

Thema: Der gegensätzliche Effekt von ATP und seinen Abbauprodukten  
auf die endotheliale Schrankenfunktion in isolierten Endothelzell-  
Monolayern und in der Mikrozirkulation des Rattenmesenteriums

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Lutz Becker  
aus Haiger

Gießen im Jahr 2011

Aus dem Zentrum für Innere Medizin,  
Medizinische Klinik I,  
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Gießen  
Direktor: Prof. Dr.med. H.-H. Tillmanns

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Reinhard K. Voss
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau

Tag der Disputation: 29. November 2012

Meiner Schwester, meiner Mutter  
und meinem verstorbenen Vater in Liebe und Dankbarkeit.

Oh tell me Lord how it could be,  
That though our cells make ATP,  
    It's not all used for energy,  
But sometimes is secreted free.  
    It puzzles you, it puzzles me,  
While Geoffrey Burnstock smiles with glee  
    At the many roles of ATP.

*(von Samuel c. Silverstein - während eines Treffens der „New York Academy of Sciences“ unter dem Titel „The Biological Actions of Extracellular ATP“ im Jahre 1989)*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK.....	1
1.2 DER NUTZEN DER INTRAVITALMIKROSKOPIE.....	2
1.3 ATP – LEDIGLICH INTRAZELLULÄRER ENERGIETRÄGER?.....	3
1.4 EXTRAZELLULÄRE NUKLEOTIDE.....	4
1.4.1 DIE URSPRÜNGE.....	4
1.4.2 VORKOMMEN.....	5
1.4.3 BEDINGUNGEN, UNTER DENEN ATP FREIGESETZT WIRD.....	5
1.5 EKTONUKLEOTIDASEN – DAS SCHICKSAL EXTRAZELLULÄREN ATPs.....	6
1.5.1 APYRASE/CD39 – KLONIERUNG EINER LÖSLICHEN ECTO-ATPASE.....	7
1.5.2 FUNKTION UND KLINISCHE RELEVANZ VON CD39.....	8
1.5.3 ARL 67156 – EIN EKTONUKLEOTIDASE-INHIBITOR.....	9
1.6 REZEPTOREN FÜR PURINE UND PYRIMIDINE – P1- UND P2X/P2Y-REZEPTOREN.....	9
1.6.1 ADENOSIN/P1-REZEPTOREN.....	10
1.6.2 P2-REZEPTOREN.....	11
1.6.2.1 P2X-Rezeptoren.....	11
1.6.2.2 P2Y-Rezeptoren.....	11
1.7 EXTRAZELLULÄRES ATP UND SEINE VIELFÄLTIGEN WIRKUNGEN IM ORGANISMUS.....	12
1.7.1 Kardiovaskuläres System.....	12
1.7.2 Thrombozytenaggregation und Hämostase.....	13
1.7.3 Inflammation.....	14
1.7.4 Schmerzentstehung und –wahrnehmung.....	14
1.7.5 Zytotoxizität und Apoptose.....	14
1.7.6 Zellzyklus.....	15
1.7.7 Neurologie.....	15
1.7.8 Respirationstrakt.....	15
1.7.9 Endokrinologie.....	15
1.7.10 Sinnesorgane.....	16
1.8 KLINISCHE RELEVANZ UND THERAPEUTISCHER NUTZEN.....	16
1.9 DAS GEFÄßENDOTHEL UND SEINE FUNKTION ALS BLUT-GEWEBE-SCHRANKE.....	18
1.10 MIKROVASKULÄRE PERMEABILITÄT.....	19
1.11 MEDIATOREN MODULIEREN DIE ENDOTHELIALE SCHRANKENFUNKTION.....	21
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>23</b>
2.1 MATERIAL.....	23
2.1.1 HERSTELLUNG DER SUBSTANZEN.....	30
2.2 METHODIK ZUR BESTIMMUNG DER <i>IN VITRO</i> -MAKROMOLEKÜLPERMEABILITÄT.....	32
2.2.1 ZELLKULTUR.....	33
2.2.1.1 HERKUNFT DER ENDOTHELZELLEN.....	33
2.2.1.2 ISOLATION UND KULTIVIERUNG.....	34

2.2.1.3 ZELLIDENTIFIKATION.....	34
2.2.2 EXPERIMENTELLE BEDINGUNGEN .....	34
2.3 METHODIK ZUR BESTIMMUNG DER <i>IN VIVO</i> -MAKROMOLEKÜLPERMEABILITÄT.....	35
2.3.1 VERSUCHSBEDINGUNGEN.....	35
2.3.2 PROBLEMSTELLUNGEN .....	35
2.3.3 EXPERIMENTELLER ABLAUF .....	37
2.3.3.1 VORBEHANDLUNG .....	37
2.3.3.2 NARKOSE DES VERSUCHSTIERES .....	38
2.3.3.3 PRÄPARATION .....	38
2.3.3.4 EQUILIBRIUM.....	41
2.3.3.5 DURCHGEFÜHRTE MESSUNGEN.....	41
2.3.4 INTRAVITALMIKROSKOPIE UND VIDEODOKUMENTATION .....	42
2.3.4.1 MIKROSKOP UND HARDWARE-KONFIGURATION .....	42
2.3.4.2 TRANSILLUMINATION (DURCHLICHT-MIKROSKOPIE).....	42
2.3.4.3 EPIILLUMINATION (FLUORESZENZ-MIKROSKOPIE) .....	43
2.3.5 AUSWERTUNG DER VIDEOAUFNAHMEN.....	43
2.3.5.1 ERMITTLUNG DER ENDOTHELIALEN SCHRANKENSTÖRUNG .....	43
2.3.5.2 DEFINITION DER GRAUWERTSCHWELLE.....	43
2.3.5.3 GRAUWERTANALYSE .....	44
2.3.6 MESSUNG DER EXTRAZELLULÄREN ATP-KONZENTRATION.....	44
2.4 TIERHALTUNG UND -BEHANDLUNG.....	45
2.5 DATENVERARBEITUNG UND STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	45
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>46</b>
3.1 DIE ENDOTHELIALE SCHRANKENFUNKTION IN ISOLIERTEN ENDOTHELZELLSCHICHTEN ....	46
3.1.1 DER KONZENTRATIONSABHÄNGIGE EFFEKT VON ATP AUF DIE PERMEABILITÄT .....	46
3.1.2 MODULATION DER ATP-WIRKUNG AUF DIE ENDOTHELIALE PERMEABILITÄT .....	48
3.2 DIE ENDOTHELIALE SCHRANKENFUNKTION IN MIKROGEFÄßEN DER RATTE .....	51
3.2.1 MODULATION DER ATP-WIRKUNG AUF DIE ENDOTHELIALE PERMEABILITÄT <i>IN VIVO</i> .....	51
3.2.2 DIE BESTIMMUNG DES MYOKARDIALEN WASSERGEHALTES NACH VERSUCHENDE .....	53
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>55</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>66</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>68</b>
<b>7. LITERATUR .....</b>	<b>69</b>
<b>8. BISHERIGE VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>81</b>
<b>9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>82</b>
<b>10. DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>83</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung in die Thematik

Im Rahmen akuter oder systemischer Entzündungsreaktionen, unabhängig ob infolge einer Infektion, eines Traumas oder einer Ischämie mit anschließender Reperfusion, kommt es zu komplexen Interaktionen zwischen den im Blut zirkulierenden Bestandteilen, sowohl den zellulären (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten) als auch den plasmatischen Faktoren (Mediatoren) und den das Gefäßsystem auskleidenden Endothelzellen. Jede dieser genannten Veränderungen hat letztlich einen Einfluss auf die endotheliale Integrität und somit die Barrierefunktion der gefäßauskleidenden Zellen. Die Folge ist eine endotheliale Schrankenstörung mit Zunahme der Gefäßpermeabilität (Menger et al. 1993; Lush et al. 2000). Einwandernde Entzündungszellen und die Ausschüttung zahlreicher Mediatoren und Zytokine im Sinne einer körpereigenen Abwehrreaktion sowie der Austritt von Plasma in das perivaskuläre Gewebe mit der Folge eines Ödems und zunehmender Hypoxie sind Faktoren, die diese Entzündungsreaktionen aufrecht erhalten und somit zu Störungen der Mikro- und Makrozirkulation führen (Jochum et al. 1989). Organdysfunktionen bis hin zum Multiorganversagen stehen am Ende der Entwicklung eines lebensbedrohlichen Krankheitsbildes.

