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$] ermittelt. Die senkrechten, gestrichelten Linien gebenden den Infusionszeitraum an. (MW \pm SD; In der rechten, oberen Ecke ist die Anzahl (n) der Versuchstiere angegeben.)

Für den Zeitpunkt t_0 wurde eine Dopaminkonzentration (A) von $1,67 \pm 1,74 \text{ nmol L}^{-1}$, ermittelt. Während der Adenosininfusion stieg die Konzentration langsam auf $2,18 \pm 1,41$

nmol L⁻¹ (t_{7,5}) an und erreichte nach Beendigung der Infusion einen maximalen Wert von 2,23 ± 1,47 nmol L⁻¹ (t_{12,5}). Gegen Ende der Erholungsphase wurde eine Konzentration von 1,63 ± 1,51 nmol L⁻¹ ermittelt. In einem von fünf Tieren lag die Dopaminkonzentration unter der Nachweisgrenze von 1 nmol L⁻¹.

Die Serotoninkonzentration (B) lag bei zwei von fünf Tieren in allen Proben unter der Nachweisgrenze von 0,5 nmol L⁻¹. In zwei weiteren Tieren wurde erst ab t_{7,5} bzw. t₁₀ Serotonin detektiert. Für die Vorprobe (t₀) wurde eine Serotoninkonzentration von 0,1 ± 0,22 nmol L⁻¹ ermittelt. Zum Zeitpunkt t₅ wurde, aus oben genannten Gründen, kein Serotonin in den Proben gefunden. Zum Zeitpunkt t_{7,5} stieg die Konzentration dann über t₁₀ (0,22 ± 0,31 nmol L⁻¹) auf 0,25 ± 0,42 nmol L⁻¹ (t₁₅) an. 20 Minuten nach Beendigung der Infusion lag die ermittelte Konzentration bei 0,13 ± 0,28 nmol L⁻¹.

In einem Hummer konnte Octopamin (C) nur zu den Zeitpunkten t₀ und t₁₅ bestimmt werden. Zu den anderen Zeitpunkten lag die Konzentration in diesem Tier unter der Nachweisgrenze von 2 nmol L⁻¹. Octopamin wurde mit einer Konzentration von 4,45 ± 3,39 nmol L⁻¹ zum Zeitpunkt t₀ detektiert. Mit Ausnahme des Zeitpunktes t_{2,5} (2,74 ± 2,71 nmol L⁻¹) kam es während der Adenosininfusion bis zum Zeitpunkt t_{12,5} (4,50 ± 4,48 nmol L⁻¹) nur zu geringen Schwankungen der Octopaminkonzentration (t₅: 4,41 ± 4,01 nmol L⁻¹; t_{7,5}: 4,29 ± 4,3 nmol L⁻¹; t₁₀: 3,84 ± 4,27 nmol L⁻¹). Bei t₁₅ und t₃₀ konnten dann Konzentrationen von 5,15 ± 2,37 nmol L⁻¹ und 5,21 ± 5,36 nmol L⁻¹ gemessen werden.

4 Diskussion

Der Kreislauf des Amerikanischen Hummers, *Homarus americanus*, stellt ein komplexes, effizientes und regulierbares System dar (McMahon und Burnett, 1990; Reiber und McMahon, 1998). Damit der Metabolismus unter erhöhter Belastung, wie z. B. in Sauerstoffmangelsituationen, aufrechterhalten wird und eine adäquate Sauerstoffversorgung gewährleistet ist, können Anpassungen auf Ebene des Herzens, des Verteilungssystems sowie der respiratorischen Pigmente erfolgen. Dabei sind offensichtlich neuronale, hormonelle und metabolische Mechanismen für die Regulation wichtig (Alexandrowicz, 1932; Cooke und Sullivan, 1982; Bridges und Morris, 1986; Stegen und Grieshaber, 2001).

Auf der Ebene des Herzens modulieren diese neuronalen und neurohormonellen Einflüsse sowohl die Herzfrequenz als auch das Schlagvolumen, so daß ein der Situation angepasstes Herzminutenvolumen resultiert. (Wilkins und Walker, 1992; Yazawa und Kuwasawa, 1992; McGaw et al., 1994a, b; McGaw und McMahon, 1995; Guirguis und Wilkins, 1995; Wilkins et al., 1996). So nimmt z. B. das Herzminutenvolumen während einer gesteigerten Aktivität zu, da sowohl die Herzfrequenz als auch das Schlagvolumen gesteigert werden (Rose et al., 1998, 2001). Bei biotopbedingter Hypoxie hingegen wird die Herzfrequenz reduziert, das Schlagvolumen jedoch derart moduliert, daß das Herzminutenvolumen beibehalten oder vergrößert wird (McMahon, 1992; Reiber und McMahon, 1998).

Des weiteren kann durch neuronale und hormonelle Einflüsse eine Verteilung der Hämolymphe erreicht werden, indem durch hemmende oder aktivierende Einflüsse auf die semilunaren Klappen der Gefäße der Widerstand reguliert wird (Kuramoto und Ebara, 1984a; Fujiwara-Tsukamoto et al., 1992; Kuramoto et al., 1992, 1995; Wilkins, 1997; Wilkins und Kuramoto, 1998). Dem zufolge kann die Hämolymphe so zu den Organen verteilt werden die Sauerstoff benötigen, wie z.B. zur Muskulatur während oder nach Aktivität (DeWachter und McMahon, 1996; McGaw, 2004). Auch zu den Kiemen kann mehr Hämolymphe transportiert werden, so daß hier eine bessere Sauerstoffbeladung der Hämolymphe stattfinden kann (McMahon, 1992; Airriess und McMahon, 1994; Reiber und McMahon, 1998).

Zur effektiven Steigerung der Sauerstofftransportkapazität der Hämolymphe erfolgt neben der Zunahme der Ventilation über Ionen, sowie über die Metabolite L-Laktat und Urat eine Erhöhung der Sauerstoffaffinität des respiratorischen Pigments Hämocyanin (Truchot, 1980; Mangum, 1983; Morris et al., 1985; Bridges und Morris, 1986; Lallier et al., 1987; Zeis et al., 1992; Zeis und Grieshaber, 1993).

Ein weiterer Modulator ist das Nukleosid Adenosin, das in *Homarus americanus* (Stegen und Grieshaber, 2001) und in *Astacus leptodactylus* (van de Meer, 2004) die Herzfrequenz und die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe erhöht. Während exzessiven Schwanzschlagens entsteht in der Abdominalmuskulatur Adenosin in signifikanten Mengen (Stegen, Maurer und Grieshaber, in Vorbereitung; van de Meer, 2004), das aber nicht signifikant den Adenosin-Titer im Blut erhöht (Stegen, 2001; van de Meer, 2004). Es stellt sich deshalb die Frage nach dem Weg der Wirkungsvermittlung von Adenosin auf die Herzaktivität. Handelt es sich hierbei um einen direkten oder um einen indirekten Effekt? Während direkte Effekte am Organ wirken, werden indirekte Effekte z.B. über an der Peripherie angesiedelte Nerven oder über Neurohormone, die in die Hämolymphe sezerniert werden, vermittelt.

Stegen (2001) und van de Meer (2004) zeigten ebenfalls, daß AMP, ADP und ATP aktivierend auf die Herzaktivität einwirkten. Daher sollte neben der Wirkungsvermittlung von Adenosin auch der mögliche Wirkungsweg dieser Nukleotide geklärt werden.

Zu diesem Zweck wurde die semi-isolierte (*in situ*) Herzpräparation, in der neuronale und hormonelle Einflüsse ausgeschlossen sind, angewendet. In zwei weiteren *in vivo* Präparationen wurde mit Hilfe der Pulsed-Doppler Flowmetrie in intakten Tieren (siehe 2.4.2.1, Seite 20) und Tieren denen die kardioregulatorischen Nerven durchtrennt wurden (denervierte Tieren; siehe 2.4.2.2, Seite 21) die Wirkung von Adenosin und den Nukleotiden auf die Herzaktivität und dem Kreislauf bestimmt und verglichen. Die Konzentration dreier Neurohormone in der Hämolymphe wurde bestimmt, um den möglichen Einfluß seitens der Neurohormone unter Adenosineinfluß zu ermitteln.

4.1 Einfluß von Adenosin und den Adeninnukleotiden auf das semi-isolierte (*in situ*) Herz.

Die Perfusion der semi-isolierten (*in situ*) Herzen mit Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen sollte Aufschluß über mögliche Einflüsse auf die Herzaktivität geben. Es sollte möglich sein, den Wirkungsort am Herzen einzugrenzen, indem zwischen einem Effekt auf das Herzganglion und einem Effekt auf das Myocardium unterschieden werden kann.

Der Einfluß von Adenosin auf die untersuchten Herzparameter unterschied sich zum Teil von den gemessenen Einflüssen, die durch die Nukleotide verursacht wurden. Aus diesem Grund soll Adenosin zuerst besprochen werden, später aber vergleichend mit den Nukleotiden nochmals aufgegriffen werden.

Die Perfusion der semi-isolierten (*in situ*) Herzen mit 1 mmol L^{-1} , $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ und 5 mmol L^{-1} Adenosin führte zu keinem beobachtbaren Effekt (Abb. 3.1, Seite 35). Lediglich im Versuchszyklus, in dessen Verlauf eine 5 mmol L^{-1} Adenosinlösung verwendet wurde, war die Herzfrequenz zwischen t_{18} und t_{25} signifikant erniedrigt. Offensichtlich ändern die in das semi-isolierte Herz perfundierten Adenosinlösungen die Herzfrequenz nicht.

Auch das Herzminutenvolumen, der ventrikuläre Druck und das Schlagvolumen wurden durch die direkte Perfusion der semi-isolierten Herzen mit Adenosin nicht beeinflusst. Die auftretenden Schwankungen lagen in einem Bereich, der auch zwischen den einzelnen Versuchszyklen beobachtet wurde. Nur die Perfusion mit einer 5 mmol L^{-1} Lösung löste eine leichte, aber insignifikante Hemmung aller drei Parameter, schon zu Beginn der Perfusion aus. Diese Befunde stehen alle im Gegensatz zu den *in vivo* gemachten Beobachtungen.

Da kein Einfluß auf die Herzfrequenz gezeigt werden konnte, kann Adenosin keinen Effekt über das Herzganglion vermitteln. Ebenfalls kann eine Wirkungsvermittlung über das Myocardium ausgeschlossen werden, da weder das Herzminutenvolumen, der ventrikuläre Druck noch das Schlagvolumen beeinflusst wurden und es folglich zu keiner geänderten Kontraktionskraft des Herzmuskels kam. Adenosin übt keinen direkten Effekt auf das semi-isolierte (*in situ*) Herz aus.

Inwieweit sich die Herzfrequenz und das Schlagvolumen kompensatorisch beeinflussen, kann man in Abb. 3.1C, Seite 35 erkennen. Zwar wurde die Herzfrequenz gegen Ende des Versuchszyklusses signifikant erniedrigt, das Herzminutenvolumen jedoch blieb unverändert. Offensichtlich wurde hier durch ein geringfügig gesteigertes Schlagvolumen das Herzminutenvolumen aufrechterhalten. McMahon (1992) beschrieb einen solchen kompensatorischen Effekt unter hypoxischen Bedingungen. Da das Organbad kontinuierlich begast wurde, können hypoxische Bedingungen jedoch ausgeschlossen werden. In welchem Ausmaß dieser Effekt durch Adenosin beeinflusst wurde, ist fraglich, da der Effekt erst gegen Ende des Versuchszyklusses auftrat. Demnach müsste der Adenosineffekt sehr verzögert einsetzen, was aber nicht beobachtet wurde.

Da Stegen und Grieshaber (2001) in intakten Hummern positiv chronotrope Effekte und eine Zunahme der Fließgeschwindigkeit unter dem Einfluß von AMP, ADP und ATP beschrieben, wurde der Einfluß der Nukleotide auf das semi-isolierte (*in situ*) Herz ebenfalls untersucht.

Die gemittelten Kontrollwerte der Herzfrequenzen (t_0 - t_5) für die einzelnen Versuchszyklen lagen zwischen $59 \pm 13 \text{ bpm}$ (Adenosin) und $45 \pm 16 \text{ bpm}$ (ATP) (Tab 4.1). Sie entsprechen den Werten von $49 \pm 5 \text{ bpm}$ bzw. $53 \pm 2 \text{ bpm}$, die für die semi-isolierten (*in situ*)

Herzen von *Homarus americanus* von Wilkens et al. (1996) und Wilkens und Kuramoto (1998) angegeben wurden. Keines der in die semi-isolierten (*in situ*) Herzen perfundierten Purine änderte die Herzfrequenz. Anscheinend beeinflussen weder Adenosin noch dessen Nucleotide das Herzganglion der semi-isolierten (*in situ*) Herzen. Jedoch hatten die Perfusionen von Nucleotidlösungen einen Einfluß auf das Herzminutenvolumen, den ventrikulären Druck und das Schlagvolumen (Abb. 3.2 bis 3.4, Seite 37-40). Das aus allen Vorläufen (t_0 - t_5) gemittelte Herzminutenvolumen ($14,71 \pm 2,49 \text{ mL min}^{-1}$) und auch der ventrikuläre Druck ($0,91 \pm 0,19 \text{ kPa}$) entsprachen den Literaturwerten.

Tab. 4.1: Kontrollwerte (MW \pm SD) ermittelt aus den Vorlaufswerten (t_0 - t_5) für die einzelnen Perfusionsexperimente für die verschiedenen konzentrierten Adenosin- und Adeninnucleotidlösungen.

c[mmol L ⁻¹]	Adenosin		AMP		ADP		ATP
	fH [bpm]	n	fH [bpm]	n	fH [bpm]	n	fH[bpm]
1	59 \pm 13	6	53 \pm 17	6	49 \pm 5	5	49 \pm 12
2,5	54 \pm 13	5	48 \pm 9	5	48 \pm 10	4	46 \pm 11
5	56 \pm 14	5	56 \pm 15	6	48 \pm 16	6	45 \pm 16

Laut Wilkens et al. (1996) warfen die isolierten Hummerherzen die Ringerlösung mit einem Volumen von 8 - 15 mL aus und der ventrikuläre Druck lag bei $1,9 \pm 0,43 \text{ kPa}$. Zwei Jahre später ermittelten Wilkens und Kuramoto (1998) dagegen für den Hummer einen Kontrollwert von $0,8 \pm 0,03 \text{ kPa}$, der mit dem hier gemessenen ventrikulären Druck nahezu übereinstimmt.

Die Diskrepanz im ventrikulären Druck zwischen denen in dieser Arbeit ermittelten und den von Wilkens et al. (1996) angegebenen Werten beruht womöglich auf der Wahl des Gefäßes, über das der Fluß gemessen wurde. Denn eine Änderung des ventrikulären Drucks kann über den Öffnungszustand der semilunaren Klappen hervorgerufen werden (Saver et al., 1998), da sich der Widerstand des Gefäßsystems durch die Kontraktion der Klappen erhöht. Wilkens und Mitarbeiter (1996) bestimmten den Fluß über die A. descendens, so daß hier der Einfluß der kardioregulatorischen Klappe verantwortlich sein kann. In dieser Arbeit wurde der Herzausstoß jedoch über die A. posterior geleitet, an deren Ursprung keine kardioarterielle Klappe vorhanden ist. Wilkens und Kuramoto (1998) bestimmten den Fluß auch über die A. posterior, was den Einfluß der semilunaren Klappen auf das Herzminutenvolumen bestätigen dürfte.

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte für die semi-isolierten (*in situ*) Herzen lagen unter den Werten, die *in vivo* bestimmt wurden. So lag *in vivo* (intakte Tiere) die Herzfre-

quenz bei 70 ± 9 bpm (siehe 3.2.5.1, Seite 68). Der ventrikuläre Druck konnte *in vivo* in dieser Arbeit nicht bestimmt werden. Wilkens et al. (1996) geben jedoch für den Amerikanischen Hummer einen Wert von $1,58 \pm 0,12$ kPa an. Die Ursache für diesen Unterschied beruht zum einen auf der Präparationsmethode selbst und zum anderen darauf, daß die Herzen von nervösen und auch von hormonellen Einflüssen entkoppelt waren. Das wird von Wilkens und Mercier (1993), Wilkens und Kuramoto (1998) sowie Wilkens und McMahon (1994) bestätigt.

Die Perfusion der semi-isolierten (*in situ*) Herzen mit ATP und ADP führte bei einer Konzentration von $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ zu signifikant gesteigerten Werten für das Herzminutenvolumen, den ventrikulären Druck und das Schlagvolumen. AMP erhöhte den ventrikulären Druck und das Schlagvolumen erst ab einer Konzentration von 5 mmol L^{-1} signifikant. (Abb. 3.5 und 3.6, Seite 42 und 44) Da ATP und ADP in einer Konzentration von $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ zu den am deutlichsten ausgeprägten Effekten führten, soll sich die Diskussion auf die Einflüsse, die durch diese Konzentrationen hervorgerufenen wurden, beschränken. Auch der Einfluß von $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Adenosin und AMP soll vergleichend mit den Effekten der genannten Nukleotide beschrieben werden.

Die in Abb. 3.5 und 3.6 (Seite 42 und 44) und in den Tabellen 3.1 bis 3.3. (Seite 43 bis 45) dargestellten Ergebnisse zeigen, daß ausgehend von Adenosin die Amplitude des Herzminutenvolumens, des ventrikulären Drucks und des Schlagvolumens in der Reihenfolge vom AMP über ADP zum ATP zunahm, wohingegen die Herzfrequenz durch die Perfusion der Purine, wie oben schon erwähnt, unbeeinflußt blieb.

Um die Unterschiede zwischen Adenosin und den Adeninnukleotiden zu verdeutlichen, ist in Abbildung 4.1 der Einfluß je einer Perfusion von $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Adenosin (A) und $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ATP (B) für den ventrikulären Druck und das Herzminutenvolumen dargestellt.

Die Perfusion des Herzens mit Adenosin zeigt keinen Effekt, wohingegen die Perfusion mit ATP zu einem deutlich gesteigerten ventrikulären Druck und Herzminutenvolumen führt.

Bei der angewandten semi-isolierten (*in situ*) Präparationsmethode muß berücksichtigt werden, daß die Herzen in den Einzelpräparationen zu Beginn der Versuchszyklen unterschiedlich kräftig schlugen und daher Abweichungen innerhalb der einzelnen Parameter aufwiesen. Des weiteren nahmen die Parameter im Laufe der gesamten Versuchszeit kontinuierlich ab. Diese Variationen erklären die Bandbreite innerhalb der Anfangswerte zwischen den einzelnen Purinperfusionsen. Die Vorlaufswerte der einzelnen Parameter (Tab. 3.1 bis 3.3, Seite 43-45) für die Adenosin- und die Nukleotidperfusionsen zeigen eine Abnahme des Vor-

laufniveaus in der Reihenfolge Adenosin > AMP > ADP > ATP, wohingegen die Amplitude, hervorgerufen durch die Perfusion und wie oben schon erwähnt, in umgekehrter Reihenfolge gesteigert wurde.

