



Gereon Maurer (Autor)

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

Gereon Maurer

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



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1849>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

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).

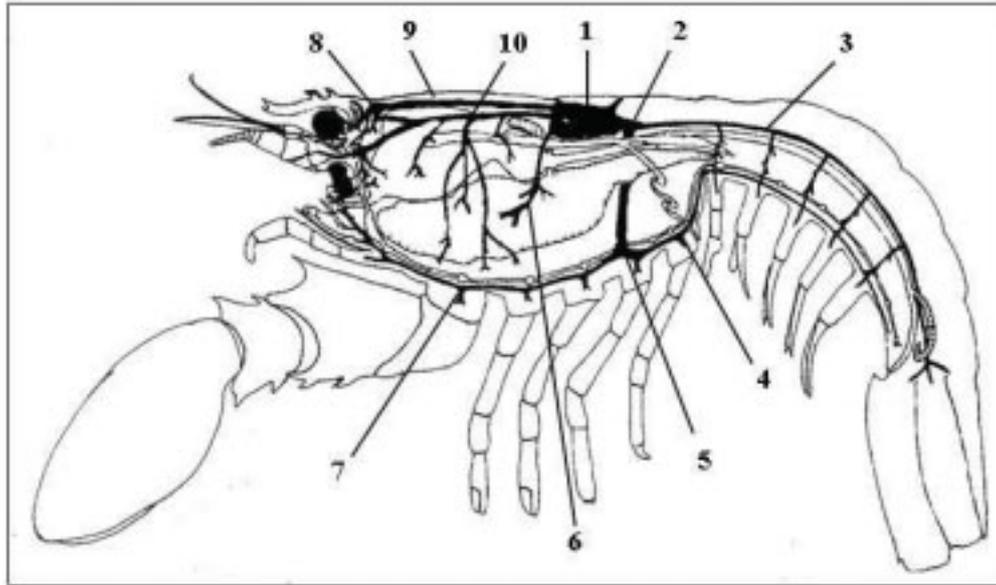


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des offenen Blutkreislaufsystems des Amerikanischen Hummers, *Homarus americanus*. 1. Herz mit Ostien, 2. Bulbus arteriosus, 3. Aorta posterior, 4. kaudale Arteria subneuralis, 5. Arteria descendens, 6. linke Arteria hepatica, 7. rostrale Arteria subneuralis, 8. Cor 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 Hämolympphauswurf 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 protractus* 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 beschritten 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 Adenosingehaltes 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. (Tonronto, 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.