Neben Mediatorsystemen (z.B. Komplementsystem), Entzündungszellen (z.B. Leukozyten) und freigesetzten Zytokinen (z.B. TNF- $\alpha$ , Interleukine) spielen ebenso extrazelluläre Nukleotide, vor allem ATP, eine entscheidende Rolle und sind Gegenstand langjähriger Forschungsarbeit auf dem Gebiet der Mikrozirkulation. Der Einfluss von extrazellulärem ATP und dessen Abbauprodukten ADP, AMP und Adenosin auf die endotheliale Permeabilität wurde schon in vielen Studien dargestellt, jedoch auch immer wieder kontrovers behandelt (Burnstock et al. 1983; Cronstein 1994; Noll et al. 1999; Erlinge 2001).

Durch die Entdeckung und Klonierung von Nukleotid-Rezeptoren in der zweiten Hälfte des vergangenen Jahrhunderts und dem gezielten Einsatz spezifischer Agonisten bzw. Antagonisten erlangte man immer weitreichendere Erkenntnisse in der Wirkungsweise extrazellulärer Nukleotide auf verschiedenste Organsysteme (Burnstock 1978; Abbraccio et al. 1998). Aufgrund der sehr schnellen Hydrolyse extrazellulären ATPs durch zellständige und lösliche Ekto- bzw. Exonukleidasen

(Zimmermann 1992; Plesner 1995) war es jedoch lange Zeit schwierig, die beobachteten Effekte gezielt den einzelnen Nukleotiden zuzuordnen.

Gündüz et al. beschrieben *in vitro* den protektiven Effekt von ATP auf die endotheliale Permeabilität (Gündüz et al. 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun die permeabilitätssteigernden bzw. –senkenden Wirkungen einzelner Nukleotide am Modell kultivierter Endothelzellschichten und in Mesenterialgefäßen *in situ* herausgearbeitet.

## **1.2 Der Nutzen der Intravitalmikroskopie**

Die Verwendung der Intravitalmikroskopie als Instrument zur Beobachtung von komplexen Interaktionen auf zellulärer, vaskulärer oder gar molekularer Ebene geht zurück auf Waller, der 1846 erstmals die Leukozytenpassage in der Mikrozirkulation beschrieb (Waller 1846). Fast 80 Jahre später kamen transparente Kammern zur nichtinvasiven Beobachtung der Wundheilung zum Einsatz (Sandison 1924), deren Vorteil darin bestand, lebende, nicht narkotisierte Tiere über einen wesentlich längeren Zeitraum als bisher untersuchen zu können. Nicht unerhebliche Schäden, die infolge von Narkose oder Präparation auftraten, blieben demnach aus (Algire 1943). Gerade die Narkotisierung des Versuchstieres mit Pentobarbital hatte einen deutlichen Effekt auf die Mikrozirkulation, indem es die Bildung arterio-venöser Shunts förderte, was zu einer Reduktion der Kapillardichte und damit einer verminderten Sauerstoffversorgung führte (Franke et al. 1982). Enflurane oder Halothan hatten dagegen keinen negativen Einfluss auf die mikrovaskuläre Strombahn (Franke et al. 1983). Schließlich erwies sich das Mesenterium aufgrund seines einfachen Zuganges sowie seiner Transparenz als hervorragendes Objekt zur Intravitalmikroskopie (Zweifach 1973). Durch immer bessere mikrochirurgische Techniken erweiterte sich das Untersuchungsspektrum stetig. Gehirn, Wirbelsäule, Herz, Lunge, Leber, Pankreas, Darm, Niere, Lymphknoten und Knochenmark wurden der Intravitalmikroskopie zugänglich gemacht. Muskulatur und Haut konnten sogar am wachen Versuchstier über einen Zeitraum von mehreren Wochen untersucht werden. Die Verfügbarkeit zahlreicher fluoreszenz-markierter Makromoleküle verschiedener Molekulargröße, die *in vivo* verabreicht werden können und nur einen geringen Einfluss auf makro- und mikrohämodynamische Parameter haben, erweiterte die Möglichkeiten der Intravitalmikroskopie von der einfachen morphologischen Untersuchung hin zur Beurteilung komplexer physiologischer und



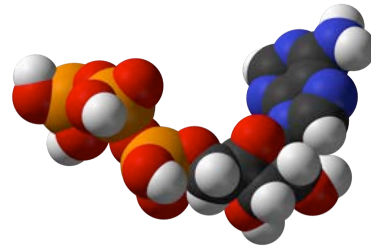
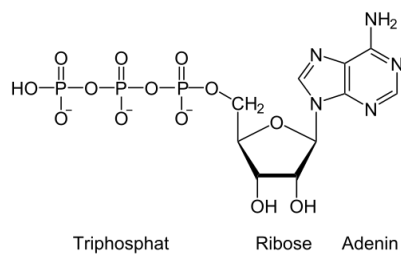
pathologischer Vorgänge (Menger et al. 1993; Nolte et al. 1995; Seiffge et al. 1995). Veränderungen mikrohämodynamischer Parameter wie die erythrozytäre und leukozytäre Flussgeschwindigkeit, der Gefäßdurchmesser, Hämatokrit oder die Kapillardichte, aber auch funktionelle Parameter wie Veränderungen der Gefäßpermeabilität, Endothelzellintegrität und –vitalität, zellulärer Transport und Metabolismus können beobachtet werden, was die Intravitalmikroskopie zu einem verlässlichen wissenschaftlichen Instrument für die Beobachtung der Mikrozirkulation im Tierversuch macht.

Mit der Transillumination als lichtmikroskopischem Verfahren, aber vor allem der Epiillumination zur Fluoreszenz-Mikroskopie kommen zwei verschiedene optische Verfahren bei der Intravitalmikroskopie zur Anwendung. Während der Transillumination die Beobachtung des Gefäßdurchmessers, der Kapillardichte und des Blutflusses vorbehalten ist, erlaubt die Epiillumination die detaillierte Analyse der vaskulären Permeabilität (Menger et al. 1993). Die heutige Technik ermöglicht dabei eine Darstellung mit bis zu 1000facher Vergrößerung und die Verwendung der Videodokumentation und der nachgeschalteten, computergestützten Bildanalyse-systeme macht eine Quantifizierung und statistische Auswertung möglich (Menger et al. 1993; Klyscz et al. 1997)

So stellt die Intravitalmikroskopie, im Gegensatz zu den experimentell angewandten Techniken der indirekten Messung der Gewebepfusion, die einzige Methode zur direkten Beobachtung der einzelnen Segmente der Mikrozirkulation von Haut, quergestreifter Muskulatur, inneren Organen und viszeraler Strombahn im wachen oder narkotisierten Tier dar (Klyscz et al. 1997; Szabo et al. 2006) und schafft somit eine Brücke von *in vitro*-Beobachtungen hin zu deren potentieller Relevanz *in vivo*.

### **1.3 ATP – lediglich intrazellulärer Energieträger?**

Adenosintriphosphat (ATP) ist ein Nukleotid und besteht aus der Pentose Ribose, der Base Adenin und drei Phosphatresten (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Darstellung von ATP als Strukturformel sowie als dreidimensionales Modell.

Ursprünglich war ATP lediglich aufgrund seiner Rolle als Energieträger im Zellstoffwechsel bekannt. In der Atmungskette der Mitochondrien findet eine ständige Regeneration hydrolysierten ATPs statt. Eine einzelne Zelle ist mit etwa einer Milliarde ATP-Molekülen ausgestattet, die jeweils einige tausend Mal pro Tag hydrolysiert und wieder phosphoryliert werden. Eine eigentliche de-novo-Synthese von Nucleotiden findet zwar ebenso intrazellulär statt, die Hauptmenge an vorhandenem ATP entsteht jedoch aus der enzymatischen Rephosphorylierung seiner Abbauprodukte ADP, AMP und Adenosin (Horn et al. 2002).

## 1.4 Extrazelluläre Nucleotide

### 1.4.1 Die Ursprünge

Im Jahre 1929 entdeckten Drury und Szent-Gyorgyi erstmalig extrazelluläres Vorkommen von Nucleotiden und Nucleosiden (Drury et al. 1929). In den 50er-Jahren wurde die Freisetzung von Adenosintriphosphat aus sensorischen Nerven beschrieben und dessen mögliche Rolle als Neurotransmitter im Verlauf diskutiert (Holton et al. 1953; Burnstock 1972).