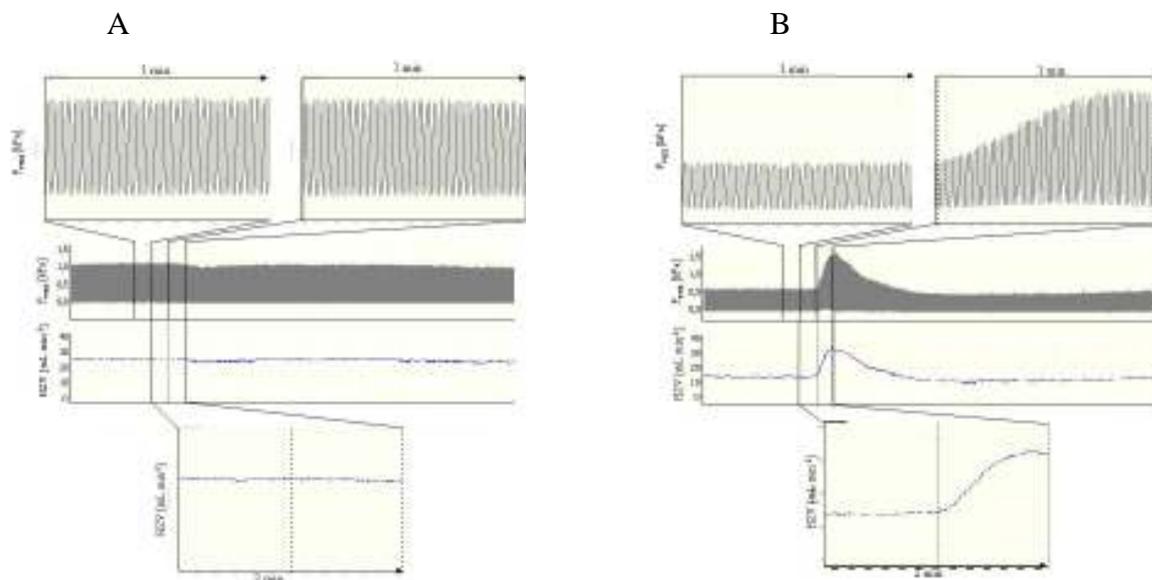


Abb. 4.1: Originalaufzeichnung des ventrikulären Drucks [kPa] und des Herzminutenvolumens [mL min^{-1}] während eines Versuchszyklusses von 25 Minuten sowie vergrößerte Ausschnitte aus dem Vorlauf und während der Perfusion des *in situ* Herzens mit $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ Adenosin (A) und ATP (B). Die gestrichelte Linie markiert den Startpunkt der Perfusion.

Der Unterschied in der Amplitudenhöhe zwischen Adenosin und den Adeninnukleotiden könnte auf das, durch die schwächeren Herzen verursachte, niedrigere Anfangsniveau zurückzuführen sein bzw. auf eine damit verbundene längere Verweilzeit der Lösungen im Herzen. Denn zum einen riefen Wilkens und Kuramoto (1998) durch die Applikation derselben Neurohormonlösung in schwächer pumpenden semi-isolierten (*in situ*) Herzen einen dramatischeren Effekt hervor als in kräftiger schlagenden Herzen. Zum anderen wird nach Wilkens et al. (1996) 1 mL einer Hormonlösung, die *in situ* zu einem deutlichen Effekt führt, innerhalb von zwei bis drei Schlägen aus dem Herzen entfernt. Für diese Versuche würde das bedeuten, daß nach vier bis sechs Schlägen die 2 mL Purinlösung aus dem Herzen entfernt wurden. Vier bis sechs Schläge entsprechen einer Zeitspanne von fünf bis sieben Sekunden bei einer durchschnittlichen Herzfrequenz von $51 \pm 5 \text{ bpm}$ (Mittelwert aus allen Vorläufen siehe Tabelle 4.1). Demzufolge könnte es sein, daß mögliche, durch Adenosin-, AMP- und ADP-Lösung hervorgerufene Effekte nicht beobachtet werden konnten bzw. nicht so stark ausgeprägt waren wie die Reaktion auf die ATP-Lösung, da die Verweilzeit für Adenosin, AMP und ADP im Herzen nicht ausreichend war, um einen ebenso deutlichen Effekt wie ATP auszulösen. Jedoch scheint die Verweilzeit nicht der Grund für die ausbleibende Reaktion zu sein, da die Perfusion mit Adenosinlösung auch bei schwächer schlagenden Herzen, in

denen die Lösung länger verweilen konnte, keinen Effekt hervorrief. Ebenso wenig führte ein Komplettaustausch der Ringerlösung des Organbades mit Adenosinlösung zu einer Wirkungsvermittlung. Auch waren z. B. die Vorlaufswerte des ventrikulären Drucks in den Einzelpräparationen nahezu identisch (AMP: 0,49 kPa, ADP: 0,49 kPa und ATP 0,57 kPa). Dennoch wurde die Amplitude in der Reihenfolge AMP, ADP und ATP gesteigert (0,06 kPa, 0,23 kPa und 0,9 kPa; angegeben sind die Differenzen zwischen dem Vorlaufswert und dem maximalen Wert). Demzufolge reicht die Verweilzeit im Herzen aus, um eine Wirkung auf die Herzaktivität auszuüben.

Eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede könnte in der Wirkungsvermittlung über Purinrezeptoren liegen, die eventuell am Herzen des Amerikanischen Hummers lokalisiert sind. Adenosin transduziert seine Wirkung über P1-Rezeptoren, ATP und ADP vermitteln ihre Wirkung über P2-Rezeptoren (Burnstock, 1996). Zur Wirkungsweise von AMP als Signalmolekül existieren unterschiedliche Ansichten. Burnstock (1996) sowie Ralevic und Burnstock (1998) geben an, daß AMP P1-Rezeptoren aktiviert. Wohingegen Illes et al. (2000) davon ausgehen, daß AMP nicht als Ligand für die Rezeptoren in Frage kommt. Somit müsste perfundiertes AMP zur Wirkungsvermittlung erst zu Adenosin dephosphoryliert werden. Adenosinperfusionen führten in den semi-isolierten (*in situ*) Herzen jedoch zu keiner Reaktion, wohingegen die Perfusion von AMP mit einer Konzentration von $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ schwache und ab 5 mmol L^{-1} signifikant erhöhte Reaktionen hervorriefen (Abb. 3.2, B und C, Seite 37). Da Adenosin keine Reaktion transduziert scheinen keine P1-Rezeptoren am Herzen lokalisiert zu sein. Ein Grund für die schwächere Reaktion der Herzen auf die Perfusion von AMP könnte durch eine geringe Affinität von AMP an einen nicht näher bestimmbar Rezeptor zu erklären sein. Das würde im Einklang stehen mit dem Befund, daß erst hohe AMP-Konzentrationen zu einem deutlichen Effekt führen. Um welchen Rezeptortyp es sich handelt, kann nur spekuliert werden. Möglich wäre ein eigener AMP sensitiver Rezeptor jedoch mit einer geringen Affinität. Eine weitere Erklärung wäre, daß AMP mit einer geringen Affinität an einen P2-Rezeptor binden kann, denn Hoyle und Greenberg (1988) sowie Walker et al. (1996) gehen davon aus, daß sich die purinergen Rezeptoren der Invertebraten und Vertebraten unterscheiden und somit eine Bindung von AMP in Invertebraten an einen P2-Rezeptor nicht ausgeschlossen werden kann.

P2-Rezeptoren scheinen in einer höheren Anzahl vorzuliegen, da das Ausmaß der Reaktion der semi-isolierten (*in situ*) Herzen auf die ADP- und ATP-Lösung deutlicher ausgeprägt ist, als die auf AMP. Der stärkere Effekt durch die ATP-Perfusion lässt sich durch die

unterschiedliche Potenz der Adenylate erklären, die laut Burnstock (1978) in der Reihenfolge Adenosin < AMP < ADP < ATP zunimmt.

Die Perfusion mit Nukleotiden führte genauso wie die Adenosinperfusion zu keinem chronotropen Effekt. Im Gegensatz dazu wurden das Herzminutenvolumen, der ventrikuläre Druck und das Schlagvolumen durch die Nukleotide gesteigert, wohingegen Adenosin keinen Effekt hervorrief. Anscheinend wird die Wirkung der Purine über unterschiedliche Wege auf das Herz übertragen. Adenosin verursacht keinen direkten Effekt auf das Herz des Hummers, sei es über das Herzganglion oder das Myocardium. Die Nukleotide vermitteln in semi-isolierten (*in situ*) Herzen ebenfalls keinen direkten Effekt über das Herzganglion, jedoch verursachen sie offensichtlich einen direkten Einfluß über das Myocardium semi-isolierter (*in situ*) Herzen.

4.2 *In vivo* Messungen mittels der Pulsed-Doppler-Flowmetrie in intakten und denervierten Hummern

Mit Hilfe der Pulsed-Doppler-Flowmetrie wurde der Einfluß von Adenosin und seiner Nukleotide auf die Herzaktivität, *in vivo*, in zwei verschiedenen Präparationen bestimmt. So wurden die Herzfrequenz und die Fließgeschwindigkeit in intakten Tieren gemessen und in Hummern bestimmt, denen nach Guirguis und Wilkens (1995) die zum Herzen führenden kardioresulatorischen Nerven durchtrennt worden waren. Diese im Bereich des Herzens auch als dorsale Nerven bezeichneten Leitungsbahnen verbinden das zentrale Nervensystem mit dem Herzganglion. Die dorsalen Nerven bestehen aus zwei anregenden und einer hemmenden Faser, über welche die Herzaktivität moduliert werden kann (Alexandrowicz, 1932).

Bevor die eigentlichen Infusionsexperimente mit den denervierten Tieren durchgeführt werden konnten, wurde überprüft, ob die dorsalen Nerven durchtrennt worden waren. Intakte Tiere zeigten auf externe Stimuli wie Schatten und Bewegung im Sichtfeld sowie plötzliche Berührungen, Phasen der Bradykardie (Abb. 2.9 und McMahon, 1995a). Schon dieser Effekt zeigt, daß die Nerven eine wichtige Rolle für die Modulation der Herzleistung besitzen. Fehlte diese Reaktion nach einer Störung des Tieres, war die Präparation erfolgreich. Mit diesen Tieren sollten, im Vergleich zu intakten Tieren, Rückschlüsse auf die Wirkungsweise von Adenosin und seinen Nukleotiden gewonnen werden.

Die Infusionen von Adenosin, AMP, ADP und ATP führten sowohl in intakten als auch in denervierten Hummern zu einer gesteigerten Herzfrequenz. Mit Ausnahme von ATP und Adenosin (intakt; Tab 4.2) wurde die Herzfrequenz konzentrationsabhängig erhöht. Die

Art des Verlaufs und das Ausmaß der Zunahme zwischen intakten und denervierten Hummern waren dennoch verschieden. Die mit dem Infusionsstart rapide gesteigerte Herzfrequenz in intakten Tieren war gegenüber den denervierten Tieren, bei denen die Frequenz langsam zunahm, deutlich erhöht (Abb. 3.21, Seite 69 und Tab.4.2).

Die niedriger konzentrierten Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen führten untereinander verglichen nur zu geringen Unterschieden in der maximalen Ausprägung der Herzfrequenz (ΔfH ; Tab. 4.2), die in intakten und denervierten Tieren ein bis zwei Schläge betrug. Nur eine ATP-Infusion von $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ verursachte einen deutlichen Unterschied von 20 Schlägen pro Minute (Tab 4.2; ΔfH [bpm], intakt). Die Infusion der Adenosinlösung mit einer Konzentration von $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ rief im Vergleich mit den Nukleotiden, die geringste Steigerung hervor. Die Infusion der Nukleotide erhöhte die Herzfrequenz annähernd gleich (Tab.4.2, intakt).

Tab. 4.2: Vergleich der Differenz zwischen Vorlauf und der Änderung der Herzfrequenz (ΔfH) in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen [$\text{nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$] von Adenosin und den Nukleotiden zum Zeitpunkt t_{max} für intakte und denervierte Amerikanische Hummer.

	c[$\text{nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$]	intakt		denerviert	
		ΔfH [bpm]	t_{max} [min]	ΔfH [bpm]	t_{max} [min]
Adenosin	0,5	11	8	3	8
	1,2	14	10	4	10
	2,4	14	9	5	9
AMP	0,5	11	12	4	17
	1,2	16	11	7	10
	2,4	19	11	12	24
ADP	0,5	10	14	2	11
	1,2	12	16	6	12
	2,4	21	19	8	22
ATP	0,5	20	10	6	14
	1,2	17	18	9	28
	2,4	20	26	12	27

Ein weiterer Unterschied zwischen intakten und denervierten Hummern betrifft den Zeitraum, über den die Herzfrequenz erhöht blieb (Abb.3.21, Seite 69). Während in denervierten Tieren die Herzfrequenz gegenüber dem Vorlaufswert über den Zeitraum der Erholungsphase (t_{20} bis t_{40}) auf einem geringfügig erhöhten Niveau blieb, nahm die Dauer des Effektes in intakten Tieren in der Reihenfolge Adenosin < AMP < ADP < ATP zu. In abgeschwächter Form war das auch für die niedrigeren Konzentrationen beobachtbar (Abbildungen siehe Anhang, Seite 119).

Die Dauer des Effektes mit zunehmendem Phosphorylierungsgrad decken sich mit der Beobachtung von Stegen (2001), die durch Infusionen von Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen mit einer Konzentration von $4,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ ebenfalls positiv chronotrope Effekte beim Amerikanischen Hummer hervorrufen konnte. Allerdings setzte der chronotrope Effekt mit zunehmenden Phosphorylierungsgrad später sowie in abgeschwächter Form ein und steht damit im Widerspruch zu der sofortigen Zunahme der Herzfrequenz, die in dieser Arbeit beobachtet wurde (Abb. 3.21, Seite 69). Die in dieser Arbeit ermittelten Werte sind eher mit denen für den Galizischen Flusskrebs, *Astacus leptodactylus* (van de Meer, 2004) vergleichbar, hier führten Adenosin und die Adeninnukleotide mit einer Konzentration von $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ mit steigenden Phosphorylierungsgrad zu stärkeren Amplituden.

Der Unterschied der von Stegen (2001) und in dieser Arbeit sowie auch von van de Meer (2004) beobachteten Effekte ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Durchführung der Infusion und der daraus resultierenden Konzentration in $\text{nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ zurückzuführen. Ausgehend von einer konstanten Konzentration in der Spritze wurde durch Stegen (2001) die Infusionsgeschwindigkeit und damit das Infusionsvolumen variiert, um die gewünschten Konzentrationen zu erreichen. In dieser Arbeit und durch van de Meer (2004) wurde die Infusionsgeschwindigkeit und damit das Volumen konstant gehalten und die Konzentration in der Spritze angepasst. Die resultierende Konzentration betrug bei Stegen (2001) $4,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$, während in dieser Arbeit die Konzentration nur die Hälfte und bei van de Meer (2004) $3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ betrug. Da durch letztere und in dieser Arbeit vergleichbare Ergebnisse ermittelt wurden, lässt sich der Unterschied der beobachteten Effekte nicht über die ungleichen Konzentrationen erklären. Höhere Konzentrationen würden eher einen Einfluß auf die maximale Wirkung ausüben. Wahrscheinlicher scheint ein durch die unterschiedlichen Infusionsmethoden, wie sie oben beschrieben wurden, hervorgerufener Einfluß zu sein. Möglich wäre dabei ein baroreflektorischer Effekt, durch den laut Burggren et al. (1990) die Herzfrequenz reduziert wird. Der durch ATP vermittelte positiv chronotrope Effekt und der oben beschriebene baroreflektorische Effekt würden sich gegenseitig beeinflussen und die Herzfrequenz würde langsamer ansteigen. Das wurde auch durch Stegen (2001) beobachtet. Allerdings lässt sich damit die von Stegen (2001) ermittelte deutlichere Zunahme der Herzfrequenz durch die Infusion der anderen Purine nicht erklären, so daß ein baroreflektorischer Effekt eher unwahrscheinlich zu sein scheint.

Die Ergebnisse der beiden *in vivo* Untersuchungen deuten auf indirekte Effektoren hin, die zu einer Modulation der Herzfrequenz führen. Offensichtlich wird die Herzfrequenz indirekt durch das zentrale Nervensystem über die anregenden Fasern der kardioresulatorischen Nerven beeinflusst. Der Verlauf der Herzfrequenz zu Beginn der Adenosin- und Adeninnukleotidinfusionen ähnelt dem rapiden Anstieg, der beobachtet wurde, wenn ruhende Hummer zum Laufen animiert wurden (Guirguis und Wilkens, 1995; Rose et al., 1998, 2001). Nachdem diesen Tieren die kardioresulatorischen Nerven durchtrennt worden waren, stieg die Herzfrequenz während des Laufens langsam und graduell an, blieb aber unter der Herzfrequenz intakter Tiere (Guirguis und Wilkens, 1995). Der gleiche Effekt wurde in dieser Arbeit durch die Adenosin und die Adeninnukleotidinfusionen hervorgerufen (Abb.3.21B, Seite 69). Dieser langsame, graduelle Anstieg der Herzfrequenz in denervierten Tieren deutet auf weitere indirekte Effektoren hin. Bei diesen Effektoren könnte es sich, wie auch Guirguis und Wilkens (1995) vermuteten, um Neurohormone bzw. metabolische Endprodukte in der Hämolymphe handeln. Die genannten metabolischen Endprodukte und der ähnliche Verlauf der Herzfrequenz zwischen laufenden Tieren und den Tieren in dieser Arbeit, könnten den Schluß nahe legen, daß es sich bei diesen Endprodukten um die Purine handelt.

Zur Steigerung der Herzfrequenz scheidet ein direkter Einfluß von Adenosin und den Adeninnukleotiden auf das Herzganglion aus, wie durch die semi-isolierte Herzpräparation gezeigt werden konnte (Abb.3.5, Seite 42). Möglich wäre ein Anstieg der Herzfrequenz *in vivo* durch die Dehnung des Ventrikels.

Die Herzrate in Crustaceen wird durch eine Dehnung des Myocardiums beeinflusst (Kuramoto und Ebara, 1984b, 1985, 1988). Wilkens (1993) löste durch die Perfusion unterschiedlicher Volumina einer Ringerlösung in das semi-isolierte Herz von *Carcinus maenas* einen langsamen Anstieg der Herzfrequenz aus. In den *in vivo* Präparationen führten die Adenosin- und Adeninnukleotidinfusionen zu einer gesteigerten Fließgeschwindigkeit, die ihren Ursprung in einem erhöhten Schlagvolumen haben könnte. Dabei wird der Ventrikel stärker gedehnt, wodurch aufgrund des erhöhten Zeitbedarfs während der Systole der Anstieg der Herzfrequenz verzögert wird. Hat letztere aber ein erhöhtes Niveau erreicht, dann bleibt dieses erhalten, da durch den fehlenden Regulationsmechanismus der hemmenden Fasern die Rate nicht gesenkt werden kann.

Die operativ getrennte Verbindung zwischen zentralem Nervensystem und dem Herzganglion kann für die Differenz der Herzfrequenz zwischen intakten und denervierten Tieren verantwortlich sein (Abb. 3.21; Seite 69). Der deutlicher ausgeprägte Anstieg der Herzfrequenz in intakten als in denervierten Tieren spricht dafür, daß der nervöse Einfluß des zentra-

len Nervensystems der wichtigere Effektor im Vergleich zu einer möglichen neurohormonellen und/oder metabolischen Beeinflussung der Herzfrequenz ist. Bestätigt wird dieses bereits durch Wilkens und Walker (1992) und McGaw (1994a). McGaw spricht davon, daß der Anstieg der Herzfrequenz der primäre Mechanismus als Antwort auf Stressituationen sei. Guirguis und Wilkens (1995) konnten dieses Phänomen bestätigen. Hummer, die zum Laufen animiert wurden, reagierten mit dem Beginn des Laufens mit einer schnell ansteigenden Herzfrequenz. Waren die dorsalen Nerven durchtrennt worden, kam es zu einem langsamen Anstieg, der im Vergleich zu Kontrolltieren geringer ausfiel.

Die Infusionen von Adenosin und den Adeninnukleotiden veränderten neben der Herzfrequenz auch die Fließgeschwindigkeiten in beiden *in vivo* Präparationen. In intakten Tieren wurde die Fließgeschwindigkeit in allen Gefäßen durch die Infusion von Adenosin konzentrationsabhängig und signifikant gesteigert. In denervierten Tieren wurde die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe durch die Adenosininfusionen ebenfalls signifikant gesteigert. Nur in der A. lateralis kam es durch die Infusion von $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ Adenosin, AMP und ADP zu keiner signifikanten Zunahme.

Eine konzentrationsabhängige Zunahme wurde für die A. posterior und die A. descendens von Stegen (2001) beschrieben. Die von Stegen in der A. posterior ermittelte maximale Zunahme durch $0,5$, $1,2$ und $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ Adenosin (1,4, 1,9 und 2,5fach) lag unter den in dieser Arbeit ermittelten Werten (2,6, 2,74 und 3,36fach). In der A. descendens hingegen wurde durch $0,5$ und $1,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ Adenosin eine 2,7 und 2,9fache Steigerung erreicht, die über den in dieser Arbeit gefundenen Werten (2,29 und 2,76fache) lagen. Für die $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ Adenosinlösung lag die von Stegen ermittelte Zunahme (3fach) unter der in dieser Arbeit ermittelten Zunahme (3,49fache).

Die Unterschiede in der maximalen Zunahme ließen sich durch die Verteilung der Hämolymphe und durch deren Fließgeschwindigkeit im Ruhezustand erklären. In dieser Arbeit wurde bereits im Ruhezustand eine höhere Fließgeschwindigkeit in der A. posterior und eine niedrigere in der A. descendens als durch Stegen (2001) bestimmt. Auch in der A. laterale wurde ein geringer Anfangswert ($17,69 \pm 5,34 \text{ mm s}^{-1}$) als von Stegen und Grieshaber (2001), deren Ruhewert bei $98 \pm 92 \text{ mm s}^{-1}$ lag, bestimmt. Offensichtlich wurde die Hämolymphe im Ruhezustand der Tiere anders verteilt und diese Grundverteilung wurde während der Infusion aufrechterhalten. Warum das allerdings der Fall gewesen ist, konnte nicht geklärt werden.

Bei der Betrachtung der Unterschiede der Fließgeschwindigkeit in der A. laterale zwischen dieser Arbeit und Stegen und Grieshaber (2001) muß berücksichtigt werden, daß der Transducerkristall in dieser Arbeit näher zum Herzen orientiert war. Anhand anatomischer

Untersuchungen konnte eine falsche Positionierung der Kristalle jedoch ausgeschlossen werden. Dennoch wurden unter Adenosineinfluß unterschiedliche Effekte hervorgerufen.

Bei Stegen (2001) unterschied sich das Fließmuster in der A. lateralis von den Fließmustern in den anderen Gefäßen. In der A. laterale resultierte unter Adenosineinfluß nicht jeder Herzschlag in einem Peak, auch traten gegen Ende der Infusion einzelne vergrößerte Peaks auf. Stegen (2001) vermutete zwei gegenläufige Effekte. Zum einen soll Adenosin einen hemmenden Einfluß auf die am Herzen lokalisierten Klappen ausüben und damit für die fehlenden Peaks verantwortlich sein. Zum anderen soll ein unbekannter Faktor den gegenläufigen Effekt haben. Durch diesen Faktor und durch die allgemein resultierende gesteigerte Herzaktivität sollte es dann zu den vergrößerten, aber verzögert einsetzenden Peaks kommen. Insgesamt überwog laut Stegen aber der hemmende Einfluß, so daß in der Summe eine Abnahme der Fließgeschwindigkeit detektiert wurde. Wenn diese Annahme richtig ist, dann würde in der vorliegenden Arbeit der hemmende Effekt durch den unbekanntem Faktor und durch die gesteigerte Herzaktivität überlagert werden, da die von Stegen beobachtete Abnahme der Fließgeschwindigkeit unter Adenosineinfluß im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit steht (Abb. 3.7, Seite 47). Wie lassen sich die Abweichungen zwischen dieser Arbeit und Stegen (2001) erklären?

Die Unterschiede könnten beispielsweise durch die Positionen der Transducerkristalle hervorgerufen worden sein, wenn es zu einer Modifikation der Gefäßdurchmesser gekommen wäre. Chan et al. (2006) vermutet für die A. lateralis eine solche Regulationsmöglichkeit über Stressfasern. Möglich wäre somit eine Variation des Gefäßwiderstandes und damit eine Zu- oder Abnahme der Fließgeschwindigkeit. Allerdings würde das eine lokal begrenzte Regulation des Widerstands bedeuten. Nahe am Herzen würden die Stressfasern den Gefäßdurchmesser verengen und damit die Fließgeschwindigkeit an dieser Stelle erhöhen. Hingegen würde es an der von Stegen präferierten Position zu einer Dilatation kommen und die Fließgeschwindigkeit würde reduziert werden. Da aber die Stressfasern über die gesamte Laterale verteilt sind, sollte die Position der Kristalle keinen Einfluß auf diesen Unterschied haben.

Da der Verlauf der Fließgeschwindigkeit in dieser Arbeit wiederum mit den Ergebnissen von van de Meer (2004) für den Flusskrebs übereinstimmt, ist ein Einfluß seitens der Infusionsdurchführung, wie er schon für die Herzfrequenz beschrieben wurde, denkbar. Aber auch hier scheinen baroreflektorische Effekte unwahrscheinlich, da Stegen (2001) diese durch die Infusion von Hummer-Ringer ausschließen konnte.

Nicht nur durch die Adenosininfusion, sondern auch durch die Infusionen der Nukleotide wurde die Fließgeschwindigkeit in intakten und denervierten Hummern signifikant gesteigert. Die Fließgeschwindigkeit in denervierten Tieren wurde jedoch weniger stark erhöht als in intakten Hummern (Abb. 3.23, Seite 71 und Tab.3.4, Seite 72). Durch die ATP-Infusionen wurde in denervierten Tieren die Fließgeschwindigkeit in allen Gefäßen sowie durch AMP und ADP nur in der A. descendens konzentrationsabhängig gesteigert. In intakten Hummern wurde nur durch AMP in der Descendens eine konzentrationsabhängige Steigerung ermittelt.

Neben der zum Teil konzentrationsabhängigen Zunahme wurde die Fließgeschwindigkeit substanzabhängig gesteigert. In Tabelle 4.3 ist die Reihenfolge der maximalen Effekte in Abhängigkeit der Adenosin und Adeninnukleotidinfusionen ($2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$) für intakte und denervierte Tiere angegeben. Die Reihenfolge bezieht sich auf die Änderung der Fließgeschwindigkeit in der A. posterior, A. descendens und der A. lateralis.

Tab. 4.3: Reihenfolge der maximalen Änderung der Fließgeschwindigkeiten in der A. posterior, A. descendens und der A. lateralis, in Abhängigkeit der Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$]. (i = intakte Tiere; d = denervierte Tiere).

Gefäß		Reihenfolge
A. posterior	i	AMP < ADP < ATP < Adenosin
	d	ATP < ADP < Adenosin < AMP
A. descendens	i	ADP < AMP < ATP < Adenosin
	d	ADP < ATP < AMP < Adenosin
A. lateralis	i	AMP < ADP < ATP < Adenosin
	d	ATP < AMP < Adenosin < ADP.

Stegen und Grieshaber (2001) ermittelten für den Amerikanischen Hummer einen schwächer werdenden maximalen Effekt der Fließgeschwindigkeit in der A. descendens mit zunehmenden Phosphorylierungsgrad. In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Adenosinlösung die Fließgeschwindigkeit stärker erhöht als durch die Nukleotidlösungen und das entsprach soweit den Beobachtungen von Stegen (2001). Allerdings nahm der durch die Infusion der Nukleotide hervorgerufene Effekt nicht mit steigendem Phosphorylierungsgrad ab, sondern in zwei von drei untersuchten Gefäßen wurde eine Zunahme der Fließgeschwindigkeit in der Reihenfolge AMP < ADP < ATP ermittelt (Tab. 4.3). Diese Reihenfolge entspricht erneut eher der Reihenfolge, die von van de Meer (2004) für *Astacus leptodactylus* beobachtet wurde. Gründe, welche diese Unterschiede erklären könnten, wurden bereits bei der Besprechung

der Herzfrequenz und der konzentrationsabhängigen Steigerung der Fließgeschwindigkeit angegeben.

Zwar konnte in der A. descendens keine Zunahme, wie sie für die anderen beiden Gefäße beschrieben wurde, erreicht werden (Tab. 4.3), aber auch hier liegt eine Tendenz der angegebenen Reihenfolge vor. Dagegen existiert in denervierten Hummern kein Zusammenhang zwischen der gesteigerten Fließgeschwindigkeit und dem Phosphorylierungsgrad (Tab. 4.3).

Dieser Einfluß auf die Amplitude scheint sich auch in der Dauer des Effektes niederzuschlagen. In intakten Tieren hängt die Dauer offensichtlich mit dem Grad der Phosphorylierung zusammen (Tab 3.5, Seite 73). So blieb in der A. posterior, A. descendens und der A. lateralis die Fließgeschwindigkeit intakter Tiere unter dem Einfluß von Adenosin und den Adeninnukleotiden [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$] mit steigendem Phosphorylierungsgrad länger erhöht. Durch die geringer konzentrierten Lösungen war dieser Effekt jedoch nicht ganz so deutlich ausgeprägt. Hingegen konnte in denervierten Hummern kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Dauer des Effektes und dem Grad der Phosphorylierung hergestellt werden. Ähnlich wie in intakten Tieren war zwar der durch Adenosin ausgelöste Effekt am schnellsten abgeklungen und die durch ATP gesteigerte Fließgeschwindigkeit wurde am längsten aufrechterhalten, aber der durch ADP hervorgerufene Einfluß war schneller abgeklungen als der durch AMP hervorgerufene.

Die Unterschiede in der maximalen Erhöhung und in der Dauer des Effektes, die sich durch die Infusionen im Vergleich zwischen intakten und denervierten Hummern zeigten, sprechen für den Beitrag verschiedener Mechanismen zur Steigerung der Fließgeschwindigkeit. So kann die Differenz zwischen intakt und denerviert durch das Fehlen des nervösen Beitrages vom zentralen Nervensystem verursacht sein. Genauso wie die fehlenden neuronalen und hormonellen Einflüsse in der semi-isolierten (*in situ*) Präparation für die geringeren Werte der Herzfrequenz und des Flusses verantwortlich sind (Wilkins und McMahon, 1994).

Die Verlängerung des Effektes kann an der Wirkungsvermittlung jedes Abbauproduktes eines bestimmten Purins liegen. Je mehr aktivierende Zwischenprodukte bis zum Inosin entstehen, desto länger kann die Reaktion aufrechterhalten werden. Zum Beispiel blieb die durch ATP-Infusion gesteigerte Fließgeschwindigkeit länger erhöht, da ATP über eine Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase zu ADP dephosphoryliert wird (Zimmermann, 2000). Das freiwerdende ADP kann dann erneut einen steigenden Effekt vermitteln. In der fortlaufenden Kaskade wird dann ADP bis zum inaktiven Inosin (Stegen, 2001; van de Meer, 2004) abgebaut.

Für die denervierten Tiere stellt sich die Frage, auf welchem Weg die Fließgeschwindigkeit *in vivo* derart erhöht werden kann, obwohl der Beitrag zur Steigerung durch die Herzfrequenz gering ist.

Die über den Pulsed-Doppler gemessene Fließgeschwindigkeit steht über die Formel

$$Q = v \left(\frac{d}{2} \right)^2 \cdot \pi$$

Q = Hämolympfluß [mL min⁻¹]

d = mittlerer Gefäßdurchmesser [cm]

v = mittlere Fließgeschwindigkeit [cm min⁻¹]

mit dem Hämolympfluß in Verbindung. Geht man also davon aus, daß eine erhöhte Fließgeschwindigkeit einem erhöhten Hämolympfluß gleich kommt, bleibt als Erklärungsmöglichkeit nur ein gesteigertes Schlagvolumen.

Es stellt sich die Frage nach der Regulation des Schlagvolumens bei decapoden Crustaceen. In Wirbeltieren wird autoregulatorisch mit einem erhöhten venösen Rückfluß das enddiastolische Volumen vergrößert und gleichzeitig ein größeres Schlagvolumen ausgeworfen. Diese Regulation wird auch als Frank-Starling-Mechanismus bezeichnet (Klinke und Silbernagel, 1994). Dem Amerikanischen Hummer fehlen jedoch Venen, welche die Hämolymphe zum Herzen zurückleiten können und sie besitzen somit keinen Frank-Starling ähnlichen Mechanismus (Wilkins und McMahon, 1992). Eine Regulation des enddiastolischen Volumens und damit des Schlagvolumens kann jedoch über verschiedene andere Mechanismen erfolgen.

In decapoden Crustaceen kann das enddiastolische Volumen über die elastischen Ligamente, an denen das Herz aufgehängt ist, gesteuert werden. Während der Systole werden die Ligamente gedehnt. Die Energie, die in den Ligamenten gespeichert wird, kann dann während des Zurückziehens genutzt werden, um das Herz während der Diastole mit Hämolymphe zu füllen. In *Cancer magister* enthalten die Ligamente verstreute, aber innervierbare Muskulatur (Volk, 1988; Alexandrowicz, 1932). Eine Kontraktion dieser Muskelzellen führt, neben dem passiven Zurückschnellen, zu einer aktiven Verkürzung der Ligamente und damit zu einer Vergrößerung des Herzvolumens. *In vivo* könnte das einen direkten Einfluß von Adenosin und den Adeninnukleotiden auf die Ligamente über dort lokalisierte Purinrezeptoren bedeuten. Die Lokalisation von P2-Rezeptoren wäre hier aufgrund der vergrößerten Schlagvolumina in der semi-isolierten (*in situ*) Präparation durch die Nukleotide denkbar. Gegen eine Lokalisation von P1-Rezeptoren bzw. eine verminderte Anzahl spricht die fehlende Zunahme des

Schlagvolumens durch Adenosin in der semi-isolierten (*in situ*) Präparation. *In vivo* sollte daher der beobachtete Anstieg der Fließgeschwindigkeit durch die Adenosininfusion nicht über einen Einfluß der Ligamente hervorgerufen werden können. Wahrscheinlicher wäre eine indirekte Volumenvergrößerung über einen Adenosin oder Adeninnukleotid vermittelten nervösen Einfluß am zentralen Nervensystem. Für den Amerikanischen Hummer kann dieser Mechanismus auch nur vermutet werden, da bisher keine Arbeiten zu Muskelzellen in den Ligamenten des Hummers vorliegen.

Änderungen des Dehnungsgrades am Perikardialseptum könnten ebenfalls zu einem vergrößerten Füllungsvolumen führen. Das Septum selbst ist flexibel, muskulär und innerviert (Alexandrowicz, 1932; Maynard, 1960) und wird laut George et al. (1955) synchron mit dem Herzschlag gedehnt, so daß eine Füllung des Herzens erleichtert wird. Über dort lokalisierte Purinrezeptoren können Adenosin und die Nukleotide entweder direkt zu einer stärkeren Dehnung führen oder indirekt über Nerven ausgehend von den Thorakalganglien des zentralen Nervensystems. Ein direkter Einfluß durch die Adenosinlösung scheint auch hier eher unwahrscheinlich, da in der semi-isolierten (*in situ*) Präparation keine Reaktion auf die Adenosinperfusion erfolgte. Wahrscheinlicher wäre auch hier ein nervöser Einfluß, insbesondere, da das Septum über Segmentalnerven und nicht über die dorsalen Nerven innerviert wird (Alexandrowicz, 1932). Inwieweit jedoch eine stärkere Dehnung des Perikardialseptums *in vivo* tatsächlich zu einem vergrößerten Schlagvolumen führt, wurde bisher nicht näher untersucht.

Ein indirekter Effekt auf das Schlagvolumen bzw. das enddiastolische Volumen wird durch einen erhöhten peripheren Widerstand der Arterien erreicht (Wilkens, 1997). Primär wird der Widerstand über die kardioarteriellen Klappen reguliert, deren Öffnungszustand über eine große Anzahl von Neurotransmittern (Acetylcholin, Glutamat, GABA), Neurohormonen (Dopamin, Octopamin, Serotonin, CCAP, Proctolin und F1 und F2) reguliert werden kann (Davidson et al., 1998; Wilkens und Kuramoto, 1998). Eine weitere Möglichkeit den Widerstand zu erhöhen, wäre den Gefäßdurchmesser zu reduzieren. Jedoch wurde eine aktive Regulation des Gefäßdurchmessers bisher nur für die A. posterior beschrieben, die als einziges Gefäß Muskelzellen enthält, die elektrisch stimuliert werden können und auf Proctolin reagieren. (Martin und Hose, 1995; Wilkens et al., 1997a, 1997b). Indirekt kann der Widerstand hier über die Stellung des Abdomens gesteuert werden. (Wilkens, 1997).

Zu Steuerungsmechanismen anderer Gefäße existieren bisher wenige Daten, jedoch führten Untersuchungen an isolierten Gefäßstücken der A. lateralis zu der Vermutung, daß der Gefäßdurchmesser, trotz fehlender Muskelzellen, durch Stressfasern aktiv reguliert werden kann (Chan et al., 2006).

Damit die Purine einen aktiven Einfluß auf den Widerstand ausüben können, müssten Purinrezeptoren an den Klappen und/oder den Gefäßen lokalisiert sein, durch deren Aktivierung es zu einer Kontraktion der Klappen bzw. zu einer Vasokonstriktion der Gefäße kommt. *In vivo* kann der Einfluß auf den Widerstand nicht nur zu einem veränderten Schlagvolumen führen, sondern zu einer lokalen Umverteilung der Hämolymphe, vergleichbar mit dem Einfluß der Neurohormone auf die semilunaren Klappen (Kuramoto und Ebara, 1984a; Kuramoto et al., 1992; Wilkens, 1997; Wilkens und Kuramoto, 1998).

In den beiden *in vivo* Präparationen wurde ein solcher Einfluß nicht beobachtet, was gegen eine Beteiligung von Adenosin und den Adeninnukleotiden an der Regulation des peripheren Widerstandes über die Klappen und Gefäße spricht. Auch kann durch die semi-isolierte (*in situ*) Präparation keine Aussage über eine mögliche Regulation des Widerstands getätigt werden, da die A. posterior keine semilunare Klappe am Ursprung des Herzens besitzt. Eine Kontraktion des Gefäßes durch den Einfluß von Adenosin und den Adeninnukleotiden konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Das zwischen Herz und Katheter verbliebene Gefäßstück kontrahierte während der Purinperfusion trotz dem Besitz von Muskelzellen nicht, sondern zeigte den für die Dämpfung des Blutdruckes wichtigen Windkesseneffekt (visuelle Beobachtung).

Eine weitere Möglichkeit wäre ein direkter Effekt auf das Myocardium, dem eine erhöhte Kontraktionskraft folgt. So führen z.B. Proctolin und F1 durch ihre direkte Wirkung auf das Myocardium in semi-isolierten (*in situ*) Experimenten zu einem erhöhten Schlagvolumen (Saver und Wilkens, 1998; Wilkens, 1999). Die Perfusion der Nukleotide, nicht aber die von Adenosin in den semi-isolierten (*in situ*) Präparationen bestätigen diese Vermutung, da hier das Schlagvolumen erhöht wurde. Offensichtlich vermitteln die Nukleotide, nicht aber Adenosin, *in situ* und darauf abgeleitet *in vivo* einen direkten Effekt auf das Myocardium. Zu einem späteren Zeitpunkt soll nochmals genauer auf diese Hypothese eingegangen werden.