In der darauffolgenden Zeit weckte dieses Forschungsgebiet das Interesse vieler Arbeitsgruppen und führte zur Erarbeitung zahlreicher Erkenntnisse hinsichtlich der Wirkungsweise extrazellulärer Nucleotide auf die verschiedensten Organsysteme. Durch die Entdeckung und spätere Klonierung spezifischer Purin- und Pyrimidinrezeptoren (P1- und P2-Rezeptoren) (Burnstock 1978; Ralevic et al. 1998) und durch den Einsatz selektiver Rezeptor-Agonisten und –Antagonisten sowie Ektonucleotidase-Hemmstoffen konnte man die physiologischen und pathophysiologischen Effekte immer gezielter den einzelnen Nucleotiden zuordnen.

Bis heute ist die Wirkungsweise extrazellulärer Nukleotide Gegenstand zahlreicher Studien und hat durch die Entwicklung neuer Medikamenten-Gruppen eine besondere Relevanz im klinischen Alltag erlangt.

#### **1.4.2 Vorkommen**

Unter normalen Bedingungen, d.h. im Gleichgewicht physiologischer Nukleotid-Freisetzung und basaler Abbau-Rate durch Ektonukleotidasen, liegt die Konzentration im Extrazellularraum je nach Zell-Typ zwischen 5 und 50 nM (Gordon 1986; Zimmermann 1992), kann jedoch unter pathophysiologischen Bedingungen mikromolare Mengen erreichen (Burnstock 1971). So entstehen beispielsweise sehr hohe Konzentrationen an ATP aufgrund von Zellyse, aber auch durch selektive Membranpermeabilität oder mittels Exozytose sekretorischer Vesikel (Green et al. 1950; Yegutkin et al. 2001). Da ATP zytosolisch in einer Konzentration von ca. 5 mM vorliegt, kann intrazelluläres ATP durch Sekretion oder in Folge von Zellschädigungen im extrazellulären Raum akkumulieren. Unter bestimmten experimentellen Bedingungen (z.B. standardisierte Inzisionen humaner Haut) können Konzentrationen von 0,2-20 mM erreicht werden (Born et al. 1984; Ryan et al. 1996).

#### **1.4.3 Bedingungen, unter denen ATP freigesetzt wird**

Zu einem sprunghaften Anstieg der Konzentration extrazellulären ATPs kommt es bei einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen.

Änderungen der Schubspannung, so wie sie unter physiologischen Bedingungen im Gefäßsystem bei jedem Stropuls auftreten, lösen eine ATP-Freisetzung aus (so etwas findet man auch an kultivierten Endothelzellen). In pathologisch veränderten Gefäßen, aber auch bei Hypertonie kommt es durch die erhöhte Schubspannung sowohl in Erythrozyten als auch in Endothelzellen zu einer Steigerung der ATP-Freisetzung. Dabei ist die Menge an freigesetztem ATP direkt proportional zur Schubspannung (Ando et al. 1988; Burnstock 1999b).

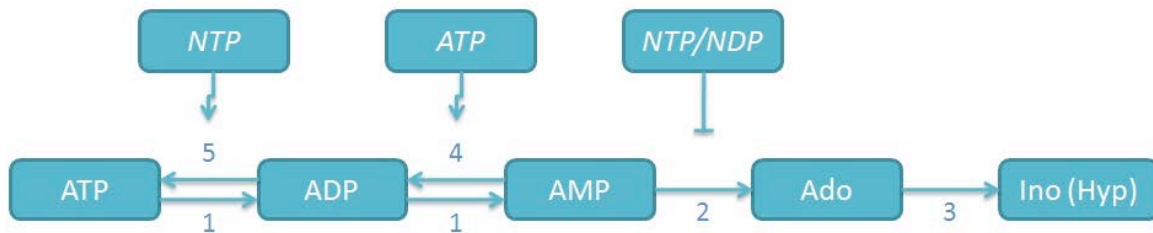
Ein weiterer wichtiger Auslöser ist das Vorhandensein hypoxischer und ischämischer Zustände (Williams et al. 1983). So wird unter diesen Bedingungen in Endothelzellen und in vaskulären Glattmuskelzellen (El Moatassim et al. 1992) sowie in Erythrozyten (Bergfeld et al. 1992), aber auch aus ischämischen Herz- und Skelettmuskelzellen (Clemens et al. 1981) verstärkt ATP freigesetzt. Desweiteren spielt die Degranulierung ATP-enthaltender Vesikel aus aktivierten Thrombozyten im Rahmen der Thrombogenese eine wichtige Rolle zur suffizienten Blutstillung (Gordon 1986).

Bei lokalen oder systemischen Entzündungsreaktionen bzw. Bedingungen, die mit einer Zellyse einhergehen, kommt es zu erhöhten Nukleotid-Konzentrationen im Extrazellularraum (Bodin et al. 1998). Aber auch im Rahmen immunologischer Reaktionen des Organismus kann ATP aus Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, aktivierten NK-Zellen, T-Helferzellen oder Mastzellen freigesetzt werden (Filippini et al. 1990; Marquardt et al. 1994). Zahlreiche Studien befassten sich mit dem Auftreten von ATP als Neurotransmitter im zentralen, peripheren und autonomen Nervensystem (White 1988; Silinsky et al. 1998). Man geht davon aus, dass ATP als sogenannter Kotransmitter neben den verschiedensten Transmittern aus sekretorischen Vesikeln freigesetzt wird und die nervale Antwort im synaptischen Spalt moduliert (Burnstock 1999a; Sneddon et al. 1999; Burnstock 2006). So erfolgt ein gemeinsames Auftreten von ATP mit Noradrenalin im sympathischen und mit Acetylcholin im parasympathischen Nervensystem (Westfall et al. 1990; Von Kügelgen et al. 1994). All diesen Freisetzungsmechanismen gemeinsam ist das generell auftretende Prinzip der „ATP-induzierten ATP-Freisetzung“ (Di Virgilio et al. 2001), wodurch extrazelluläres ATP seine eigene Freisetzung in den Extrazellularraum fördert.

### **1.5 Ektionukleotidasen – das Schicksal extrazellulären ATPs**

Aufgrund des Vorhandenseins membranständiger Ekto- oder löslicher Exonukleotidasen ist die Wirkungsdauer und –intensität des extrazellulären ATP erheblich eingeschränkt, da es sofort nach Freisetzung hydrolytisch in seine Abbauprodukte gespalten wird (Plesner 1995; Zimmermann et al. 2000).

Dieser großen Enzymfamilie der E-NTPDasen (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) gehören verschiedene, mehr oder weniger substratspezifische Enzyme an. Das Vorkommen dieser Enzyme wurde erstmalig in der Mitte des 20. Jahrhunderts beschrieben, der Begriff „ecto-ATPase“ erstmals von Engelhardt geprägt (Engelhardt 1957). Ecto-ATPasen kommen ubiquitär auf eukaryotischen Zellen vor und sind in der Lage, sowohl Nukleosidtri- als auch –diphosphate zu hydrolysieren, wohingegen Nukleosid-Monophosphate sowie reine Nukleoside (z.B. Adenosin) nicht zu ihren Substraten gehören. Der enzymatische Abbau des ATP sowie die katalytische Rephosphorylierung seiner Abbauprodukte sind schematisch dargestellt (Abb. 2).



**Abbildung 2:** Das Schema zeigt die Konversion extrazellulärer Nukleotide bis hin zu Adenosin (Ado), Inosin (Ino) bzw. Hypoxanthin (Hyp), sowie potentielle Rephosphorylierungsschritte. (1) NTPDase/CD39/Apyrase; (2) ecto-5'-Nucleotidase/CD73; (3) Adenosindeaminase; (4) Adenylatkinase; (5) NDP-Kinase; die vertikalen Pfeile bzw. Linien stellen aktivierende bzw. inhibierende Regulationsmechanismen dar (NTP = Nucleosidtriphosphat; NDP = Nucleosiddiphosphat)

So erfolgt die enzymatische Hydrolyse von ATP zu AMP unter anderem durch die Apyrase. Der Abbau des entstandenen Adenosinmonophosphates (AMP) zu Adenosin erfolgt nun nicht mehr durch die Apyrase (syn. CD39, ecto-ATPase), sondern durch das Enzym Ekto-5'-Nucleotidase (syn. CD73, 5'-NT) (Lüthje 1989; Zimmermann 1992). Ihre Aktivität führt zu einem Anstieg extrazellulären Adenosins verbunden mit einer abnehmenden Konzentration an ATP und ADP, wodurch es im Allgemeinen zu einer Steigerung der im Vergleich zum ATP und ADP gegensätzlichen bzw. antagonisierenden Effekte des Adenosins kommt.