4.2.1 Scheinpräparation und Ringerinfusion

Durch die Infusion einer $2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$ Adenosinlösung in scheinpräparierte Hummer wurden die Herzfrequenz und die Fließgeschwindigkeit in allen Gefäßen mit Beginn der Infusion signifikant gesteigert (Abb. 3.19, Seite 66). Bei diesen Tieren war zwar der Carapax geöffnet worden, aber die kardioregulatorischen Nerven blieben unversehrt. Die Verläufe der Herzfrequenz und der Fließgeschwindigkeit entsprachen den Verläufen, die bei intakten Tieren unter Adenosineinfluß beobachtet wurden (Abb. 3.7, Seite 47). Es konnte also davon ausgegangen werden, daß der operative Eingriff keinen Einfluß auf die Herzaktivität besaß.

Folglich mussten die gemessenen veränderten Herzkreislaufparameter auf Adenosin und die Adeninnukleotide zurückzuführen sein.

Ringerinfusionen führten in den drei verschiedenen Präparationen (intakt, denerviert und scheinpräpariert) zu keiner Beeinflussung der Herzfrequenz. Die Fließgeschwindigkeit in den verschiedenen Gefäßen blieb ebenfalls unbeeinflusst. Lediglich in der A. lateralis denervierter Hummer kam es nach Infusionsende zu einer nicht signifikanten Abnahme (Abb. 3.20, Seite 67). Burggren et al. (1990) beschrieben für die Landkrabbe *Cardiosoma guanhumi* baroreflektorische Effekte. Durch die Infusionen verschiedener Ringervolumina, die 5 - 10% des Hämolympfvolumens betragen, wurden ein gesteigerter Hämolympdruck und eine Abnahme der Herzfrequenz ausgelöst. In dieser Arbeit wurde ein Gesamtvolumen von 1,56 mL in das Tier infundiert. Bezogen auf das mittlere Tiergewicht von $593,8 \pm 64,8$ g und einem Hämolympfvolumen von 30% (Martin und Hose, 1995) entspricht das einer Volumenzunahme um 0,88%. Dieser Wert liegt damit weit unter den von Burggren et al. (1990) genannten Volumenänderungen. Daher ist die Abnahme der Fließgeschwindigkeit in der A. lateralis nicht auf einen baroreflektorischen Effekt zurückzuführen, und die *in vivo* beobachteten Effekte der Adenosin- und Adeninnukleotidinfusionen sind auf die Purine selbst zurückzuführen.

4.3 Neurohormone

Das Perikardialorgan decapoder Crustaceen enthält zahlreiche Neurohormone wie die biogenen Amine Dopamin, Octopamin und Serotonin sowie die Peptidhormone Proctolin, CCAP und verschiedene FMRFamide-ähnlichen Peptide (Cooke und Sullivan, 1982).

In vielen isolierten Herzpräparationen wurde die Wirkung dieser Neurohormone auf die Herzaktivität beschrieben. So lösten fast alle Neurohormone in semi-isolierten (*in situ*) Herzen von *Homarus americanus*, mit Ausnahme von Dopamin und CCAP, positiv chronotrope und inotrope Effekte aus (Wilkens et al., 1996; Wilkens und Kuramoto, 1998).

In vivo Untersuchungen zeigten zum Teil ein anderes Bild der Wirkungsweise der Neurohormone. Peptidhormoninfusionen führten in *Cancer magister* zu negativ chronotropen (F1 und F2) oder zu keinem Effekt (CCAP und Proctolin) (McGaw et al., 1994a, McGaw et al., 1995 und McGaw und McMahan, 1995). Die Wirkung des Proctolins wurde 1992 von McMahan für den Amerikanischen Hummer bestätigt. Im Gegensatz dazu wurden durch die Peptidhormone in *Homarus*, bis auf F1 und F2, positiv inotrope Effekten ausgelöst (McMahan, 1992; McGaw et al., 1994a; McGaw et al., 1995). McMahan geht jedoch davon aus, daß die Peptidhormone weniger die Herzaktivität *in vivo* beeinflussen, als daß sie eine

wichtige Rolle in der Verteilung der Hämolymphe vermitteln, indem sie einen Einfluß auf die kardiovaskulären Klappen ausüben (McMahon, 1995).

Im Unterschied zu den Peptidhormonen verursachten die biogenen Amine *in vivo* gesteigerte Herzfrequenzen, wenn sie in den Perikardialsinus infundiert wurden. So löste Serotonin eine dosisabhängige Tachykardie aus und führte zusätzlich durch seinen inotropen Einfluß zu einem erhöhten Fluß in einigen Gefäßen (*C. maenas*: Wilkens et al., 1985; Saver und Wilkens, 1998; *C. magister*: Airriess und McMahon, 1992). Die Wirkungsvermittlungen durch Octopamin ähneln den durch Serotonin hervorgerufenen Wirkungen, bis auf einen kürzeren Zeitverlauf. Durch Dopamin wurde in *C. magister* eine Bradykardie ausgelöst (Airriess und McMahon, 1992). Guirguis und Wilkens (1995) beschrieben, daß in intakten und denervierten Hummern Dopamin und Serotonin die Herzfrequenz steigerten, wohingegen Octopamin nur in intakten Tieren zu einem positiv chronotropen Effekt führte.

Diese Beobachtungen und der graduelle Anstieg in denervierten Tieren führten zu der Annahme, daß Neurohormone, insbesondere die Amine, durch ihre lang anhaltende Wirkung (Saver und Wilkens, 1998), einen indirekten Einfluß auf die Herzaktivität unter Adenosineinfluß ausüben könnten.

Das Perikardialorgan genauso wie das Herzganglion werden über die kardioregulatorischen Nerven innerviert (Alexandrowicz, 1932). Während der Präparation werden die dorsalen Nerven oberhalb des Verzweigungspunktes durchtrennt, so daß zwar das Herzganglion keine Innervation mehr erhält, aber das Perikardialorgan weiter über das zentrale Nervensystem innerviert werden kann.

Für Vertebraten wurde der Einfluß von Adenosin auf die Neurotransmitterfreisetzung beschrieben, wobei hier in der Regel von hemmenden Einflüssen gesprochen wird. (Dobson, 1983; Dobson und Schrader, 1984; Fredholm und Dunwiddie, 1988). Für einige Invertebraten ist ebenfalls bekannt, daß Adenosin als Neuromodulator fungiert. In der Miesmuschel *Mytilus edulis* führte Adenosin zu einer verminderten Freisetzung von Monoaminen (Baracco und Stefano, 1990), wohingegen in *Helix aspersa* geringe Adenosinkonzentrationen zu einer Freisetzung von Acetylcholin führen, hohe Konzentrationen aber eine Freisetzung hemmen (Cox und Walker, 1986). Es wäre demnach denkbar, daß Adenosin auch in decapoden Crustaceen eine neuromodulatorische Aufgabe ausübt.

Unter der Annahme, daß Adenosin seine Wirkung indirekt über das zentrale Nervensystem vermittelt und Amine in die Hämolymphe ausgeschüttet werden, könnte es möglich sein, eine Änderung der Aminkonzentration in der Hämolymphe festzustellen. Aus diesen

Gründen sollte überprüft werden, inwieweit sich die Konzentration der Amine in der Hämolymphe durch eine zehnmünütige Adenosininfusionen [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{FG}$] ändert.

Weder für Dopamin, Serotonin noch Octopamin konnte eine signifikante Zunahme der Konzentration vor, während und nach der Infusion bestimmt werden (Abb.3.24, Seite 74). Tendenziell zeigten die Amine einen geringen Anstieg, der aber durch die Methode selbst verursacht worden sein könnte, z. B. ausgelöst durch den während der Blutabnahme entstandenen Stress.

Bisher existieren wenige Arbeiten zu Konzentrationen der biogenen Amine in der Hämolymphe decapoder Crustaceen. Livingstone et al. (1981) wiesen in der Hämolymphe von *Homarus americanus*, mit Hilfe einer Enzym-Isotopen-Methode, Octopamin in einer Konzentration von 2 nmol L^{-1} und Serotonin in einer Konzentration von $1,4 \pm 1,8 \text{ nmol L}^{-1}$ nach. Livingstone machte jedoch keine Angaben über Dopamin. Hanke (1993) ermittelte über elektrochemische Detektion eine Dopaminkonzentration von $2,6 \pm 2,5 \text{ nmol L}^{-1}$ für den Hummer. Ebenfalls unter Ruhebedingungen ermittelten Péqueux et al. (2002) für die chinesische Wollhandkrabbe, *Eriocheir sinensis*, Hämolympfkonzentrationen für Dopamin von $0,34 \pm 0,26 \text{ nmol L}^{-1}$, für Serotonin von $11 \pm 5 \text{ nmol L}^{-1}$ und für Octopamin von $0,4 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Der hohe Wert, der hier für Octopamin ermittelt wurde zeigt, inwieweit sich die Konzentrationen der einzelnen Substanzen innerhalb der decapoden Crustaceen unterscheiden können. Unterschiede treten ebenfalls unter Stressbedingungen auf. So ermittelten Bininda et al. (1992) nach Transportstress in der Hämolymphe von *Cancer magister* Konzentrationen von $27,0 \pm 0,15 \text{ nmol L}^{-1}$ Dopamin, $37,8 \pm 0,83 \text{ nmol L}^{-1}$ Octopamin und $329 \pm 49 \text{ nmol L}^{-1}$ Serotonin.

Die von Livingstone et al. (1981) ermittelten Werte liegen in Bereichen der physiologischen Schwellenwerte. Für den Amerikanischen Hummer wurde ein Schwellenwertebereich von 10^{-9} und 10^{-7} M (Dopamin) ermittelt (Florey und Rathemeyer, 1978). Für Serotonin wurde ein Schwellenwert von $5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ ermittelt (Cooke, 1966) und für Octopamin ein Schwellenwert im Bereich zwischen 10^{-7} und 10^{-8} M (Battelle und Kravitz, 1978).

Die in dieser Arbeit ermittelten Konzentrationen liegen zwar in den von den oben genannten Autoren ermittelten Konzentrationsbereichen, aber da die Konzentrationen von Serotonin und Octopamin unter den angegebenen physiologischen Schwellenwerten liegen, erscheint ein Einfluß seitens der beiden Hormone auf die Herzfrequenz oder die Fließgeschwindigkeit unwahrscheinlich. Lediglich die Dopaminkonzentration scheint im Bereich des Schwellenwertes von 10^{-9} M zu liegen und würde so einen Einfluß auf die Herzaktivität *in vivo* möglich erscheinen lassen. Das deckt sich mit der Beobachtung von Guirguis und Wilkens (1995), in der Dopamin sowohl in intakten als auch denervierten Tieren zu einem Anstieg der Herzfre-

quenz führte. Allerdings könnte so nur der langsame Anstieg der Herzfrequenz in denervierten Hummern erklärt werden, nicht aber der rapide Anstieg der Fließgeschwindigkeit während der Adenosininfusion. Augenscheinlich spiegeln die hier gemessenen Konzentrationen eher das Grundniveau der Neurohormone wider, das transient in der Hämolymphe vorkommt (Wilkins und McMahon, 1992), als daß sie eine physiologische Wirkung unter Adosineinfluß vermitteln.

4.4 Spekulation über mögliche Wirkungsvermittlungen von Adenosin und den Adeninnukleotiden

Der genaue Wirkungsmechanismus von Adenosin und den Nukleotiden kann gegenwärtig nur teilweise und spekulativ beschrieben werden.

Purine vermitteln ihre Wirkungen über spezifische Oberflächenrezeptoren (Ralevic und Burnstock, 1998). Die Purinrezeptoren in Vertebraten werden in die durch Adenosin aktivierten P1-Rezeptoren, von denen vier Subtypen existieren, und in die durch ATP und ADP aktivierten P2-Rezeptoren, bestehend aus zwei Hauptgruppen (P2X und P2Y), von denen jeweils weitere Subtypen existieren, unterteilt (Burnstock, 1978; Burnstock und Kennedy, 1986). Untersuchungen an Invertebraten zeigten auch hier eine weite Verbreitung der Purinrezeptoren (Burnstock, 1996). In Crustaceen wurden Purinrezeptoren meist in Verbindung mit Chemorezeptoren olfaktorischer Sinneszellen auf den Antennen beschrieben, an denen sie hauptsächlich zur Detektion von Nahrung eine wesentliche Rolle spielen. (Carr und Thompson, 1983; Trapido-Rosenthal et al., 1990). In *Panulirus argus* wurden durch elektrische Stimulation hervorgerufene Effekte auf den Darm durch ATP, ADP, AMP und Adenosin verstärkt. Da ATP und ADP deutlich stärkere Effekte hervorriefen als AMP und Adenosin, wurde proklamiert, daß P2-Rezeptoren vorhanden sein müssten (Hoyle und Greenberg, 1988). Es wird allerdings vermutet, daß die Rezeptoren der Invertebraten sich von denen der Vertebraten unterscheiden, da sie zum Teil nicht auf spezifische Antagonisten von Vertebraten reagieren (Hoyle und Greenberg, 1988; Walker et al., 1996).

Im Gehirn von *Panulirus argus* wurden P1-Rezeptoren beschrieben, die durch Adenosin und AMP zu einer Modulation von Interneuronen führten (Derby et al., 1987). Dieser Befund und die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse rücken das zentrale Nervensystem in den Mittelpunkt der Betrachtungen als einen möglichen Ansatzpunkt zur Beeinflussung der Herzaktivität durch Adenosin und die Adeninnukleotide. Adenosin scheint ausgehend vom zentralen Nervensystem über die dorsalen Nerven die Herzfrequenz zu steigern.

Das zentrale Nervensystem ist als Ansatzpunkt für die Vermittlung der Purinwirkung geeignet, da es den Hummer ventral, von posterior nach anterior, durchzieht (Beltz, 1995). Sechs Abdominalganglien des Nervenstranges liegen in direkter Nachbarschaft zur Abdominalmuskulatur und im direkten Weg des Hämolympflusses, ausgehend vom Gewebe zum Sinus. Während exzessiven Schwanzschlagens nimmt Adenosin in der Abdominalmuskulatur signifikant zu und kann dann in die Hämolymphe ausgeschleust werden, in der es, durch die Aktivität der Adenosindesaminase, in der Regel, zu einem schnellen Abbau zu inaktiven Inosin kommt (Maurer, 2001). Das würde bedeuten, daß Adenosin nur relativ nahe am Entstehungsort seine Wirkung vermitteln kann, bestätigt durch die Aussage von Mubagwa und Flammeng (2001), daß Adenosin eine hauptsächlich lokal wirkender Regulator der Gewebefunktionen sei. Somit wäre eine Lokalisation von Adenosinrezeptoren am zentralen Nervensystem und die von hier stattfindende indirekte Wirkungsvermittlung denkbar.

Weiterhin wäre eine durch Adenosin induzierte Wirkungsvermittlung über, in der Abdominalmuskulatur lokalisierte, Rezeptoren möglich. Aktiviert Adenosin einen Rezeptor, kann ein afferenter Reiz zum zentralen Nervensystem geleitet werden und von dort aus kann der Reiz über efferente Nervenbahnen zum Herzen geleitet werden.

Erste Vermutungen über solche Rezeptoren in Vertebraten wurden bereits 1971 von Stegemann und Kenner angestellt. Sinoway (1996) beschreibt für die Skelettmuskulatur Metaborezeptoren, die in Menschen unter Anstrengung stimuliert werden. Es handelt sich dabei um freie Nervenendigungen die durch eine Reihe von Metaboliten wie Laktat, H^+ , diprotoniertes Phosphat sowie Adenosin und ATP angeregt werden (Sinoway, 1996; Li und Sinoway, 2002). Die Aktivierung solcher Rezeptoren steigert den arteriellen Blutdruck, die Herzrate und die Kontraktionskraft des Herzens sowie die Ventilation (Moosavi, 1993).

Das während der Fluchtreaktion auftretende exzessive Schwanzschlagen decapoder Crustaceen kann, neben einer Zunahme an metabolischen Endprodukten, zu einer Stimulation von Mechanorezeptoren führen. Solche Mechanorezeptoren, auch als MRO (muscle receptor organ) bezeichnet, finden sich z. B. in jedem Abdominalsegment von *Homarus americanus*. Die Mechanorezeptoren sind dehnungsempfindlich und registrieren schnelle oder langsame Bewegungen des Abdomens (Govind, 1995; Sukhdeo und Page, 1992). Einen solchen afferenten Reiz konnte in einem Abdominalganglion des ventralen Nervenstranges durch Sukhdeo und Page (1992) gemessen werden.

Damit könnte unter funktioneller Hypoxie die Aktivierung der Metabo- und der Mechanorezeptoren zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung durch eine gesteigerte Herzfrequenz und Fließgeschwindigkeit sorgen. Die Modulation der Herzaktivität in *Homarus* würde

damit einem ‚exercise pressor reflex‘ ähnlichen Mechanismus, wie er für Vertebraten beschrieben wird (Smith et al., 2006), entsprechen. Zusätzlich würde dadurch die von Stegen (2001) gefundene Beobachtung identischer Herzkreislaufparameter, durch exzessives Schwanzschlagen und während der Infusion von Adenosin erklärt.

Die Wirkung von Adenosin auf die Fließgeschwindigkeit *in vivo* kann zum einen über das zentrale Nervensystem gesteuert werden, indem es zu einer gesteigerten Anzahl der Aktionspotentiale pro ‚Burst‘ kommt. Ein ‚Burst‘ repräsentiert einen Herzschlag und über die Anzahl der Aktionspotentiale, die das Herzganglion erreichen, kann die Kontraktionskraft des Myocardiums gesteigert werden, das dann zu einem vergrößerten Schlagvolumen führt. Zum anderen kann Adenosin über die Ligamente und das Perikardialseptum zu einem vergrößerten Schlagvolumen führen. Möglicherweise sind Adenosinrezeptoren an diesen beiden Hilfsorganen lokalisiert. Wahrscheinlicher ist aber eher eine indirekte neuronale Innervation dieser Strukturen, ausgelöst durch Adenosin. Adenosin führte in der semi-isolierten (*in situ*) Präparation, in der beide Strukturen vorhanden und intakt sind, zu keiner geänderten Herzaktivität. Das Perikardialseptum selbst wird über Segmentalnerven innerviert und somit über eine andere nervöse Route als das Herzganglion (Alexandrowicz, 1932). In den *in vivo* Präparationen sind diese Nervenverbindungen intakt, daher wäre ein solcher Einfluß durchaus denkbar. Allerdings wurde eine solche Beeinflussung bisher nicht eingehender untersucht.

Unabhängig davon, ob die Wirkung der Purine über Rezeptoren am zentralen Nervensystem oder über die metabolischen und Dehnungsrezeptoren in der Abdominalmuskulatur vermittelt wird, kommt es *in vivo* zu einer Modulation der Herzfrequenz *via* der dorsalen Nerven. Die anregenden Fasern führen zu einer gesteigerten ‚Burst‘-Rate des Herzganglions und damit zu einer gesteigerten Herzfrequenz. Über den gleichen Weg können, durch Innervation des Perikardialorgans, Neurohormone freigesetzt werden. Allerdings wurde keine signifikante Zunahme der biogenen Amine in der Hämolymphe ermittelt, die ebenfalls auf indirektem Wege auf die Herzfrequenz und den Hämolymphefluß modulierend wirken könnten. Ein Einfluß der Peptidhormone kann hier allerdings nicht ganz ausgeschlossen werden.