Die Wirkung ausgeschütteten ATPs ist somit letztlich abhängig von der Menge freigesetzter Nucleotide in den Extrazellulärraum, ihrem Abbau durch spezifische Ektonucleotidasen, den Subtypen an Purinrezeptoren, die auf den Zellen exprimiert sind, deren Desensitivierungsraten und ihren intrazellulären Signalkaskaden bzw. ihren second messengers (Erlinge 2001).

### 1.5.1 Apyrase/CD39 – Klonierung einer löslichen ecto-ATPase

Im Rahmen der molekularen Klonierung einer Kartoffel-Apyrase zeigte sich, dass die Proteinsequenz dieses Enzyms ebenso in humanem CD39 vorzufinden ist (Handa et al. 1996). Bei CD39 handelt es sich um ein saures Glykoprotein mit zwei Transmembranregionen, die beide für die enzymatische Aktivität verantwortlich zu sein scheinen (Grinthal et al. 2006). Das Enzym hat eine Molekularmasse von 700-800 Da und ist funktionell ein Zelloberflächenprotein lymphoider Zellen, welches eine

bedeutende Rolle bei der Zellaktivierung und –adhäsion im Rahmen immunologischer Prozesse innehat (Kaczmarek et al. 1996). Es stellte sich jedoch heraus, dass CD39 ebenso ecto-ATPase-Aktivität besitzt. Die membranständige CD39 katalysiert den Abbau von extrazellulärem ATP direkt zu AMP (Heine et al. 1999) wohingegen die lösliche Apyrase in der Lage ist, ADP als Intermediärprodukt aus dem katalytischen Zentrum zu entlassen (Chen et al. 2001).

### **1.5.2 Funktion und klinische Relevanz von CD39**

Als membranständige oder lösliche Ektonukleotidase besteht die Funktion von CD39 im extrazellulären Abbau dort vorhandener Nukleotide.

Die wesentliche klinische Bedeutung von CD39 ist seine Rolle bei der Regulation der Thrombozytenaggregation (Marcus et al. 1997). Eine ebenfalls wichtige Funktion besitzt die lösliche Apyrase hinsichtlich Transplantatabstoßung und parasitärer Erkrankungen (Imai et al. 2000). Therapeutisches Potential besteht demnach auf dem Gebiet arteriosklerotischer Erkrankungen sowie der Therapie von Malaria und Schistosomiasis. Therapieansätze gibt es weiterhin in den klinischen Fachgebieten der Immunologie, Otologie, Nephrologie sowie bei onkologischen Erkrankungen und Epilepsie-Syndromen (Gendron et al. 2002).

Das thrombogene Potential von ADP im Rahmen der Thrombozytenaggregation ist seit einigen Jahren bekannt (Haslam et al. 1981). Aus dem Abbau extrazellulären ATPs entstandenes ADP induziert über spezifische thrombozytäre P2-Rezeptoren (siehe Kapitel 2.5) eine Formänderung der Thrombozyten, die Aktivierung von Fibrinogen-Rezeptoren und die abschließende Bildung eines okklusiven Thrombus (Hourani et al. 1994; Mills 1996).

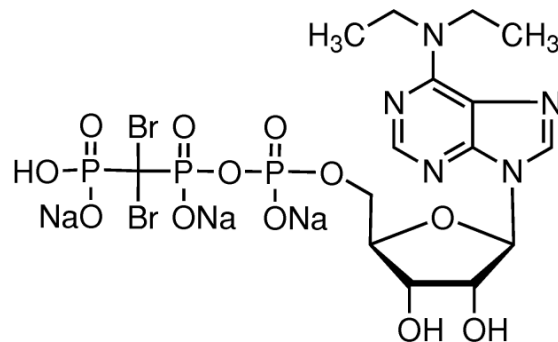
Durch den physiologischen Einfluss membranständiger CD39 bzw. durch die Verabreichung löslicher Apyrase kommt es nun zu einem beschleunigten Abbau extrazellulären ATPs und ADPs und damit zu einem Anstieg von AMP und letztlich auch von Adenosin. Somit fehlt einerseits ADP als wichtiger Mediator der Thrombozytenaggregation, andererseits kommt die anti-thrombogene Wirkung des Adenosins zum Tragen.

So führte der von Pinsky et al. beschriebene Einsatz von CD39 als Thrombozytenaggregationshemmer in der Therapie ischämischer Hirninfarkte bei Mäusen zu einer Verbesserung der postokklusiven Mikrozirkulation. CD39-knock-out-Mäuse wiesen eine deutlich erhöhte Infarkt-Rate auf. Im Vergleich zu bisher

verwendeten Therapeutika kam es unter CD39 zu keinem erhöhten Risiko intracerebraler Blutungen (Pinsky et al. 2002).

### 1.5.3 ARL 67156 – ein Ektonukleotidase-Inhibitor

Um die alleinige Wirkung extrazellulären ATPs gezielt beurteilen zu können, bedurfte es der Entwicklung selektiver Ektonukleotidase-Inhibitoren (Abb. 3), durch die die Hydrolyse des ATP verhindert werden könnte. Die Theorie beruht darauf, dass die Konzentration extrazellulären ADPs, AMPs und Adenosins sich so zugunsten einer steigenden Konzentration und einer längeren Wirkdauer extrazellulären ATPs verringert, wodurch die hervorgerufenen Wirkungen demnach hauptsächlich dem Trinukleotid zugeschrieben werden können.



**Abbildung 3:** ARL 67156 (syn. FPL 67156 / 6-N,N-Diethyl-D- $\beta,\gamma$ -dibromomethylene-ATP triammonium salt) ist ein Triammonium-Salz mit einem Molekulargewicht von 785 Da, hier dargestellt als chemische Strukturformel.

Seine Wirkung zeigte sich in verschiedenen Studien als selektiver Inhibitor der ecto-ATPase, der sowohl die Aktivität der Apyrase als auch die der Ekto-5'-Nukleotidase supprimiert (Crack et al. 1995). Der hemmende Effekt erfolgt dabei in konzentrationsabhängiger Weise (Westfall et al. 2000; Levesque et al. 2007) und trat sowohl bei endogen freigesetztem als auch bei exogen zugeführtem ATP auf (Westfall et al. 1997).

### 1.6 Rezeptoren für Purine und Pyrimidine – P1- und P2X/P2Y-Rezeptoren

Die Wirkungen von Purinen (ATP, ADP und Adenosin) und Pyrimidinen (UTP, UDP) als extrazelluläre Nukleotide wird von einer Gruppe membranständiger

Rezeptorproteine vermittelt. Diese werden formal in die P1-Rezeptoren (Adenosin) und die P2-Rezeptoren (ATP, ADP, UTP, UDP) unterschieden. Pyrimidin- und Purinrezeptoren wurden lange Zeit unter dem Begriff „Purinozeptoren“ zusammengefasst (Burnstock 1978). Heutzutage verwendet man lediglich den Begriff der P1-Rezeptoren bzw. Adenosin-Rezeptoren und den der P2-Rezeptoren (Fredholm et al. 1996). Die P1-Rezeptoren werden aufgrund ihrer Molekularstruktur, ihrer pharmakologischen Eigenschaften und der unterschiedlichen Organverteilung weiter unterteilt in die Subtypen A1, A2A, A2B und A3. Sie alle sind G-Protein-gekoppelt. Die P2-Rezeptoren wiederum lassen sich aufgrund unterschiedlicher Sequenzhomologien und ihrer nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden in zwei Hauptklassen unterteilen, den P2Y- und den P2X-Rezeptoren. Bei den P2Y-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Dubyak 1991), bei den P2X-Rezeptoren hingegen um schnelle Liganden-gesteuerte Ionenkanäle (Benham et al. 1987; Abbracchio et al. 1994). Beide Rezeptor-Gruppen werden wiederum, gemäß ihrer molekularen Struktur, in verschiedene Subtypen unterteilt. Nach einer allgemeinen Empfehlung der International Union of Pharmacology (IUPHAR) werden heute die Rezeptortypen nach der Chronologie ihrer Entdeckung in P2X<sub>1-7</sub> bzw. P2Y<sub>1-14</sub> (chronologische Nomenklatur) eingeteilt. Damit wird die bisherige Nomenklatur abgelöst (P2X, P2Y, P2U, P2T und P2Z), die auf einer rein pharmakologischen Einteilung aufbaut (Fredholm et al. 1996; IUPHAR 1998). Die zwischenzeitlich beschriebenen P2Y-Subtypen 3,5,7,8,9 und 10 wurden nicht in die offizielle Nomenklatur mit aufgenommen, da sie entweder nicht den Anforderungen eines P2Y-Rezeptors genügten oder kein entsprechendes Korrelat im Säugetier gefunden wurde (Ralevic et al. 1998).