Für die Neurohormone werden verschiedene Wirkungsorte angegeben. Darunter das zentrale Nervensystem, das Herzganglion, die neuromuskulären Spalten zwischen den Neuronen des Herzganglions und des Myocardiums, das Myocardium selbst und die kardiovaskulären Klappen (Saver et al., 1998). Über diese möglichen Wirkungsorte können sie nicht nur die Herzfrequenz beeinflussen, sondern auch zu einem gesteigerten Hämolymphefluß führen (Wilkins und Kuramoto, 1998). Serotonin z. B. erhöht die Herzfrequenz und den Füllungs-

druck des Herzens, indem es die vier kleinen Neurone im Herzganglion über Rezeptoren anregt (Kuramoto und Ebara, 1988; Berlind, 1998).

Die Nukleotide scheinen die Herzfrequenz auf dem gleichen indirekten Weg zu beeinflussen wie Adenosin. Das würde neben der Lokalisation von P2-Rezeptoren im Bereich des zentralen Nervensystems eine Freisetzung von ATP, ADP und AMP aus dem Muskelgewebe bedeuten. Eine Freisetzung aus Endothelzellen wurde unter Stressituationen, wie mechanische Beanspruchung und Hypoxie, für Vertebraten beschrieben (Bodin und Burnstock, 2001; Zimmermann, 2001). Aber auch die Wirkungsvermittlung über die metabolischen Rezeptoren ist denkbar, da eine Aktivierung der Rezeptoren in Vertebraten durch ATP vermutet wird (Li und Sinoway, 2002).

Neben der indirekten Wirkung besitzen die Nukleotide offensichtlich einen direkten Effekt auf das Myocardium, bestätigt durch die Ergebnisse aus den semi-isolierten (*in situ*) Untersuchungen. Das würde für eine Lokalisation von P2-Rezeptoren am Herzen sprechen.

Eine andere Form, in der ATP seine Wirkung vermitteln könnte, wäre als Neurotransmitter im Nervensystem, z. B. in Form der Cotransmission, die Burnstock (1999, 2004) für Vertebraten beschrieb. Eine Koexistenz mehrerer Neurotransmitter in Nervenendigung des Amerikanischen Hummers ist bekannt, allerdings handelt es sich hier um die Koexistenz von Amin- und Peptidhormonen (Beltz, 1995). Einen indirekten Beweis, daß die Purine in Invertebraten als Neurotransmitter fungieren, lieferten Sathananthan und Burnstock (1976), indem sie am Herz der Venusmuschel (*Katalysia rhyctiphora*) cholinerge und aminerge Nervenendigungen und solche, die sie für purinerg hielten, beschrieben. Ein genauer Beweis blieb allerdings aus. Würde ATP als Neurotransmitter vorliegen, könnten die P2-Rezeptoren nicht nur auf dem Myocardium selbst lokalisiert sein, sondern ebenfalls, wie die Rezeptoren der Neurohormone (siehe oben), im synaptischen Spalt zwischen den Motoneuronen und dem Myocardium. ATP könnte dann schrittweise über eine Enzym-Kaskade (Zimmermann, 2001) abgebaut werden und jedes entstehende Produkt könnte über den gleichen oder einen eigenen Rezeptor eine Wirkung vermitteln.

Ein Einfluß der kardioregulatorischen Klappen und die damit einhergehende Modulation des Flusses konnte, wie schon beschrieben, nicht beobachtet werden, dennoch könnten Purinrezeptoren an den Klappen lokalisiert sein und so über die Regulation des Widerstandes zu einem geänderten Fluß führen.

Die Fülle der Untersuchungen und die Ergebnisse aus dieser Arbeit haben gezeigt, wie komplex die Steuerung des Herzkreislaufsystems in decapoden Crustaceen ist. Eine Vielzahl

von Mechanismen greifen ineinander, um eine adäquate Sauerstoffversorgung unter hypoxischen Bedingungen zu gewährleisten.

Die in dieser Arbeit untersuchten Purine erfüllen, neben den neuronalen und hormonellen sowie metabolischen Modulatoren, wie z. B. L-Laktat und Urat, ihren Beitrag zur Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff. Adenosin unterstützt den Sauerstofftransport durch eine indirekte Erhöhung der Herzfrequenz und der Fließgeschwindigkeit. Die Nukleotide vermitteln ihren Beitrag auf ähnliche Art und Weise wie Adenosin. Zusätzlich zu diesen indirekten Einflüssen steigern die Nukleotide den Hämolympffluß direkt. Auf diese Weise unterstützen Adenosin und die Nukleotide den Ausgleich zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffverbrauch insbesondere während funktioneller Hypoxie.

5 Zusammenfassung

In vivo Infusionen von Adenosin und den Adeninnukleotiden in den Infrabranchialsinus des Amerikanischen Hummers, *Homarus americanus* steigerten die Herzfrequenz, die Fließgeschwindigkeit und die Ventilationsfrequenz der Scaphognathiten (Stegen und Grieshaber, 2001). Während exzessiver Muskelaktivität, die z. B. bei der Fluchtreaktion auftritt, stieg der Adenosin Gehalt in der Abdominalmuskulatur signifikant an, wohingegen in der Hämolymphe keine signifikante Zunahme gemessen werden konnte (Stegen, Maurer und Grieshaber, in Vorbereitung). Es stellte sich nun die Frage, auf welchem Weg Adenosin und die Nukleotide ihre Herzaktivitäts-steigernde Wirkung vermitteln? Mit Hilfe von Pulsed-Doppler-Flowmeter *in vivo* Messungen bei intakten sowie kardioregulatorisch-denervierten Tieren und der semi-isolierten (*in situ*) Herzpräparation bei der das Herz keine „externen“ neuronalen und neurohormonellen Modulationen erhält, sollte es möglich sein diese Wege aufzuklären.

Der Vergleich der durch Adenosin und seinen Nukleotiden in den verschiedenen Präparationen ausgelösten Effekte erlaubt, Aussagen über mögliche direkte oder indirekte Wirkungsvermittlungen.

In der semi-isolierten (*in situ*) Herzpräparation änderten weder die Adenosin- noch die Nukleotidperfusionen die Herzfrequenz. Durch die Perfusionen mit den Nukleotidlösungen wurde, im Gegensatz zur Perfusion mit Adenosin, die Kontraktionskraft des semi-isolierten (*in situ*) Herzens erhöht. Offensichtlich vermitteln Adenosin und die Adeninnukleotide keinen Einfluß auf das Herzganglion, wohingegen die Nukleotide einen direkten Einfluß auf das Myocardium ausüben. In den *in vivo* Präparationen wurde in intakten Tieren durch die Adenosin- und Adeninnukleotidinfusionen die Herzfrequenz schnell gesteigert. Hingegen wurde in denervierten Tieren ein langsamer, gradueller Anstieg ausgelöst, der in seiner maximalen Ausprägung jedoch geringer war als in intakten Tieren.

Augenscheinlich ist der Einfluß von Adenosin, aber auch von dessen Nukleotiden auf die Herzfrequenz indirekter Natur, der über das zentrale Nervensystem *via* kardioregulatorischen Nerven vermittelt wird. Der langsame graduelle Anstieg der Herzfrequenz nach dem durchtrennen der kardioregulatorischen Nerven lässt vermuten, daß Substanzen, die in die Hämolymphe sezerniert werden, für diesen Anstieg verantwortlich sein könnten. In Frage kommen dafür Neurohormone. Wobei der Einfluß von Dopamin, Serotonin und Octopamin unter Adenosineinfluß ausgeschlossen zu sein scheint, da keine signifikant gesteigerten Konzentrationen in der Hämolymphe ermittelt werden konnten. Jedoch müssen Peptidhormone sowie bisher nicht identifizierte Substanzen für die beobachteten Effekte weiterhin in Betracht gezo-

gen werden. Ebenfalls indirekter Natur, ausgelöst durch Adenosin und die Adeninnukleotide, ist der langsame Anstieg der Herzfrequenz, wenn er aus einem vergrößerten Schlagvolumen resultierend, zu einer Dehnung des Ventrikels führt.

Im Gegensatz zur Herzfrequenz wird der Hämolympffluß anders reguliert. In semi-isolierten (*in situ*) Herzen verursachte Adenosin keinen direkten Effekt, wohingegen die Nukleotide zu einem Anstieg des ventrikulären Drucks führten, der für das gesteigerte Herzminutenvolumen verantwortlich war. In den beiden *in vivo* Präparationen kam es durch die Infusion aller Purine zu einer deutlich gesteigerten Fließgeschwindigkeit in den untersuchten Gefäßen. Diese Zunahme kann indirekt aus einem Anstieg des ventrikulären Drucks und einem vergrößerten Schlagvolumen erfolgen oder aus direkten Einflüssen an der Peripherie. Hier kann z. B. über die kardioarteriellen Klappen oder den Gefäßen der Widerstand reguliert werden. Unbekannte bzw. noch kaum untersuchte Faktoren müssen allerdings ebenfalls berücksichtigt werden. Faktoren, die zu einem veränderten ventrikulären Druck und Schlagvolumen führen, wären z. B. der Einfluß von Adenosin und den Adeninnukleotiden auf die Kontraktionseigenschaften der Ligamente und des Perikardialseptums. Ein weiterer Faktor betrifft die Kontraktionskraft der Herzen. Die Nukleotide können über P₂-Rezeptoren, lokalisiert auf dem Herzmuskel oder in synaptischen Spalten zwischen den Motoneuronen und dem Myocardium, ihre Wirkung direkt auf das Herz transduzieren.

Die gesamten Ergebnisse zeigen, daß das kardiovaskuläre System des Amerikanischen Hummers, *Homarus americanus*, durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener neuronaler, hormoneller und metabolischer Faktoren kontrolliert wird. Diese Faktoren unterstützen und ergänzen sich auf unterschiedlichen Ebenen des Herzkreislaufsystems, so daß eine effiziente Regulation der Sauerstoffversorgung unter hypoxischen Bedingungen gewährleistet ist.

6 Literatur

- Abbracchio, M. P. and Burnstock, G. (1998). Purinergic signalling: Pathophysiological roles. *Jpn. J. Pharmacol.* 78, 113-145.
- Airriess, C. N. and McMahon, B. R. (1992). Aminergic modulation of circulation in the crab, *Cancer magister*. In: Hill, R. B., Kuwasawa, K., McMahon, B. R. and Kuramoto, T. (eds). Vol. 11. Phylogenetic models in functional coupling of the CNS and the cardiovascular system. *Comp. Physiol*, Basel, Karger. 123-131.
- Airriess, C. and McMahon, B. R. (1994). Cardiovascular adaptations enhance tolerance of environmental hypoxia in the Crab *Cancer magister*. *J. Exp. Biol.* 190, 23-41.
- Alexandrowicz, J. S. (1932). The innervation of the heart of the crustacea. I. Decapoda. *Q.J. Microsc. Sci* 75,181-249.
- Alexandrowicz, J. S. (1953). Nervous organs in the pericardial cavity of the decapod Crustacea. *Journ. Mar. Biol. Assoc. UK.* 31, 563-584
- Alexandrowicz, J. S. and Carlisle, D. B. (1953). Some experiments on the function of the pericardial organs in crustacea. *Journ. Mar. Biol. Assoc. UK.* 32, 175-192.
- Anderson, M. and Cooke, I. M. (1971). Neural activation of the heart of the lobster *Homarus americanus*. *J. Exp. Biol.* 55, 449-468.
- Arch, J. R.S. and Newsholm, E. A. (1978). Activities and some properties of 5'-Nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissue from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine. *Biochem. J.* 174, 965-977.
- Balligand, J. L. Kelly, R. A., Marsden, P. A., Smith, T. W. and Michel, T. (1993). Control of cardiac-muscle cell-function by an endogenous nitric-oxide signaling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 347-351.
- Barraco, R. A. and Stefano, G. B. (1990). Pharmacological evidence for the modulation of monoamine release by adenosine in the invertebrate nervous system. *J. Neurochem.* 54, 2002-2006.
- Battelle, B. A. and Kravitz, E. A. (1978). Targets of octopamine action in the lobster: cyclic nucleotide changes and physiological effects in hemolymph, heart and exoskeletal muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205, 438-448.
- Belardinelli, L. and Lerman, B. B. (1991). Adenosine - cardiac electrophysiology. *Pace.* 14, 1672-1680.
- Belardinelli, L., Linden, J. and Berne, R. M. (1989). The cardiac effects of adenosine. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 32, 73-97.
- Beltz, B. S. (1995). Neurobiology and neuroendocrinology. In: Factor, J. R. *Biology of the lobster Homarus americanus*. Accademic Press, Inc., USA. 267-289
- Berenbrink, M. (1994). Die Kontrolle des intrazellulären pH in den Erythrozyten von Knoch enfischen. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Diplomarbeit

- Berlind, A. (1989). Feedback from motor neurons to pacemaker neurons in lobster cardiac ganglion contributes to regulation of burst frequency. *J. Exp. Biol.* 141, 277-294.
- Berlind, A. (1998). Dopamine and 5-hydroxytryptamine actions on the cardiac ganglion of the lobster *Homarus americanus*. *J. Comp Physiol [A]* 182, 363-376.
- Berne, R. M. (1963). Cardiac nucleotides in hypoxia - possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol.* 204, 317-322.
- Berne, R. M. Gidday, J. M.; Hill, J. M., Curnish, R. R. and Rubio, R. R. (1987). Adenosine in the local regulation of blood flow: some controversies. In: Gerlach, E. and Becker, B. F (eds). Topics and perspectives in adenosine research. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 395-405.
- Bininda, D. H., McMahon, B. R., and Wilkens, J. L. (1992). Circulating levels and clearance rates of DA, OA and 5-HT in the hemolymph of the crab *C. magister*. *Am. Zool.* 32,2. A47
- Bodin, P. and Burnstock, G. (2001). Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem. Res.* 26, 959-969.
- Bridges, C. R. and 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, R. F. (1991). Role of adenosine in energy supply demand balance. *Nucleosides & Nucleotides* 10, 931-943.
- Burggren, W.W., Pinder, A., McMahon, B. R., Doyle, M., and Wheatly, M. (1990). Heart rate and hemolymph pressure responses to hemolymph volume changes in the land crab *Cardiosoma guanhumi*: evidence for "baroreflex" regulation. *Physiol. Zool.* 63, 167-181
- Burnstock, G. (1976). Purinergic receptors. *J. Theor. Biol.* 62, 491-503.
- Burnstock, G. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: Straub, R. W. and Bolis, L (eds), Cell membrane receptors for drugs and hormones: A multi disciplinary approach Raven Pres. NY. 107-118.
- Burnstock, G. (1996). A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain. *Lancet* 347, 1604-1605.
- Burnstock, G. (1999). Purinergic cotransmission. *Brain Res. Bull.* 50, 355-357.
- Burnstock, G. (2002). Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 364-373.
- Burnstock, G. (2004a). Cotransmission. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 47-52.
- Burnstock, G. (2004b). Introduction: P2 receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* 4, 793-803.
- Burnstock, G. (2006a). Vessel tone and remodeling. *Nat. Med.* 12, 16-17.
- Burnstock, G. (2006b). Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol. Rev.* 58, 58-86.
- Burnstock, G. (2006c). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 166-176.

- Burnstock, G. and Kennedy, C. (1986). A dual function for adenosine 5'-triphosphate in the regulation of vascular tone. *Circ. Res.* 58, 319-330.
- Burnstock, G. and Knight, G. E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* 240, 31-40.
- Burnstock, G. and Meghji, P. (1983). The Effect of Adenyl Compounds on the Rat-Heart. *British Journal of Pharmacology* 79, 211-218.
- Burnstock, G, Campbell, G., Satchell, D. and Smythe, A. (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in gut. *Br. J. Pharmac.* 40, 668-688.
- Carr, W.E.S. and Thompson, H.W. (1983). Adenosine 5'-monophosphate, an internal regulatory agent, is a potent chemoattractant for marine shrimp. *J. Comp. Physiol.* 153, 47-53.
- Chan, K. S., Cavey, M. J., and Wilkens, J. L. (2006). Microscopic anatomy of the thin-walled vessels leaving the heart of the lobster *Homarus americanus*: anterior lateral arteries. *Invertebr. Biol.* 125, 70-82.
- Claybrook, D.L. (1983). Nitrogen metabolism. In: Bliss, E. D. Mantel, L. H. (eds) *The biology of crustacea. Vol. 5 Internal anatomy and physiological regulation* Academic Press, Inc. NY. 163-213.
- Cole, J. S. and Hartley, C. J. (1977). Pulsed doppler coronary-artery catheter - preliminary-report of a new technique for measuring rapid changes in coronary-artery flow velocity in man. *Circ.* 56, 18-25.
- Cooke, I. M. (1966). The sites of action of pericardial organ extract and 5-hydroxytryptamine in the decapod crustacean heart. *Am. Zool.* 6, 107-121.
- Cooke, I. M. (1988). Studies on the crustacean cardiac ganglion. *Comp. Biochem. Physiol [C]*. 91, 205-218.
- Cooke, I. M. (2002). Reliable, responsive pacemaking and pattern generation with minimal cell numbers: the crustacean cardiac ganglion. *Biol. Bull.* 202, 108-136.
- Cooke, I. M. and Sullivan, R. E. (1982). Hormones and neurosecretion. In: Bliss, E., Atwood, H. L. and Sandemann, D. C. (eds), *The biology of crustacea, vol. 3. Neurobiology: structure and function.* Academic Press, Inc., NY. 205-290.
- Cox, R. T. and Walker, R. J. (1987). An analysis of the adenosine receptors responsible for modulation of an excitatory acetylcholine response on an identified *Helix* neuron. *Comp. Biochem. Physiol [C]* 88, 121-130.
- Czytrich, H. M. (1990). *Der Purinnukleotidstoffwechsel des Flußkrebsees Astacus leptodactylus in Abhängigkeit von einer funktionsbedingten und biotopbedingten Anaerobiose.* Heinrich-Heine-Universität, Dissertation
- Daly, J. W. (1982). Adenosine receptors: targets for future drugs. *J. Med. Chem.* 25, 197-207.
- Darvish, A. and Metting, P. J. (1993). Purification and regulation of an AMP-specific cytosolic 5'-nucleotidase from dog heart. *Am. J. Physiol.* 264, 1528-1534.
- Davidson, G. W., Wilkens, J. L., and Lovell, P. (1998). Neural control of the lateral abdominal arterial valves in the lobster *Homarus americanus*. *Biol. Bull.* 194, 72-82.

- Derby, C. D., Ache, B. W., and Carr, W. E. (1987). Purinergic modulation in the brain of the spiny lobster. *Brain Res.* 421, 57-64.
- Deussen, A., Borst, M., and Schrader, J. (1988). Formation of S-adenosylhomocysteine in the heart .1. An index of free intracellular adenosine. *Circ. Res.* 63, 240-249.
- DeWachter, B. and McMahon, B. R. (1996). Haemolymph flow distribution, cardiac performance and ventilation during moderate walking activity in *Cancer magister* (Dana) (Decapoda, Crustacea). *J. Exp. Biol.* 199, 627-633.
- Dobson, J. G. (1983). Mechanism of adenosine inhibition of catecholamine-induced responses in heart. *Circ. Res.* 52, 151-160.
- Dobson, J. G. and Fenton, R. A. (1993). Adenosine inhibition of beta-adrenergic induced responses in aged hearts. *Am. J. Physiol* 264, H494-H503.
- Dobson, J.G. and Schrader, J. (1984). Role of extracellular and intracellular adenosine in the attenuation of catecholamine evoked-responses in guinea-pig heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 16, 813-822.
- Drury, A.N. and 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.
- Dykens, J. A. (1991). Purineolytic capacity and origin of hemolymph urate in *Carcinus maenas* during hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*. 98, 579-582.
- Fijisawa, K. and Yoshino, M. (1987). Activities of adenylate-degrading enzymes in muscles from vertebrates and invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. [B]* 86, 109-112.
- Florey, E. (1960). Studies on the nervous regulation of the heart beat in decapod crustacea. *J. Gen. Physiol* 43, 1061-1081.
- Florey, E. and Rathmayer, M. (1978). The effects of octopamine and other amines on the heart and on neuromuscular transmission in decapod crustaceans: further evidence for a role as neurohormone. *Comp. Biochem. Physiol. [C]* 61, 229-237.
- Fredholm, B. B. and Dunwiddie, T. V. (1988). How does adenosine inhibit transmitter release. *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 130-134.
- Fujiwara-Tsukamoto, Y., Kuwasawa, K., and Okada, J. (1992). Anatomy and physiology of neural regulation of haemolymph flow in the lateral arteries of the isopod crustacean, *Bathynomus doederleini*. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*. 86, 70-85.
- George, C. J. (1955). The pericardial membrane and its role in crustacean circulation. *J. anim. morph. physiol.* 2, 73-78.
- Gerlach, E., Deuticke, B., and Dreisbach, R. H. (1963). Der Nukleotid-Abbau im Herzmuskel bei Sauerstoffmangel und seine mögliche Bedeutung für die Coronardurchblutung. *Die Naturwissenschaften* 50, 228-229.
- Govind, C. K. (1995). Muscle and their innervation. In: Factor, J. R. (ed) *Biology of the lobster Homarus americanus*. Academic Press, Inc., USA. 291-312
- Guirguis, M. S. and Wilkens, J. L. (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, 179-185.

- Gyurko, R., Kuhlencordt, P., Fishman, M. C., Huang, P. L. (2000). Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP. *Am. J. Physiol.* 278, H971-H981.
- Hanafy, K.A., Krumenacker, J.S. and Murad, F. (2001). NO, nitrotyrosin, and cyclicGMP in signal transduction. *Med. Sci. Monit.* 7, 801-819.
- Hanke, O.L. (1993). Einfluß von Plasmafaktoren auf die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins von Crustaceen. Heinrich-Heine-Universität, Diplomarbeit.
- Hartley, C. J. and Cole, J. S. (1974). Ultrasonic pulsed doppler system for measuring blood flow in small vessels. *J. Appl. Physiol.* 37, 626-629.
- Holton, P. (1959). The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J. Physiol.* 145, 494-504.
- Hopwood, A. M. and Burnstock, G. (1987). ATP mediates coronary vasoconstriction via P2X-purinoceptors and coronary vasodilatation via P2Y-purinoceptors in the isolated perfused rat heart. *Eur. J. Pharmacol.* 136, 49-54.
- Hoyle, C. H. V. and Greenberg, M. J. (1988). Actions of adenylyl compounds in invertebrates from several phyla: evidence for internal purinoceptors. *Comp. Biochem. Physiol. [C]* 90, 113-122.
- Ignarro, L. J., Cirino, G., Casini, A., Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: An overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34, 879-886.
- Illes, P., Klotz, K. N., and Lohse, M. J. (2000). Signaling by extracellular nucleotides and nucleosides. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362, 295-298.
- Kelm, M. and Schrader, J. (1988). Nitric-oxide release from the isolated guinea-pig heart. *Eur. J. Pharmacol.* 155, 317-321.
- Klinke, R. und Silbernagel, S. (1994). *Lehrbuch der Physiologie.* Georg Thieme Verlag Stuttgart, NY. 122-124
- Kuramoto, T. and Ebara, A. (1984a). Neuro-hormonal modulation of the cardiac outflow through the cardioarterial valve in the lobster. *J. Exp. Biol.* 111, 123-130.
- Kuramoto, T. and Ebara, A. (1984b). Effects of perfusion-pressure on the isolated heart of the lobster, *Panulirus japonicus*. *J. Exp. Biol.* 109, 121-140.
- Kuramoto, T. and Ebara, A. (1985). Effects of perfusion-pressure on the bursting neurons in the intact or segmented cardiac ganglion of the lobster, *Panulirus-japonicus*. *J. Neurosci. Res.* 13, 569-580.
- Kuramoto, T. and Ebara, A. (1988). Combined effects of 5-hydroxytryptamine and filling pressure on the isolated heart of the lobster, *Panulirus Japonicus*. *J. Comp. Physiol. [B]* 158, 403-412.
- Kuramoto, T. and Kuwasawa, K. (1980). Ganglionic activation of the myocardium of the lobster, *Panulirus-Japonicus*. *J. Comp. Physiol.* 139, 67-76.
- Kuramoto, T., Hirose, E., and Tani, M. (1992). Neuromuscular transmission and hormonal modulation in the cardioarterial valve of the lobster, *Homarus americanus*. In: Hill, R. B., Kuwasawa, K., McMahan, B. R. and Kuramoto, T. (eds). Vol. 11. Phylogenetic models in functional coupling of the CNS and the cardiovascular system. *Comp. Physiol, Basel, Karger.* 62-69.

- Kuramoto, T., Wilkens, J. L., and McMahon, B. R. (1995). Neural control of cardiac outflow through the sternal valve in the lobster *Homarus Americanus*. *Physiol. Zool.* 68, 443-452.
- Lallier, F., Boitel, F., and Truchot, J. P. (1987). The effect of ambient oxygen and temperature on hemolymph L-lactate and urate concentrations in the shore crab *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.[A]* 86, 255-260.
- Lazou, A. (1989). Adenylate metabolizing enzymes in invertebrate tissues. *Comp. Biochem. Physiol.[B]* 92, 175-180.
- Lecher, E. (1973) Lehrbuch der Physik für Mediziner und Biologen. 13. Auflage. B. G. Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig
- Li, J. H. and Sinoway, L. I. (2002). ATP stimulates chemically sensitive and sensitizes mechanically sensitive afferents. *Am. J. Physiol.* 283, H2636-H2643.
- Livingstone, M. S., Schaeffer, S. F., and Kravitz, E. A. (1981). Biochemistry and ultrastructure of serotonergic nerve endings in the lobster: serotonin and octopamine are contained in different nerve endings. *J. Neurobiol.* 12, 27-54.
- Lloyd, H. G. E. Deussen, A.; Wuppermann, H.; Schrader, J. (1988). The transmethylation pathway as a source for adenosine in the isolated guinea-pig heart. *Biochem. J.* 252, 489-494.
- Mahadevan, A. Lappe, J.; Rhyne, R. T.; Cruz-Bermudez, N. D.; Marder, E.; Goy, M. F. (2004). Nitric oxide inhibits the rate and strength of cardiac contractions in the lobster *Homarus americanus* by acting on the cardiac ganglion. *J. Neurosci.* 24, 2813-2824.
- Mangum, C.P. (1983). Oxygen transport in the blood In: Bliss, E. D. Mantel, L. H. (eds) *The biology of crustacea. Vol. 5. Internal anatomy and physiological regulation* Academic Press, Inc. NY. 373-429.
- Martin, G. G. and Hose, J. L. (1995). Circulation, the blood and diseases. In: Factor, J. R (ed), *Biology of the lobster Homarus americanus* Academic Press, Inc., USA. 465-495.
- Maynard, D. M. (1953). Integration in the cardiac ganglion of *Homarus*. *Biol. Bull.* 105, 367.
- Maynard, D. M. (1960). Circulation and heart function. In: Waterman T. H. (ed). *The physiology of crustacea. Vol. I: Metabolism and growth.* Academic Press, Inc., USA and London 161-226.
- McGaw, I. J. (2004). Ventilatory and cardiovascular modulation associated with burying behaviour in two sympatric crab species, *Cancer magister* and *Cancer productus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 303, 47-63.
- McGaw, I. J. (2005). The decapod crustacean circulatory system: A case that is neither open nor closed. *Microsc. Microanal.* 11, 18-36.
- McGaw, I.J. & McMahon, B.R. (1995). The FMRFamide-related peptides F1 and F2 alter hemolymph distribution and cardiac-output in the crab *Cancer magister*. *Biol.Bull.*188, 186-196.
- McGaw, I.J., Airriess, C.N., and McMahon, B.R. (1994a). Peptidergic modulation of cardiovascular dynamics in the dungeness crab, *Cancer magister*. *J.Comp.Physiol.[B]* 164, 103-111.
- McGaw, I. J., Airriess, C. N., and McMahon, B. R. (1994b). Patterns of hemolymph flow variation in decapod crustaceans. *Marine Biology* 121, 53-60.

- McGaw, I. J., Wilkens, J. L., McMahon, B. R. and Airriess, C. N. (1995). Crustacean cardio-excitatory peptides may inhibit the heart in vivo. *J. Exp. Biol.* 198, 2547-2550.
- McLaughlin, P. A. (1983). Internal anatomy. In: Bliss, E. D. Mantel, L. (eds) *Biology of crustacean*. Vol. 5: Internal anatomy and physiological regulation. Academic Press, Inc., NY. 1-53.
- McMahon, B. R. (1992). Factors controlling the distribution of cardiac output in decapod crustaceans. In: Hill, R. B. and Kuwasawa, K. (eds) *Phylogenetic models in functional coupling of the CNS and the cardiovascular system*, Karger. 51-61.
- McMahon, B. R. (1995). 3. Regulation of autonomic functions. Integrated neural and neuro-hormonal control of respiratory and circulatory function in crustaceans: is there evidence for an "autonomic" control system? *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 88, 87-101.
- McMahon, B. R. (1995a). The physiology of gas exchange, circulation, ion regulation, and nitrogenous excretion: an integrative approach. In: Factor, J. R. *Biology of the lobster *Homarus americanus**. Academic Press, Inc., USA. 497-517.
- McMahon, B. R. and Burnett, L. E. (1990). The crustacean open circulatory system - a re-examination. *Physiol. Zool.* 63, 35-71.
- McMahon, B. R. and Wilkens, J. L. (1975). Respiratory and circulatory responses to hypoxia in lobster *Homarus americanus*. *J. Exp. Biol.* 62, 637-655.
- McMahon, B. R. and Wilkens, J. L. (1983). Ventilation, perfusion, and oxygen uptake. In: Bliss, E. D. Mantel, L. (eds) *Biology of crustacean*. Vol. 5: Internal anatomy and physiological regulation. Academic Press, Inc., NY. 289-372.
- Milne Edwards, H. (1837). "Histoire naturelle des crustacés, comprennent l'anatomie, la physiologie et la classification de ces animaux," Vol. 2 Librairie encyclopédique de Roret, Paris
- Moosavi, A. H., Mistry, P., Imms, F. J. and Bradbury, M. W. B. (1993). Evidence for a drive to respiration during exercise from metabolic receptors within skeletal muscle of man. *J. Physiol.* 467, P69
- Morris, S., Bridges, C. R., and Grieshaber, M. K. (1985). A new role for uric acid modulator of hemocyanin oxygen affinity in crustaceans. *J. Exp. Zool.* 235, 135-139.
- Mubagwa, K. and Flameng, W. (2001). Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: An updated overview. *Cardiovasc. Res.* 52, 25-39.
- Palumbo, A. (2005). Nitric oxide in marine invertebrates: A comparative perspective. *Comp. Biochem. Physiol.[A]-Molecular & Integrative Physiology* 142, 241-248.
- Pelleg, A., Hurt, C. M., and Michelson, E. L. (1990). Cardiac effects of adenosine and ATP. In: Dubyak, G. R. and Fedan, J. S. (eds) Vol. 603 *Biological actions of extracellular ATP*, The New York Academy of Science NY 19-30.
- Pelleg, A., Katchanov, G., and Xu, J. (1997). Autonomic neural control of cardiac function: modulation by adenosine and adenosine 5'-triphosphate. *Am. J. Cardiol.* 79, 11-14.
- Pequeux, A. Le Bras, P., Cann-Moisan, C., Caroff, J. And Sebert, P. (2002). Polyamines, indolamines, and catecholamines in gills and haemolymph of the euryhaline crab, *Eriocheir sinensis*. Effects of high pressure and salinity. *Crustaceana* 75, 567-578.

- Raffin, J. P. and Thebault, M. T. (1987). Purification and partial characterization of an AMP-deaminase from the marine invertebrate *Palaemon serratus*. *Comp. Biochem. Physiol.*[B] 88, 1071-1076.
- Ralevic, V. and Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews* 50, 413-492.
- Reiber, C. L. (1992). The hemodynamics of the crustacean open circulatory system: hemo lymph flow in the crayfish (*Procambarus clarkii*) and the lobster (*Homarus americanus*). Graduate school of Massachusetts, Dissertation.
- Reiber, C. L. and McMahon, B. R. (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, C.L., McMahon, B. R., and Burggren, W. W. (1992). Redistribution of cardiac output in response to hypoxia: A comparison of freshwater Crayfish, *Procambarus clarkii*, and the Lobster, *Homarus americanus*. In: Hill, R. B., Kuwasawa, K., McMahon, B. R. and Kuramoto, T. (eds). Vol. 11. Phylogenetic models in functional coupling of the CNS and the cardiovascular system. *Comp. Physiol*, Basel, Karger. 22-28.
- Reiber, C. L., Mc Mahon, B. R., and Burggren, W. W. (1997). Cardiovasculare 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
- Ribeiro, J. A. and Lima, M. S. (1985). The hypotensive effect of intracarotid injections of adenosine-triphosphate depends on its hydrolysis to adenosine. *Pharmacol. Res. Commun.* 17, 255-260.
- Rose, R. A., Wilkens, J. L., and Walker, R. L. (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, R. A., MacDougall, K., Patel, A., Wilkens, J. L. and Walker, R. L. (2001). Effects of walking on ventilatory and cardiac function in intact and cardiac-impaired lobsters. *Physiol Biochem. Zool.* 74, 102-110.
- Roush, A. H.; Betz, R. (1956). The adenosine deaminase of crustaceans. *Biochem. Biophys. Acta.* 19, 579-580.
- Sathanathan, A. H. and Burnstock, G. (1976). Evidence for a non-cholinergic, non-aminergic innervation of venus clam heart. *Comp. Biochem. Physiol.*[C] 55, 111-118.
- Saver, M. A. and Wilkens, J. L. (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*. *Comp. Biochem. Physiol.* [A] 120, 301-310.
- Saver, M. A., Wilkens, J. L., and Airriess, C. N. (1998). Proctolin affects the activity of the cardiac ganglion, myocardium, and cardioarterial valves in *Carcinus maenas* hearts. *J. Comp. Physiol.* [B] 168, 473-482.
- Scholz, N. L., Labenia, J. S., De Vente, J., Graubard, K. and Goy, M. F. (2002). Expression of nitric oxide synthase and nitric oxide-sensitive guanylate cyclase in the crustacean cardiac ganglion. *J. Comp. Neurol.* 454, 158-167.

- Schrader, J. (1990). Adenosine. A homeostatic metabolite in cardiac energy metabolism. *Circ.* 81, 389-391.
- Schuman, E. M. and Madison, D. V. (1994). Nitric-oxide and synaptic function. *Ann. Rev. Neurosci.* 17, 153-183.
- Shadwick, R.E., Pollock, C. M., and Stricker, S. A. (1990). Structure and biochemical properties of crustacean blood vessels. *Physiol. Zool.* 63, 90-101.
- Shryock, J. C. and Belardinelli, L. (1997). Adenosine and adenosine receptors in the cardiovascular system: Biochemistry, physiology, and pharmacology. *Am. J. Cardiol.* 79, 2-10.
- Sinoway, L. I. (1996). Neural responses to exercise in humans: Implications for congestive heart failure. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23, 693-699.
- Smith, S. A., Mitchell, J. H., and Garry, M. G. (2006). The mammalian exercise pressor reflex in health and disease. *Exp. Physiol* **91**, 89-102.
- Sparks, H. V. and Bardenheuer, H. (1986). Regulation of adenosine formation by the heart. *Circ. Res.* 58, 193-201.
- 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. [B]* 72, 127-132.
- Stegeman, J. and Kenner, T. (1971). Theory on heart rate control by muscular metabolic receptors. *Archiv für Kreislaufforschung* 64, 185-214.
- Stegen, E. (2001). Cardiovasculäre und respiratorische Effekte des Adenosin beim Amerikanischen Hummer, *Homarus americanus*. Heinrich-Heine-Universität, Dissertation.
- Stegen, E. and Grieshaber, M. K. (2001). Adenosine increases ventilation rate, cardiac performance and haemolymph velocity in the American lobster *Homarus americanus*. *J. Exp. Biol.* 204, 947-957.
- Stegen, E., Maurer, G., and Grieshaber, M. K. (in preparation). Regulatory function of endogenous adenosine on cardiac frequency, ventilatory response and haemolymph flow during enhanced activity and after infusion of AMP, adenosine and IMP into the haemolymph of the American lobster, *Homarus americanus*. unpublished
- Sukhdeo, S. C. and Page, C. H. (1992). Abdominal postural motor-responses initiated by the muscle receptor organ in lobster depend upon centrally generated motor-activity. *J. Exp. Biol.* 162, 167-183.
- Trapido-Rosenthal, H. G., Carr, W. E., and Gleeson, R. A. (1990). Ectonucleotidase activities associated with the olfactory organ of the spiny lobster. *J. Neurochem.* 55, 88-96.
- Truchot, J. P. (1980). Lactate increases the oxygen affinity of crab hemocyanin. *J. Exp. Zool.* 214, 205-208.
- Urich, K. (1990). Niedermolekulare Stickstoffverbindungen. In: Urich, K. (ed). *Vergleichende Biochemie der Tiere*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 356-404.
- van de Meer, J. (2004). Adenosin und Urat modulieren die Sauerstoffversorgung des Sumpfkrebse *Astacus leptodactylus*. Heinrich-Heine-Universität, Dissertation.

Volk, 1988 in Rose 2001

Walker, R. J., Brooks, H. L., and Holden-Dye, L. (1996). Evolution and overview of classical transmitter molecules and their receptors. *Parasitology* 113, S3-33.

West, N. H. (1989). Methods for measuring blood flow and distribution in intermittently-ventilating and diving vertebrates. In: Bridges, C. R. Butler, P. J.(eds) *Techniques in comparative respiratory physiology*. Cambridge University Press. 171-193.

White, T. D. and Angus, J. A. (1987). Relaxant effects of ATP and adenosine on canine large and small coronary-arteries *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.* 143, 119-126.

Wilkens, J. L. (1987). Cardiac and circulatory control in decapod crustacea with comparisons to molluscs. *Experientia* 43, 990-994.

Wilkens, J. L. (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.

Wilkens, J. L. (1997). Possible mechanisms of control of vascular resistance in the lobster *Homarus americanus*. *J. Exp. Biol.* 200, 487-493.

Wilkens, J. L. (1999). The control of cardiac rhythmicity and of blood distribution in crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.* [A] 124, 531-538.

Wilkens, J. L. and McMahon, B. R. (1992). Intrinsic-properties and extrinsic neurohormonal control of crab cardiac hemodynamics. *Experientia* 48, 827-834.

Wilkens, J. L. and McMahon, B. R. (1994). Cardiac performance in semi-isolated heart of the crab *Carcinus maenas*. *Am. J. Physiol* 266, R781-R789.

Wilkens, J. L. and Mercier, A. J. (1993). Peptidergic modulation of cardiac-performance in isolated hearts from the shore crab *Carcinus maenas*. *Physiol. Zool.* 66, 237-256.

Wilkens, J. L. and Kuramoto, T. (1998). Comparison of the roles of neurohormones in the regulation of blood distribution from the hearts of American and Japanese lobsters. *J. Comp. Physiol.* [B] 168, 483-490.