### **1.6.1 Adenosin/P1-Rezeptoren**

Alle Adenosin-Rezeptoren vermitteln ihre intrazellulären Effekte mittels G-Proteinen. A1- und A2-Rezeptoren wurden erstmals 1978 beschrieben, der A3-Rezeptor wurde erst sehr spät identifiziert (Zhou et al. 1992). Es zeigte sich, dass alle P1-Rezeptoren einen Einfluss auf die zytosolische cAMP-Konzentration haben, wobei Adenosin über A1- und A3-Rezeptoren die Adenylatcyclase inhibiert und über A2-Rezeptoren aktiviert (Van Calcar et al. 1978; Londos et al. 1980). Neben einer sinkenden cAMP-Konzentration bewirken A1- und A3-Rezeptoren außerdem eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC), was zu einer erhöhten Produktion von Inositol-1,4,5-



triphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) und somit schließlich zu einer vermehrten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation führt (Abbraccio et al. 1995; Megson et al. 1995).

Weiterhin sind A<sub>1</sub>-Rezeptoren in der Lage, Kalium-Kanäle zu aktivieren. Dies führt beispielsweise im Erregungs- und Leitungssystem des Herzens zu Bradykardie (Belardinelli et al. 1995), im Gefäßsystem zu Vasodilatation und erhöhtem Blutfluss und zu reduzierter neuronaler Erregung bzw. Hyperpolarisation im Nervensystem (Greene et al. 1991).

Alle drei Adenosin-Rezeptoren haben eine spezifische, aber dennoch häufig gemeinsame Organverteilung. Die Expression unterschiedlicher P<sub>1</sub>-Rezeptoren auf derselben Zelle ermöglicht somit dem gemeinsamen Agonisten Adenosin mehrere verschiedene, zum Teil funktionell gegensätzliche Signalkaskaden zu aktivieren und dadurch eine Feinabstimmung der Rezeptor-Antwort zu erreichen.

## **1.6.2 P2-Rezeptoren**

### **1.6.2.1 P2X-Rezeptoren**

Zurzeit unterscheidet man sieben verschiedene Rezeptor-Subtypen (P<sub>2X1-7</sub>). P<sub>2X</sub>-Rezeptoren sind schnelle (Antwort innerhalb 10ms) Ionenkanäle mit selektiver Permeabilität für bestimmte Kationen (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) (Dubyak et al. 1993), dementsprechend ihr vermehrtes Vorkommen auf exzitatorischen Zellen (Glattmuskelzellen, Neurone, Gliazellen). Die Aktivierung der Ionenkanäle mündet letztlich immer in einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Die verschiedenen Rezeptor-Subtypen unterscheiden sich in ihrer jeweiligen Affinität gegenüber Agonisten und Antagonisten sowie ihren Desensitierungsraten und ihrer Zellverteilung (Ralevic et al. 1998), im Detail soll an dieser Stelle jedoch nicht auf jeden einzelnen Rezeptor eingegangen werden.

### **1.6.2.2 P2Y-Rezeptoren**

P<sub>2Y</sub>-Rezeptoren sind langsame (<100ms), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und bewirken über eine Aktivierung der PLC eine gesteigerte Mobilisation intrazellulären Calciums, jedoch agieren manche der Rezeptoren auch über cAMP als second messenger (Ralevic et al. 1998).

Viele Zellen exprimieren mehr als einen Subtyp der P<sub>2</sub>-Rezeptoren. Der biologische Nutzen dieser Tatsache ist letztlich nicht vollständig geklärt, man vermutet jedoch,

dass es so zu einer Feinregulation der zellulären Antwort und somit zum Synergismus der verschiedenen Rezeptoren kommt.

Weiterhin bekannt ist die Koexistenz von P1- und P2-Rezeptoren auf vielen verschiedenen Zelltypen. So exprimieren zum Beispiel Endothelzellen P2Y1, P2Y2 und A2A-Rezeptoren. Dadurch greifen sämtliche Abbauprodukte des ATP in die Regulation verschiedener Signalkaskaden ein. Häufig kommt es dabei zu reziproken Effekten, vor allem ATP und Adenosin vermitteln oft gegensätzliche Wirkungen. Ein weiterer Vorteil dieser Tatsache ist außerdem der gegenseitige Einfluss auf die Freisetzung und den Abbau extrazellulärer Nukleotide, da viele Nukleotide zum einen selbst zu ihrer vermehrten Freisetzung sowie zu verminderter Hydrolyse beitragen, zum anderen Nukleotide mit reziproken Rezeptorantworten sich gegenseitig inhibierende Effekte haben (Gustafson et al. 1999).

## **1.7 Extrazelluläres ATP und seine vielfältigen Wirkungen im Organismus**

Aufgrund des zahlreichen Vorkommens von P1- und P2-Rezeptoren auf nahezu allen Zellen des menschlichen Organismus kommt es zu vielfältigen, zum Teil synergistischen, zum Teil gegensätzlichen Effekten extrazellulärer Nukleotide in den verschiedenen Organsystemen (Abbraccio et al. 1998; Fischer 1999). Im Folgenden sollen diese detaillierter betrachtet werden:

### **1.7.1 Kardiovaskuläres System**

Zahlreiche Effekte haben ATP und seine Abbauprodukte in den verschiedenen Zelltypen des kardiovaskulären Systems. So kommt es bei Hypoxie oder Ischämie generell zur gesteigerten Freisetzung von Nukleotiden aus Endothelzellen (Bodin et al. 1996), präsynaptischen Vesikeln, Erythrozyten (Petrucci et al. 1994), Thrombozyten (Li et al. 1995) und aus degenerierter DNS von untergegangenen Zellen in den Extrazellulärraum. Sowohl die Ausschüttung von ATP als auch von Adenosin führt daraufhin zu einer Vasodilatation und somit zu einer verbesserten Oxygenierung des hypoxischen Gewebes. Durch die Aktivierung des P2Y1-, aber auch des P2Y2- und P2Y4-Rezeptors auf Endothelzellen induziert ATP die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) bzw. EDRF (endothelial derived relaxing factors) und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) als potenten Vasodilatoren (Kelm et al. 1988; Farias et al. 2005). Jedoch besitzt auch Adenosin ein eigenes gefäßerweiterndes Potenzial, wobei das des ATP wesentlich potenter sein soll (Wolf et al. 1956). Die die Permeabilität modulierenden Effekte des Adenosins werden in der Literatur

kontrovers behandelt. Je nach Organsystem zeigt sich ein unterschiedliches Wirkungsprofil des Adenosins (Burnstock 1980; Watanabe et al. 1992, Linden 2001, Pfeil et al. 2009). Welche Adenosin-Rezeptoren (A1, A2A, A2B, A3) die bedeutendste Rolle spielen, welche intrazellulären Mechanismen für die einzelnen Effekte verantwortlich sind oder ob die Wirkung auch unabhängig von der Integrität des Endothels erzielt werden kann bzw. welche Zelltypen vorwiegend Einfluss auf die Permeabilität haben, ist weiterhin Gegenstand der Diskussion (Kemp et al. 1999, Carman et al. 2011). Es bleibt festzuhalten, dass es sich bei Hypoxie-induzierten Veränderungen des Vasotonus und der Herzfunktion um ein komplexes Zusammenspiel von Endothelzellen, vaskulären Glattmuskelzellen und Kardiomyozyten handelt (Kerkhof et al. 2002).

Unumstritten ist der modulierende Effekt extrazellulärer Nukleotide auf das Ausmaß des Reperfusionsschadens nach einer Organ-Ischämie (Jordan et al. 1997; Cargnoni et al. 1999, Pfeil et al. 2009). Adenosin zeigte einen protektiven Effekt hinsichtlich des Reperfusionsschadens im Gehirn (Phillis et al. 1993) und im Myokardgewebe (Lasley et al. 1993). Der Aufrechterhaltung der endothelialen Schrankenfunktion wird dabei eine entscheidende Bedeutung beigemessen (Liu et al. 1997; Ohta et al. 2001, Eckle et al. 2008). Weiterhin kommt es bei Hypoxie zur Produktion von VEGF (vascular endothelial growth factor) in Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen, um durch Angiogenese mittelfristig eine verbesserte Oxygenierung zu erzielen (Fischer et al. 1997).

Unabhängig von Hypoxie oder Ischämie haben extrazelluläre Nukleotide Auswirkungen auf die Elektrophysiologie des Herzens. So wurde sowohl eine negativ inotrope (Burnstock et al. 1983) als auch eine kontraktilitätssteigernde Wirkung von ATP beschrieben (Zheng et al. 1993). Hinsichtlich seines Einflusses auf die Herzfrequenz soll ATP in geringer Dosierung eher tachykard wirken, während es in höherer Dosis einen bradykarden Effekt bis hin zu einem AV-Block haben soll (James 1965; Vassort 2001). Die Gabe von Adenosin führt neben einer Koronardilatation (Shryock et al. 1998) bekanntermaßen zu einer Senkung der Herzfrequenz und einer Verlangsamung der Erregungsleitung (Srinivas et al. 1999).

### **1.7.2 Thrombozytenaggregation und Hämostase**

ADP ist ein wichtiger Mediator der Thrombozytenaggregation (Born 1962; Mills 1996). Es aktiviert P2Y1- und P2Y12-Rezeptoren und induziert so (Hechler et al.

1998; Jin et al. 1998) eine Formänderung der Thrombozyten und die Aktivierung von Fibrinogen-Rezeptoren, was letztlich in der Bildung eines okklusiven Thrombus endet. ATP, AMP und Adenosin dagegen haben im Vergleich zum thrombogenen ADP eine antagonistische Wirkung im Rahmen der Thrombozytenaggregation. So ist ATP ein kompetitiver Inhibitor an ADP-Rezeptoren. Adenosin erzielt über eine A<sub>2A</sub>-Rezeptor-induzierte cAMP-Bildung ebenfalls eine antikoagulatorische Wirkung (Macfarlane et al. 1975; Haslam et al. 1981).

### **1.7.3 Inflammation**

Im Rahmen akuter Entzündungsprozesse kommt es zu komplexen Interaktionen von P<sub>1</sub>- und P<sub>2</sub>-Rezeptoren, durch deren Aktivierung sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte hervorgerufen werden. Allgemein kann man jedoch sagen, dass durch ATP Entzündungsreaktionen eher verursacht oder unterhalten werden, indem es einerseits die Freisetzung der Entzündungsmediatoren Histamin und Bradykinin und somit die Entstehung eines entzündlichen Ödems durch Extravasation von Plasma ins perivaskuläre Gewebe fördert (Ziganshina et al. 1996), andererseits aufgrund seiner chemotaktischen Eigenschaft die Adhäsion und Infiltration immunkompetenter Zellen ins entzündliche Gewebe erleichtert (Di Virgilio et al. 2001). Die Wirkung des Adenosins hingegen zielt im Großen und Ganzen darauf ab, das Ausmaß entzündlicher Veränderungen zu reduzieren (Firestein 1996; Burnstock 2006).

### **1.7.4 Schmerzentstehung und –wahrnehmung**

Wesentlich für die Entstehung und Verarbeitung von Schmerz ist die Aktivierung des P<sub>2X3</sub>-Rezeptors, der fast ausnahmslos auf sensorischen Neuronen exprimiert wird, dort jedoch in einer hohen Dichte vorzufinden ist (Chen et al. 1995). Versuchstiere, die diesen Rezeptor nicht exprimierten, hatten ein deutlich reduziertes Schmerzempfinden (Cockayne et al. 2000).

Die Aktivierung von P<sub>1</sub>-Rezeptoren durch Adenosin oder Analoga führte hingegen zu analgetischen Effekten (Sawynok 1999; Segerdahl et al. 1999).

### **1.7.5 Zytotoxizität und Apoptose**

ATP spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung des programmierten Zelltodes. Bei prolongierter Stimulation des P<sub>2X7</sub>-Rezeptors kommt es zur Aktivierung von Caspasen und konsekutiver Zellschwellung und Fragmentierung der DNS, was

letztlich zum Zelltod durch Nekrose oder Apoptose führt (Di Virgilio et al. 1990; Ferrari et al. 1999).

### **1.7.6 Zellzyklus**

Purine und Pyrimidine beeinflussen je nach Konzentration, Zielzelle und Rezeptorverteilung Zellwachstum und –proliferation (Abbraccio 1996). So wirkt ATP in geringer Konzentration stimulierend (Gonzales et al. 1990), in hoher Dosierung inhibierend hinsichtlich DNS-Synthese und Zellproliferation (Rapaport 1983). Die Rolle von Adenosin im Rahmen des Zellwachstums ist nicht vollständig geklärt, eine inhibierende Funktion wird jedoch diskutiert.

### **1.7.7 Neurologie**

Von besonderer Relevanz sind ATP und seine Abbauprodukte auf dem Gebiet neurodegenerativer Erkrankungen und Epilepsien durch Modulation der endothelialen Permeabilität im Bereich der Blut-Hirn-Schranke (Carman et al. 2011). So haben Adenosin-Rezeptor-Antagonisten einen positiven Effekt auf die Symptomatik des Morbus Parkinson (Richardson et al. 1997; Williams 1999), ein therapeutischer Nutzen extrazellulären Adenosins bei Morbus Alzheimer wird diskutiert und aufgrund der antikonvulsiven Eigenschaft von Adenosin bzw. der anfallsfördernden Wirkung von ATP könnten P2X-Rezeptor-Antagonisten und Adenosin-Analoga bzw. –Abbau-Hemmer als Antikonvulsiva Anwendung finden (Knutsen et al. 1997; Wiesner et al. 1999).

### **1.7.8 Respirationstrakt**

ATP bewirkt eine gesteigerte Chlorid- und Flüssigkeitssekretion, was zu einer verbesserten mukoziliären Clearance-Funktion und geringerer Infektanfälligkeit, vor allem bei Patienten mit Cystischer Fibrose, führt (Mason et al. 1991; Hwang et al. 1996). Im klinischen Alltag findet Theophyllin, ein Adenosin-Rezeptor-Antagonist, als Medikament bei obstruktiven Atemwegserkrankungen Anwendung (Vilsvik et al. 1990).

### **1.7.9 Endokrinologie**

In zahlreichen Organen des Endokriniums (Hypophyse, Nebenniere, Schilddrüse, Ovar und Hoden) kommt es zu ATP-abhängiger Hormonliberation (Sato et al. 1992; Gandia et al. 1993; Filippini et al. 1994; Kamada et al. 1994; Chen et al. 1996).

Weiterhin ist ATP in der Lage, die Insulin-Sekretion in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas zu stimulieren, wohingegen ADP dessen Freisetzung inhibiert (Nichols et al. 1996; Loubatieres-Mariani et al. 1997). Demnach könnten ATP-Analoga in der Therapie des Diabetes mellitus Anwendung finden.

#### **1.7.10 Sinnesorgane**

Es zeigte sich, dass sowohl P1- als auch P2-Rezeptoren bei der Sinneswahrnehmung von Schallwellen im Hörorgan, aber auch bei der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes im Auge involviert sind. Der eventuelle Nutzen dieser Erkenntnisse ist Gegenstand aktueller Forschung in der Behandlung von Erkrankungen des Innenohrs, wie z.B. des Morbus Menière, des Tinnitus und der sensorisch-neuralen Taubheit sowie ophthalmologischer Erkrankungen, wie der Sicca-Symptomatik oder des Glaukoms (Housley 2000; Yerxa et al. 2002; Pintor 2005).

### **1.8 Klinische Relevanz und therapeutischer Nutzen**

Die Wirkung verschiedener extrazellulärer Nukleotide und deren Rezeptor-Antworten in den einzelnen Organsystemen wurden in den entsprechenden Kapiteln dargestellt. Neben den erwähnten möglichen Anwendungsgebieten bestimmter Nukleotide, deren Analoga bzw. selektiver Rezeptor-Agonisten oder Antagonisten, darf auch nicht der mögliche Einsatz spezifischer Ektonukleotidasen wie z.B. CD39 oder deren Inhibitoren wie z.B. ARL 67156 vergessen werden. Die Angriffspunkte in diesem „System des extrazellulären Nukleotid-Metabolismus“ sind also zahlreich und bieten demnach die Möglichkeit für intensive Medikamentenforschung auf diesem Gebiet. Zusammenfassend muss man jedoch sagen, dass es aktuell immer noch sehr wenige Medikamente mit direktem Angriff an P1- und P2-Rezeptoren gibt (Williams et al. 2000).

Ende der neunziger Jahre beschrieben Agteresch et al. die etablierte und potenzielle Anwendung von extrazellulären Nukleotiden im klinischen Alltag. Adenosin wird verwendet zur Behandlung supraventrikulärer Tachykardien (Agteresch et al. 1999). Der Vorteil liegt in seiner extrem kurzen Halbwertszeit von 1-10 Sekunden. Darin liegt aber auch wiederum sein Nachteil, da Adenosin, um einen prolongierten Effekt in anderen Organsystemen zu erreichen, in sehr hohen Dosen verabreicht werden müsste.