Wilkens, J. L. and Walker, R. L. (1992). Nervous control of crayfish cardiac hemodynamics. In: Hill, R. B., Kuwasawa, K., McMahon, B. R. and Kuramoto, T. (eds). Vol. 11. *Phylogenetic models in functional coupling of the CNS and the cardiovascular system*. Comp. Physiol, Basel, Karger. 115-122.

Wilkens, J. L., Mercier, A. J., and Evans, J. (1985). Cardiac and ventilatory responses to stress and to neuro-hormonal modulators by the shore crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* [C] 82, 337-343.

Wilkens, J. L., Davidson, G. W., and Cavey, M. J. (1997a). Vascular peripheral resistance and compliance in the lobster *Homarus americanus*. *J. Exp. Biol.* 200, 477-485.

Wilkens, J. L., Kuramoto, T., and McMahon, B. R. (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.* [C] 114, 57-65.

Wilkins, J. L., Yazawa, T., and Cavey, M. J. (1997b). Evolutionary derivation of the American lobster cardiovascular system: An hypothesis based on morphological and physiological evidence. *Invertebr. Biol.* 116, 30-38.

Wilkins, J. L., Shinozaki, T., Yazawa, T. and ter Keurs, H. E. (2005). Sites and modes of action of proctolin and the FLP F2 on lobster cardiac muscle. *J. Exp. Biol.* 208, 737-747.

Yazawa, T. and Kuwasawa, K. (1992). Intrinsic and extrinsic neural and neurohumoral control of the decapod heart. *Experientia* 48, 834-840.

Zeis, B., Nies, A., Bridges, C. R. (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.

Zeis, B. und Grieshaber, M. K. (1993). Akkumulation von Urat und Laktat bei Hypoxie – Untersuchungen am Europäischen Hummer *Homarus vulgaris* *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 86:130.

Zimmermann, H. (1992). 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 285 (Pt 2), 345-365.

Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362, 299-309.

Zimmermann, H. (2001). Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Develop. Res.* 52, 44-56.

7 Anhang

7.1 Pulsed-Doppler Flowmetrie: Adenosininfusion

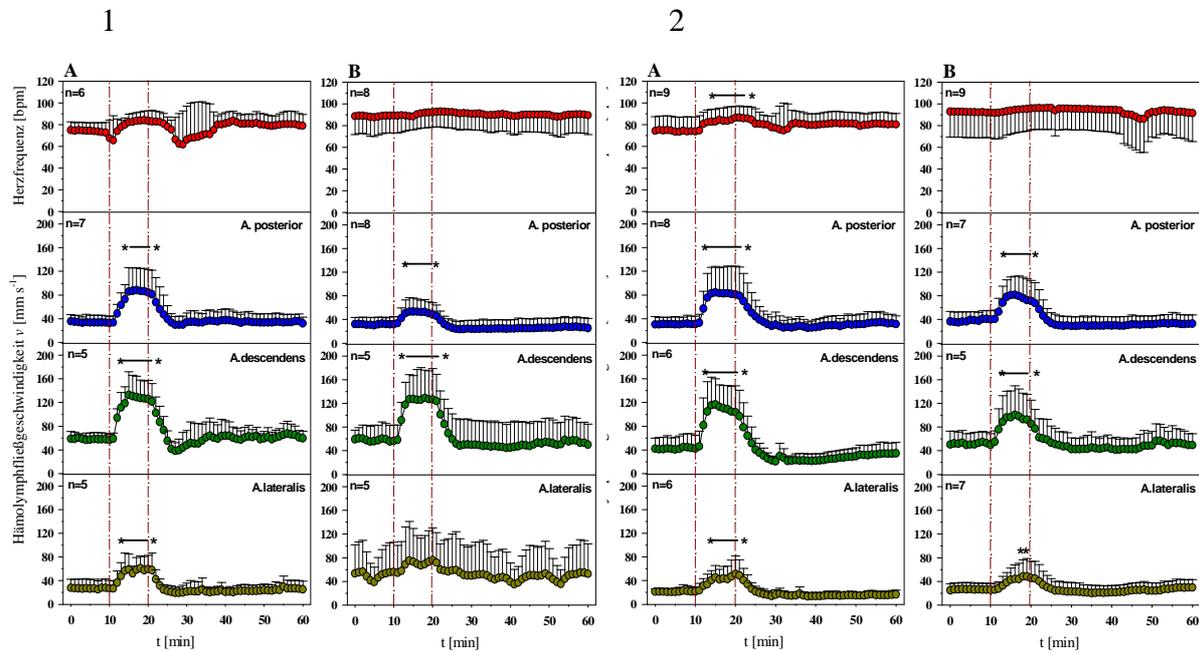


Abb. 7.1: Der Einfluß von 0,5 (1) und 1,2 (2) $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ FG Adenosinlösung auf die Herzfrequenz [bpm] und die Fließgeschwindigkeit [mm s^{-1}] in verschiedenen Gefäßen bei intakten (A) und denervierten (B) Hummern. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

7.2 Konzentrationsabhängiger Vergleich der Fließgeschwindigkeit in der A. posterior und der A. lateralis

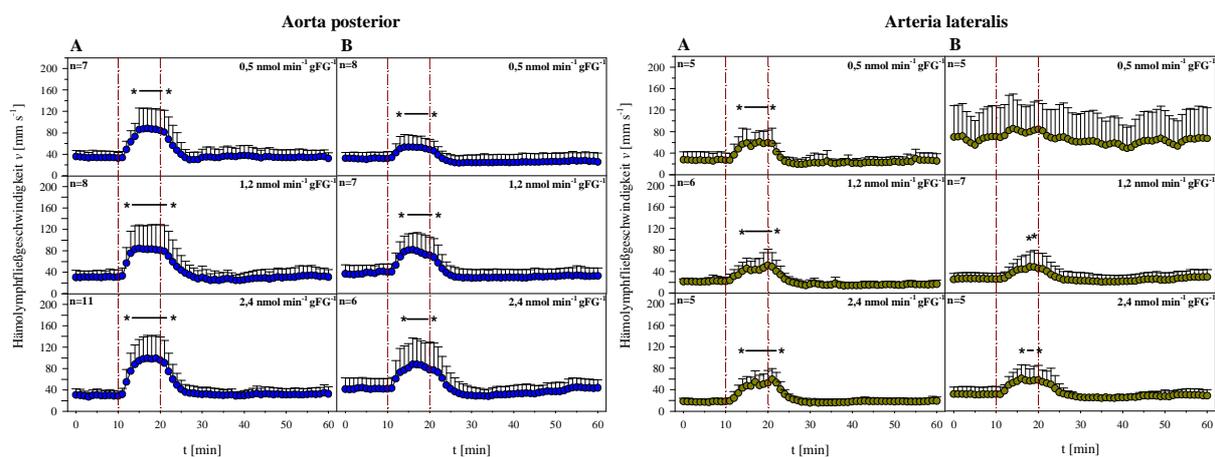


Abb. 7.2: Vergleich der Hämolympfbließgeschwindigkeit [mm s^{-1}], in der Aorta posterior und der A. lateralis, intakter (A) und denervierter (B) Amerikanischer Hummer. Nach einem zehnmütigen Vorlauf wurden Adenosinlösungen ($0,5 - 2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ FG) über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere. In der rechten oberen Ecke ist die jeweils eingesetzte Konzentration angegeben.) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

7.3 AMP-Infusion

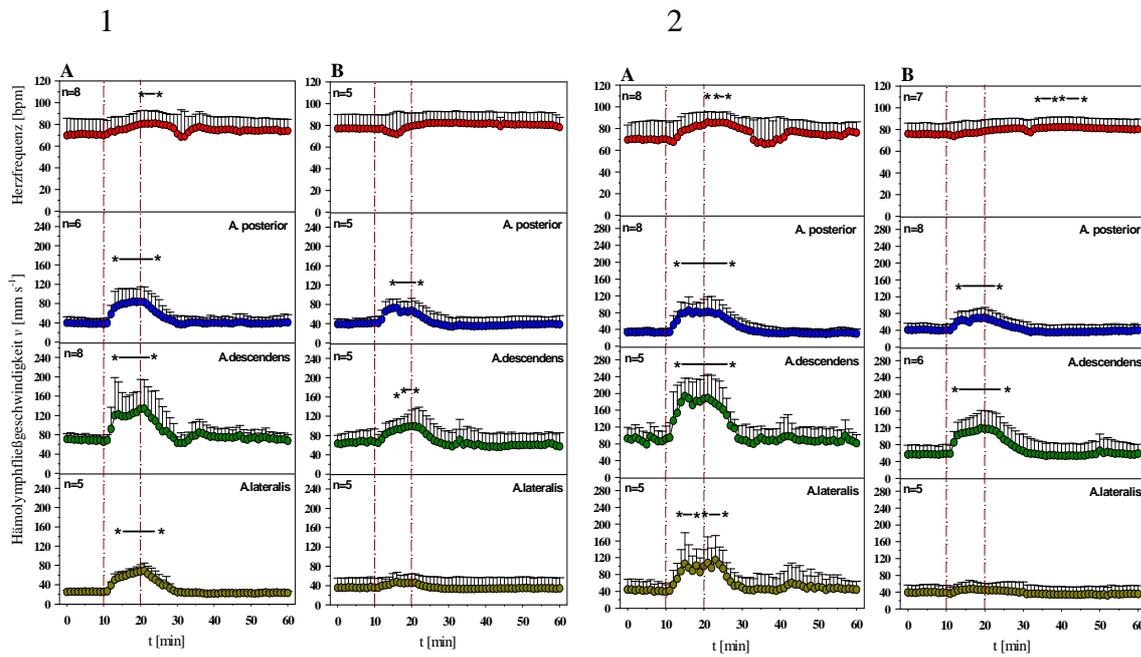


Abb. 7.3: Einfluß von 0,5 (1) und 1,2 (2) $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$ AMP-Lösung auf die Herzfrequenz [bpm] und die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [mm s^{-1}] in verschiedenen Gefäßen bei intakten (A) und denervierten (B), *Homarus americanus*. Nach einem zehnminütigen Vorlauf wurden 0,5 und 1,2 $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$ AMP-Lösung über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

7.4 Konzentrationsabhängiger Vergleich der Fließgeschwindigkeit in der A. posterior und der A. lateralis

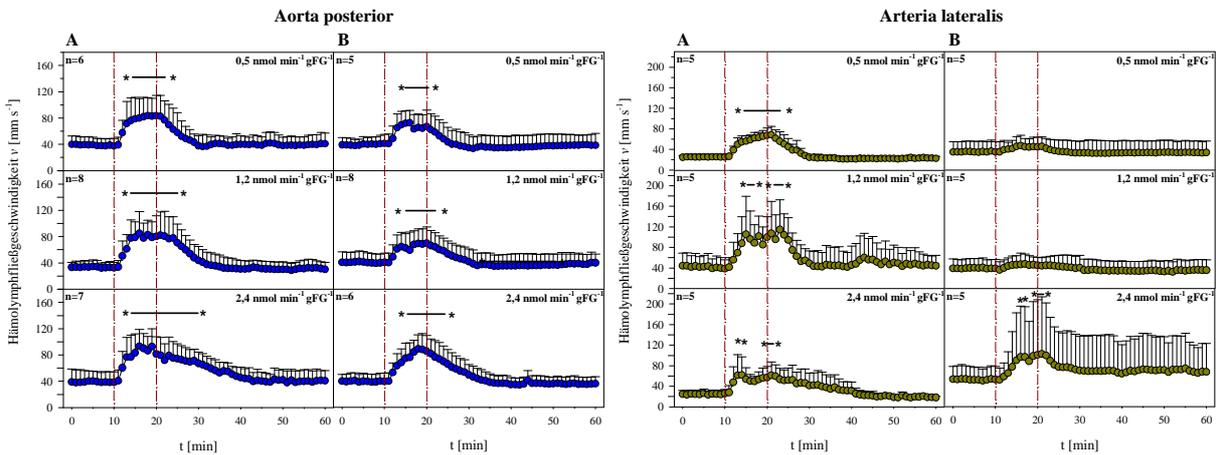


Abb. 7.4: *In vivo* Vergleich der Hämolympffließgeschwindigkeit [mm s^{-1}], in der Arteria descendens, intakter (A) und denervierter (B) Hummer, unter Einfluß verschieden konzentrierter AMP-Lösungen. Nach einem zehnminütigen Vorlauf wurden AMP-Lösungen mit Konzentrationen von 0,5, 1,2 und 2,4 $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$ über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere angegeben. In der rechten oberen Ecke ist die jeweils eingesetzte Konzentration angegeben.) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

7.5 ADP-Infusion

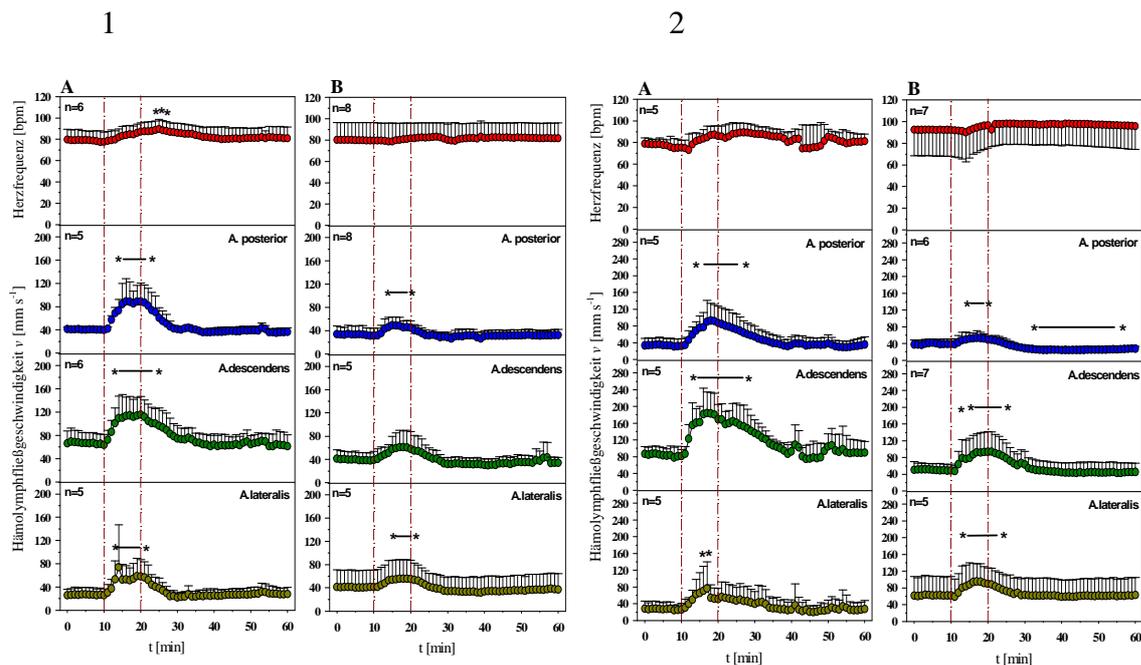


Abb. 7.5: Der Einfluß von 0,5 (1) und 1,2 (2) nmol min⁻¹ g⁻¹FG ADP-Lösung auf die Herzfrequenz [bpm] und die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [mm s⁻¹] in verschiedenen Gefäßen bei intakten (A) und denervierten (B) Amerikanischen Hummern, *Homarus americanus*. Nach einem zehnmütigen Vorlauf wurden 0,5 und 1,2 nmol min⁻¹ g⁻¹FG ADP-Lösung über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW ± SD; n = Anzahl der Versuchstiere angegeben.) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

7.6 Konzentrationsabhängiger Vergleich der Fließgeschwindigkeit in der A. posterior und der A. lateralis

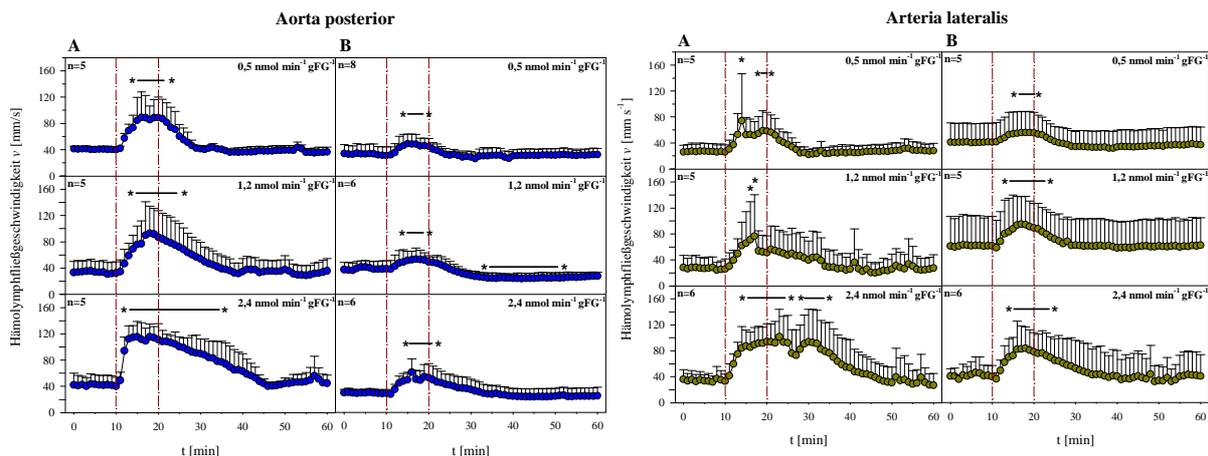


Abb. 7.6: *In vivo* Vergleich der Hämolympf-fließgeschwindigkeit [mm s⁻¹], in der Aorta posterior und der Arteria lateralis, intakter (A) und denervierter (B) Amerikanischer Hummer, unter Einfluß verschieden konzentrierter ADP-Lösungen. Nach einem zehnmütigen Vorlauf wurden ADP-Lösungen mit Konzentrationen von 0,5, 1,2 und 2,4 nmol min⁻¹ g⁻¹FG über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW ± SD; n = Anzahl der Versuchstiere angegeben. In der rechten oberen Ecke ist die jeweils eingesetzte Konzentration angegeben.) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

7.7 ATP-Infusion

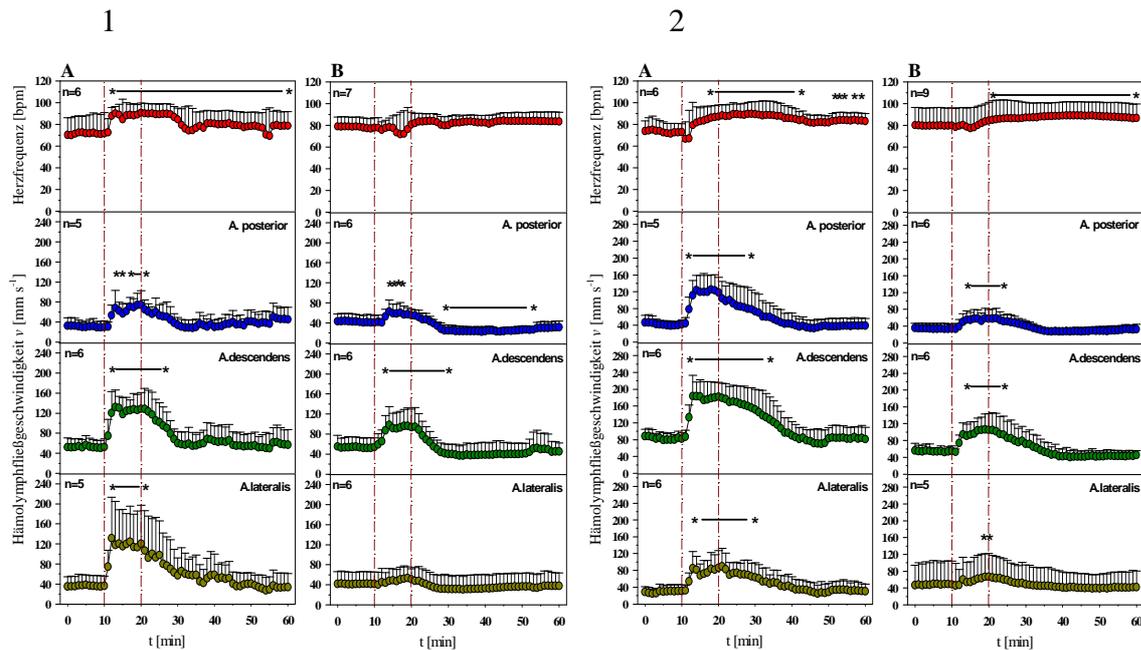


Abb. 7.7: Einfluß von 0,5 (1) und 1,2 (2) $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$ ATP-Lösung auf die Herzfrequenz [bpm] und die Fließgeschwindigkeit der Hämolymphe [mm s^{-1}] in verschiedenen Gefäßen bei intakten (A) und denervierten (B) Amerikanischen Hummer. Nach einem zehnminütigen Vorlauf wurden $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$ ATP-Lösung über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere angegeben.) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