Wie bereits erwähnt, ist Theophyllin als Adenosin-Rezeptor-Antagonist ein Medikament bei höhergradigen obstruktiven Atemwegserkrankungen, hat jedoch eine sehr enge therapeutische Breite und nicht zu vernachlässigende kardiale Nebenwirkungen (Nehlig 1999). Der gefäßerweiternde Effekt von ATP wird in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie ausgenutzt. Die Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel und Ticlopidin wirken durch Blockade der ADP-Wirkung am P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor und sind aus dem klinischen Alltag in der Behandlung arteriosklerotischer Erkrankungen und der Sekundärprävention ischämischer Ereignisse nicht mehr wegzudenken. In der klinischen Erprobung befinden sich derzeit neuartige P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Inhibitoren (Prasugrel, Cangrelor und AZD6140), die sich durch eine höhere Potenz, einen schnelleren Wirkungseintritt und eine reversible Rezeptor-Blockade auszeichnen sollen (Cattaneo 2007). Bei Patienten mit Cystischer Fibrose kommt es unter ATP zu einer Steigerung der mukoziliären Clearance und zu geringerer Infektanfälligkeit. In der Onkologie verhindert ATP fortschreitenden Gewichtsverlust und die Progression des Tumorwachstums. Zytostatika können bei gleichzeitiger Gabe von ATP niedriger dosiert werden, bei Radiotherapie wirkt ATP der Entstehung von Strahlenschäden entgegen.

Es zeigte sich, dass Adenosin in der Lage ist, die Natrium-Rückresorption im proximalen und distalen Tubulussystem zu steigern (Wilcox et al. 1999). Da dieser Vorgang durch A<sub>1</sub>-Rezeptoren reguliert wird, ergibt sich die Möglichkeit der Verwendung von selektiven A<sub>1</sub>-Blockern als Diuretika in der Behandlung der Herzinsuffizienz und der akuten Niereninsuffizienz mit dem Vorteil eines geringen Einflusses auf die Kalium-Ausscheidung, die glomeruläre Filtration und den renalen Blutfluss (Jackson 1997).

Verschiedene P<sub>2</sub>-Rezeptor-Subtypen werden im Knochen exprimiert. Dixon et al. beschäftigten sich mit der Frage nach einem möglichen Nutzen von Purin- und Pyrimidinrezeptor-Modulation in der Therapie von Osteoporose und anderen Erkrankungen des Skelettsystems (Dixon et al. 2000; Hoebertz et al. 2003).

In der Chirurgie könnte die ATP- und Adenosin-induzierte Hypotension die Überlebensrate bei Patienten mit hämorrhagischem Schock verbessern, gering dosiertes ATP und Adenosin in der Anästhesie zur Analgesie genutzt werden. Gegenstand aktueller Forschung sind Analgetika mit dem Angriffspunkt an P<sub>1</sub>- und P<sub>2</sub>-Rezeptoren, so könnten in naher Zukunft P<sub>2X3</sub>-Rezeptor-Blocker und A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten eine therapeutische Option in der Behandlung von Schmerzen

darstellen. Zuletzt wurde auch der Einfluss von P2X4- und P2X7-, aber auch von P2Y-Rezeptoren in der Schmerzentstehung und –wahrnehmung diskutiert (Sawynok 2007).

Letztlich bleibt jedoch abzuwarten, welche neuen Erkenntnisse in der Therapie der erwähnten, aber auch anderer Krankheitsbilder gewonnen werden (Agteresch et al. 1999; Williams et al. 2000; Fredholm 2003).

### **1.9 Das Gefäßendothel und seine Funktion als Blut-Gewebe-Schranke**

Als Endothel bezeichnet man die zum Gefäßlumen hin gerichteten Zellen der Intima von Lymph- und Blutgefäßen. Unabhängig von ihrem je nach Gefäßart unterschiedlichen Aufbau sind alle Gefäße aus dem Herz-Kreislauf-System mit einer einlagigen Schicht aus Endothelzellen ausgekleidet. Der menschliche Körper besteht aus rund 10.000 Milliarden Endothelzellen, was umgerechnet einem Gewicht von einem Kilogramm entspricht. Die dabei mit dem Blut in Kontakt tretende Gesamtoberfläche beträgt ca. 7000 m<sup>2</sup>, was ungefähr mit der Größe eines Fußballfeldes vergleichbar ist (Simionescu et al. 1988). Trotz erheblicher regionaler Unterschiede kann man das Endothel in funktioneller Hinsicht als ein Organ betrachten. Neben der bloßen Funktion als Gefäßwandauskleidung ist das Endothel an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt (Pries et al. 2006; Simionescu et al. 2006). Endothelzellen stellen eine Barriere zwischen Blutkreislauf und umliegendem Gewebe dar und können so den Stoffaustausch regulieren. Bei suffizienter Perfusion garantiert das zirkulierende Blut die Versorgung des perivaskulären Gewebes mit Sauerstoff, Hormonen und sonstigen Nährstoffen und ist gleichzeitig für den Abtransport von Kohlendioxid und anderen Stoffwechselprodukten zuständig (van Hinsbergh et al. 2002). Durch die Synthese und Freisetzung vasoaktiver Substanzen, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO) haben Endothelzellen eine wichtige Funktion bei der Blutdruckregulation. Ein kontinuierlicher Blutfluss und die konstante Zusammensetzung des Blutes hinsichtlich seiner Bestandteile und seines Volumens ist an die Intaktheit des Endothels gebunden. Gefäßverletzungen führen zur Freisetzung gerinnungsaktivierender Substanzen (z.B. von Willebrand-Faktor) aus dem Endothel und somit letztlich zur Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten mit dem Ziel der Blutstillung. Im Rahmen von Entzündungsvorgängen, aber auch bei angiogenetischen Prozessen, kommt es zur Aktivierung von Endothelzellen, die



durch Ausschüttung von Zytokinen chemotaktisch auf Zellen des Immunsystems (neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten) wirken und deren Adhäsion und Transmigration in das inflammatorische Gewebe unterstützen. Eingehende Forschung auf dem Gebiet der Angiogenese beschäftigt sich mit der Migration und Proliferation von Endothelzellen.

Eine Funktionsstörung des Endothels (Endotheldysfunktion) kann demnach verständlicherweise gravierende pathologische Folgen nach sich ziehen.

### **1.10 Mikrovaskuläre Permeabilität**

Das Endothel ist eine selektive Permeabilitätsbarriere und reguliert den Austausch von Wasser, gelösten Substanzen, Makromolekülen und sogar Zellen zwischen Blut und umgebenden Geweben (Stevens et al. 2000; van Hinsbergh et al. 2002), was eine der wichtigsten Aufgaben des Endothels darstellt. Außerdem garantiert der transzelluläre Transport von Albumin die Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks. Veränderungen der mikrozirkulären Permeabilität stellen somit die Grundlage von jeglichen Gewebeschäden dar, welche schließlich aufgrund progredienter Ödematisierung zu Hypovolämie und einem insuffizienten Gasaustausch in einer Organhypoxämie und einem daraus resultierenden Organversagen münden (Czabanka et al. 2007).

Der Aufbau der endothelialen Schranke unterscheidet sich deutlich in verschiedenen Organen sowie innerhalb einzelner Organsegmente (Albert et al., 1985; Lamm et al., 1988). So gibt es grundsätzlich drei verschiedene Arten von Endothel (Pries et al. 2006):

(1) Kontinuierliches Endothel ist durch die Ausbildung von sogenannten tight-junctions nahezu undurchlässig für im Blut gelöste Stoffe (Bazzoni 2006). Derartige Endothelzellen finden sich beispielsweise im menschlichen Gehirn und bilden die sogenannte Blut-Hirn-Schranke aus, die das Gehirn vor im Blut zirkulierenden Krankheitserregern oder Toxinen schützt. Der Transport von kleinen lipidlöslichen Molekülen (Alkohol, Nikotin, Narkosegase, aber auch LSD oder Heroin) vollzieht sich per Diffusion während wasserlösliche Stoffe (Glukose, Ionen, Harnstoff) nur über spezifische Transportmechanismen der Endothelzellen in das perivaskuläre Gewebe gelangen können.

(2) Fenestriertes Endothel dagegen ist wesentlich permeabler für größere Moleküle. Die „Fenster“ haben eine Größe von ca. 70nm, die jedoch durch das Vorhandensein

von Diaphragmata den Transport von sehr großen Molekülen oder gar Zellen verhindern. Diese Art von Endothelzellen findet man z.B. in den Glomeruli der Niere, im Darm und in endokrinen Drüsen.