7.8 Konzentrationsabhängiger Vergleich der Fließgeschwindigkeit in der A. posterior und der A. lateralis

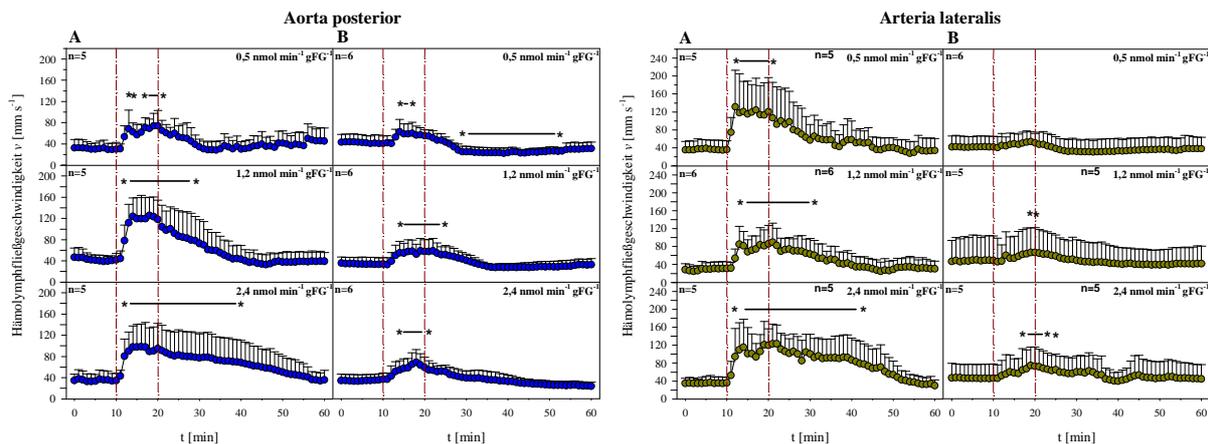


Abb. 7.8: *In vivo* Vergleich der Hämolympffließgeschwindigkeit [mm s^{-1}], in der Aorta posterior und der Arteria lateralis, intakter (A) und denerviertes (B) Hummer, *Homarus americanus*, unter Einfluß verschieden konzentrierter ADP-Lösungen. Nach einem zehnminütigen Vorlauf wurden ADP-Lösungen mit Konzentrationen von 0,5, 1,2 und 2,4 $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{FG}$ über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere angegeben. In der rechten oberen Ecke ist die jeweils eingesetzte Konzentration angegeben.) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

7.9 Infusion von Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen

7.9.1 Herzfrequenz

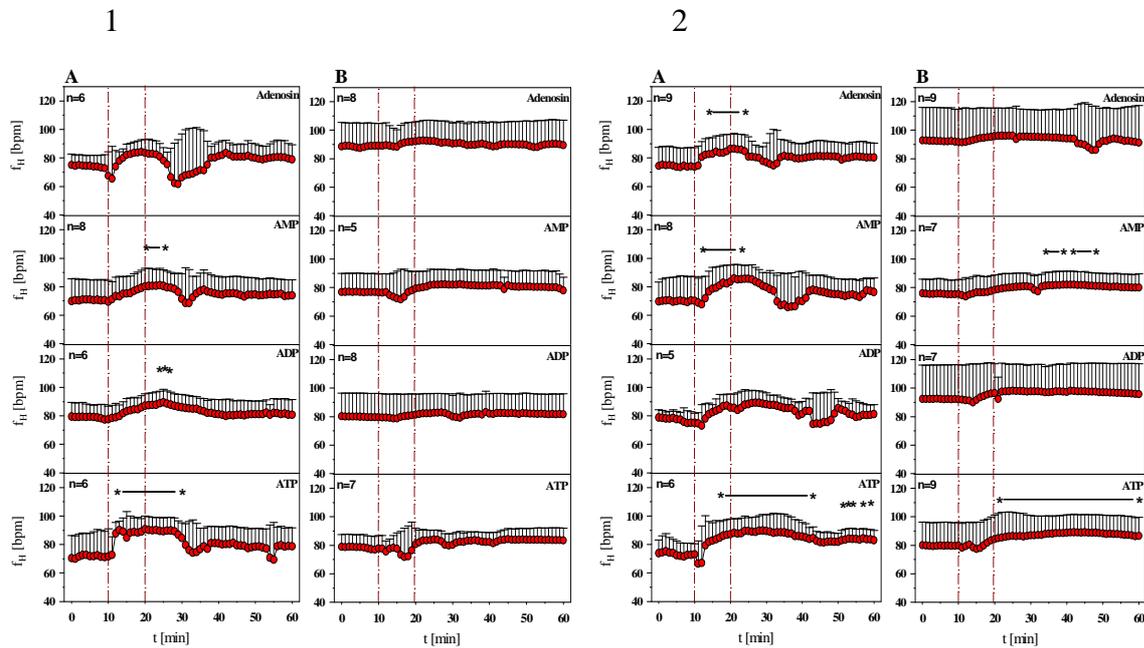


Abb. 7.9: *In vivo* Vergleich der Herzfrequenz [bpm] bei intakten (A) und denervierten (B) Tieren, unter dem Einfluß von Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$]. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

7.9.2 Fließgeschwindigkeit in der Aorta posterior

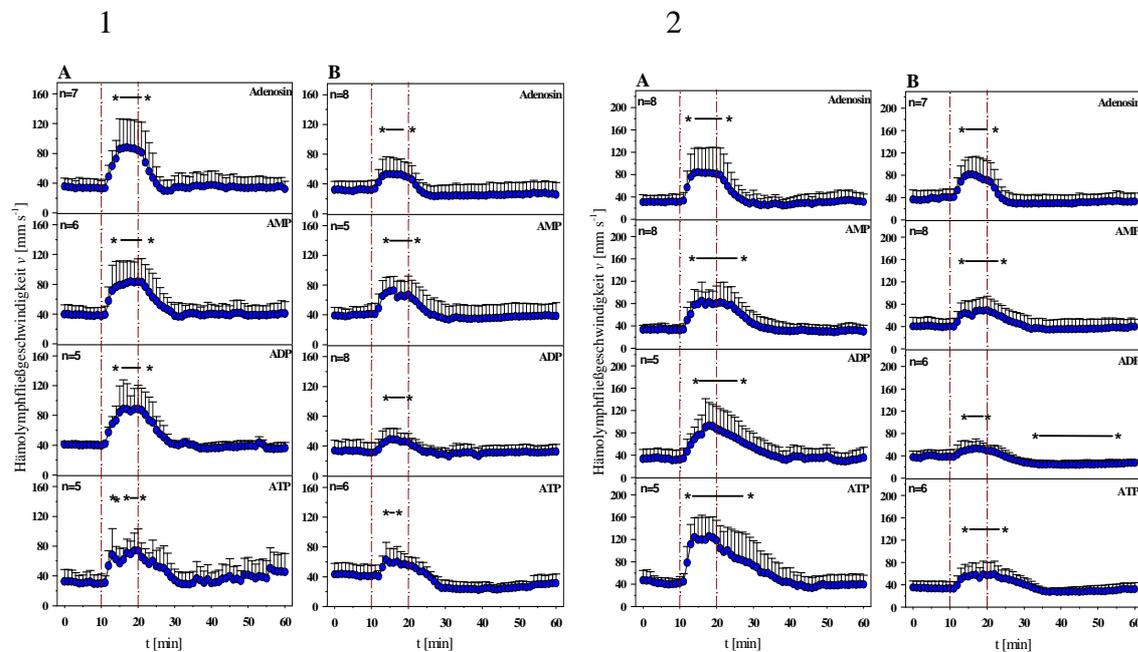


Abb. 7.10: Vergleich der Hämolympffließgeschwindigkeit [mm s^{-1}], in der Aorta posterior, intakter (A) und denervierter (B) Hummer, unter Einfluß von Adenosin- und Adeninnukleotidlösungen [$0,5$ (1) und $1,2$ (2) $\text{nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$]. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

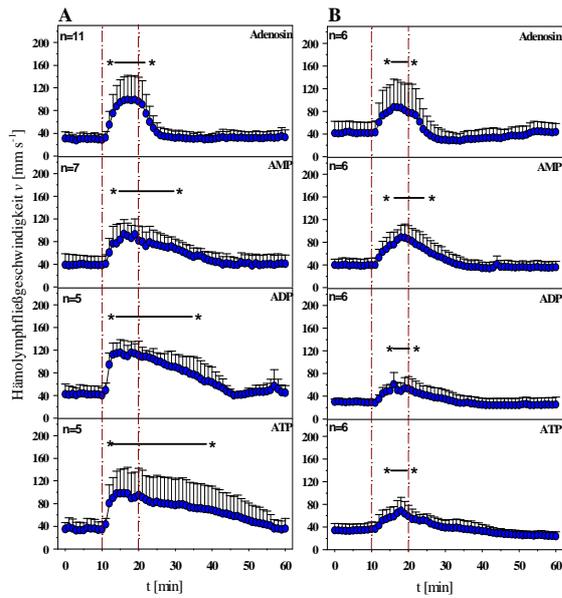


Abb. 7.11: Vergleich der Hämolympffließgeschwindigkeit [mm s^{-1}], in der Arteria posterior, intakter (A) und denervierter (B) Amerikanischer Hummer, unter Einfluß von Adenosin- und Adeninucleotidlösungen. Nach einem zehnmütigen Vorlauf wurden Adenosin-, AMP-, ADP- und ATP-Lösungen [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$] über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

7.9.3 Fließgeschwindigkeit in der Arteria descendens

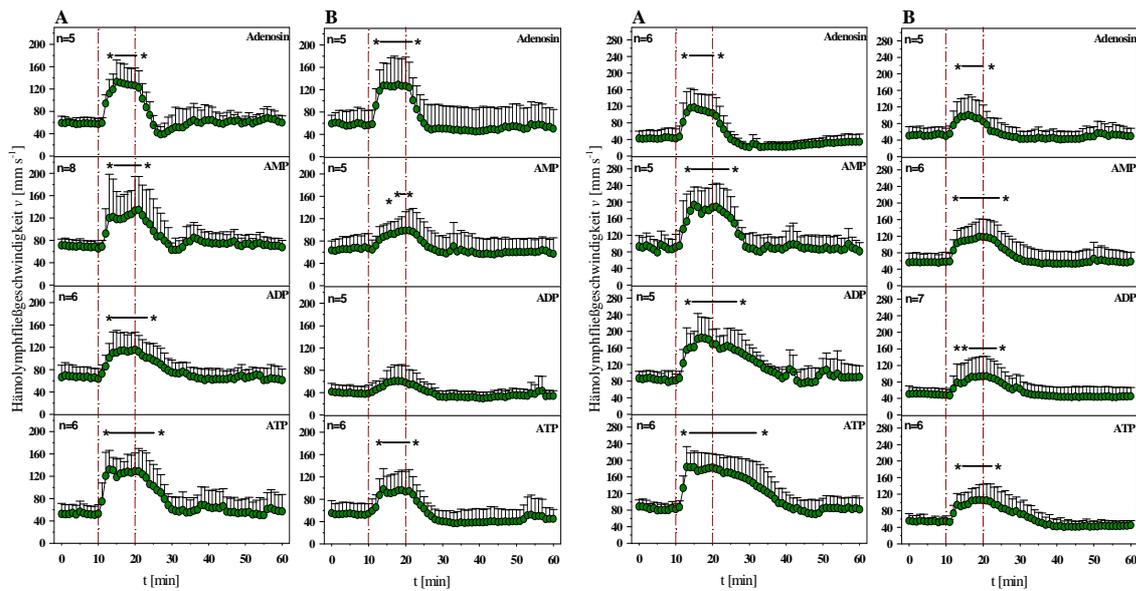


Abb. 7.12: Vergleich der Hämolympffließgeschwindigkeit [mm s^{-1}], in der Arteria descendens, intakter (A) und denervierter (B) Amerikanischer Hummer, *Homarus americanus* unter Einfluß von Adenosin- und Adeninucleotidlösungen. Nach einem zehnmütigen Vorlauf wurden Adenosin-, AMP-, ADP- und ATP-Lösungen [$0,5$ (1) und $1,2$ (2) $\text{nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FG}$] über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

7.9.4 Fließgeschwindigkeit in der Arteria lateralis

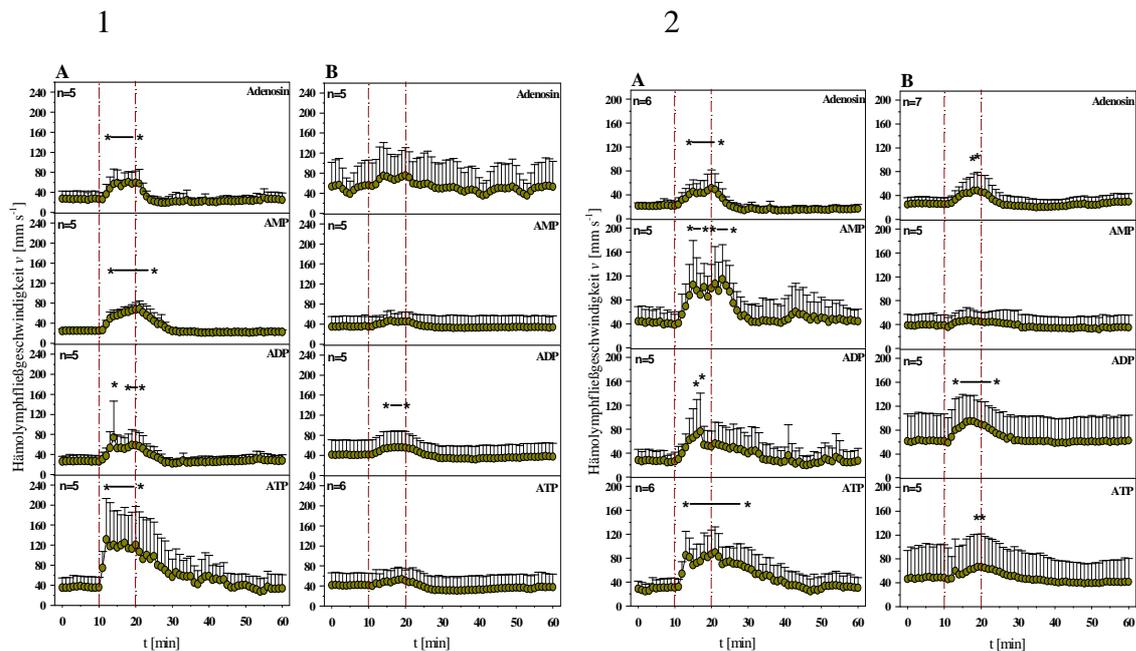


Abb. 7.13: Vergleich der Hämolympffließgeschwindigkeit [mm s^{-1}], in der Arteria lateralis, intakter (A) und denervierter (B) Hummer, *Homarus americanus* unter Einfluß von Adenosin- und Adeninukleotidlösungen. Nach einem zehnmütigen Vorlauf wurden Adenosin-, AMP-, ADP- und ATP-Lösungen [$0,5$ (1) und $1,2$ (2) $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{FG}$] über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

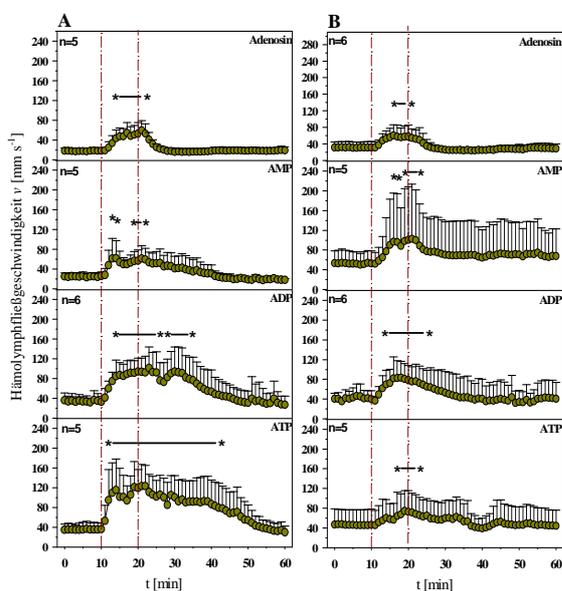


Abb. 7.14: Vergleich der Hämolympffließgeschwindigkeit [mm s^{-1}], in der Arteria lateralis, intakter (A) und denervierter (B) Amerikanischer Hummer, *Homarus americanus*, unter Einfluß von Adenosin- und Adeninukleotidlösungen. Nach einem zehnmütigen Vorlauf wurden Adenosin-, AMP-, ADP- und ATP-Lösungen [$2,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{FG}$] über einen Zeitraum von zehn Minuten infundiert. (MW \pm SD; n = Anzahl der Versuchstiere) * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zum Kontrollwert.

Ich danke Herrn Professor Dr. Manfred K. Grieshaber für seine großzügige Förderung und sein Interesse an dieser Arbeit. Seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung haben zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Professor Dr. Christopher R. Bridges möchte ich für die Übernahme des Korreferats danken.

Für den anregenden Aufenthalt am Departement of Biological Science der University of Calgary, Kanada und für seine Unterstützung, die weit über den Aufenthalt hinausging, möchte ich Herrn Professor Dr. Jerrel L. Wilkens danken. Auf seine herzliche Art und Weise hat er mir die Welt der Crustaceen nicht nur im wissenschaftlichen sondern auch im kulinarischen Sinne näher gebracht.

Meiner Landlady, Gordana Ristic', möchte ich für ihre Fürsorge während meines Kanada Aufenthaltes danke sagen.

Herrn Dr. Klaus Unfried vom Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF) möchte ich für die Bereitstellung von Messzeit an der HPLC-EC danken. Mein Dank gilt auch Dr. Peter Voß, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Ebenfalls möchte ich Ullrich Sydlik danken, der diesen Kontakt erst ermöglichte.

Meinen Kolleginnen -en und Freunden aus dem Institut möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und die schöne Arbeitsatmosphäre danken, insbesondere Jeannette van de Meer für ihre ständige Diskussionsbereitschaft zum Thema „Krebs“ - Forschung.

Meiner Mutter gilt besonderer Dank. Während meines Studiums hat sie mich ohne wenn und aber unterstützt.

Meiner Freundin Nadine danke ich für ihre Bemühungen diese Arbeit einen Erfolg werden zu lassen und dafür, daß sie mir dabei in jeder Hinsicht zur Seite stand.

Der „Deutschen Forschung Gemeinschaft“ gilt mein Dank für die Förderung dieser Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs „ Molekulare Physiologie“.