(3) Diskontinuierliches Endothel können sogar Zellen passieren. Die Endothelzellen stehen zum Teil nicht in Kontakt zueinander, die Basalmembran ist unterbrochen oder gar nicht existent. Dieses Endothel kommt z. B. in den Sinusoiden der Leber vor. Die interzellulären Öffnungen sind dort ca. 0,2-0,6 µm groß (Schiebler et al. 2003).

Neben dem bereits erwähnten Transportmechanismus der Diffusion, spielen zwei weitere, prinzipiell verschiedene, Mechanismen eine besondere Rolle für die Passage von Makromolekülen durch eine Endothelzellschicht (Bendayan 2002; Minshall et al. 2006):

(1) Vesikulärer Transport (Karnovsky 1967; Shea et al. 1969): Dies wird gestützt durch die Entdeckung elektronenmikroskopisch sichtbarer Oberflächenvakuolen und zytoplasmatischer Vesikel (Simionescu et al. 1988; 1991), die insbesondere Makromoleküle, vor allem durch kontinuierliche Endothelzellen hindurch transportieren. Diese Entdeckung zeigte, dass die endotheliale Barriere nicht nur als ein physikalisches Sieb fungiert, sondern aktive Transportmechanismen eine Rolle spielen (Schnitzer et al. 1988; Predescu et al. 1993).

(2) Parazelluläre Passage über interendotheliale Spalträume (Majno 1963; Carter et al. 1974): Im Rahmen der Aktivierung von Endothelzellen durch inflammatorische Mediatoren wie Histamin, Bradykinin oder Thrombin kommt es zur Spaltenbildung zwischen benachbarten Zellen (Majno et al. 1961; van Hinsbergh et al. 1997) und konsekutiv zur Erhöhung der endothelialen Permeabilität.

Erst in den letzten Jahren gelang es, die Wirkungsweise des ATP genauer zu beleuchten und die intrazellulären Mechanismen aufzudecken. Die Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktionswege zeigte, dass ATP einen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Myosin-Leichtketten (MLC) hat. Die MLC repräsentieren die regulatorischen Einheiten des endothelialen, kontraktiven Apparates. Die Kraftentwicklung wird in Endothelzellen durch Phosphorylierung der MLC gesteuert, in Analogie zum kontraktiven Apparat der Glattmuskelzellen. Zwei verschiedene Mechanismen spielen dabei eine entscheidende Rolle: zum Einen die Anspannung des kontraktiven Apparates durch die Aktivierung der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen MLC-Kinase, zum Anderen durch eine Hemmung der MLC-Phosphatase

durch die Rho-Kinase in den Endothelzellen sowie der Zerfall der Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Adhäsionskomplexe (Chapell et al. 2009, Becker et al. 2010, Brands et al. 2010, Aslam et al. 2011). Die durch ATP induzierte Dephosphorylierung der MLC in Endothelzellen wird wahrscheinlich aufgrund einer  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Aktivierung der MLC-Phosphatase verursacht. Jedoch aktiviert ATP auch, allerdings in viel schwächerem Ausmaße, die MLC-Kinase über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Mechanismus, dennoch überwiegt seine Wirkung auf die MLC-Phosphatase mit dem Ergebnis einer Netto-Dephosphorylierung der MLC und einer damit einhergehenden protektiven Wirkung auf die endotheliale Schranke (Sheldon et al. 1993; Goeckeler et al. 1995; Noll et al. 2000; Satpathy et al. 2005; Härtel et al. 2007).

### **1.11 Mediatoren modulieren die endotheliale Schrankenfunktion**

Zahlreiche Mediatoren treten entweder über den Blutstrom oder aus dem Interstitium mit Endothelzellen in Kontakt und aktivieren so intrazelluläre Signalkaskaden, die die Permeabilität der endothelialen Schranke ganz entscheidend modulieren.

Es gibt verschiedene Faktoren, die die Permeabilität der endothelialen Schranke schützen oder auch stören können. Inflammatorische Mediatoren wie Thrombin (Garcia et al. 1986; Gündüz et al. 2003), Histamin (Rotrosen et al. 1986; van Nieuw Amerongen et al. 1998), Substanz P (van Hinsbergh et al. 2002), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Bradykinin (Svensjö et al. 1979), aber auch reaktive Sauerstoffmetabolite ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^-$ ), Lipopolysaccharid (LPS) (Penn et al. 1991; Hirano et al. 2004) und VEGF (vascular endothelial growth factor) verursachen eine massive Störung der Barrierefunktion, indem sie die Aktivität des kontraktiven Apparates steigern oder die Zerstörung interendothelialer Zell-Zell-Verbindungen induzieren (Mehta et al. 2006). Das Ausmaß und die Dauer der Hyperpermeabilität zeigen jedoch in Abhängigkeit vom auslösenden Agens und dem zugrundeliegenden Mechanismus deutliche Unterschiede. So bewirken beispielsweise Histamin und Substanz P eine sehr rasche ( $< 20\text{s}$ ) und kurzzeitige Erhöhung (5-10 Minuten) der Permeabilität in postkapillären Venolen mit einer Lückenbildung von bis zu  $1,5\ \mu\text{m}$  Größe (Hirata et al. 1995; Baluk et al. 1997). Im Vergleich dazu erreicht Thrombin eine prolongierte Erhöhung der Permeabilität von 1-1,5 Stunden (Malik et al. 1987). Eine gesteigerte vaskuläre Permeabilität kann *in vivo* zu lokalen Ödemen (Tranum-Jensen et al. 1981), Entzündungen oder zu systemischen Veränderungen im Blutkreislauf und damit zu lebensbedrohlichen

klinischen Komplikationen führen, die letztlich ins Bild des Multiorganversagens münden (Davies et al. 1997; Fink et al. 2005).

Histamin-Rezeptor-Blocker, Stickstoffmonoxid (Kubes et al. 1992), das atriale natriuretische Peptid (ANP) (Lofton et al. 1990) und extrazelluläres ATP via P2-Rezeptoren (Noll et al. 1999; Noll et al. 2000; Gündüz et al. 2003; Gündüz et al. 2006) sind dagegen in der Lage, die endotheliale Schranke zu stabilisieren und die Permeabilität zu senken. Gündüz et al. zeigten, dass der protektive Effekt auf den Reperfusion-induzierten Endothelzellschaden *in vitro* sowohl bei exogen zugeführtem als auch bei endogen freigesetztem ATP zu verzeichnen ist, Adenosin hingegen als ATP-Abbauprodukt einen permeabilitätssteigernden Effekt hat. Der gezielte Einsatz des Ektonukleotidase-Inhibitors ARL 67156 verhinderte den permeabilitätssteigernden Effekt und stabilisierte die endotheliale Schranke (Gündüz et al. 2006).

In allen bisher veröffentlichten Studien wurde der Effekt von ATP auf die Permeabilität *in vitro* oder *in vivo* untersucht, ohne den Einfluss seiner Abbauprodukte ADP, AMP und Adenosin auf die endotheliale Schranke zu berücksichtigen. Bis heute existieren keine tierexperimentellen Studien hinsichtlich der gegensätzlichen Wirkung verschiedener extrazellulärer Nukleotide auf die Permeabilität in Mikrogefäßen. Aufgrund des erwähnten raschen Abbaus durch Ektonukleotidasen kann jedoch zu keiner Zeit zwischen den spezifischen Wirkungen einzelner Nukleotide differenziert werden.

Diese Arbeit soll nun den gegensätzlichen Effekt von ATP und dessen Abbauprodukten auf die Permeabilität in Endothelzell-Monolayern und in der Mikrozirkulation des Ratten-Mesenteriums verdeutlichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### Material zur Bestimmung der *in vivo*-Permeabilität

Becherglas „Duran“, 5 Liter	Schott
Cellstar®, PP-Test tubes, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Culture Tubes, 12x75 mm, Shelt Package	Corning Incorporated, New York, USA
Glasröhrchen Borosili eatc Glass Disposable	
Handschuhe latex, puderfrei, Nobaglove®	NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co. KG, Wetter/Wengern
Kanüle BD Microlance 3 26Gx ½ “ (0,45 mm x 13 mm)	BD, Drogheda, Ireland
Klebeband Leukosilk	Beiersdorf AG, Hamburg
Klebeband Micropore™	3M Deutschland GmbH, Neuss
Klemme 12,5 mm, BH 110	Aesculap AG u. Co. KG, Tuttlingen
Klemme nicht rostend, gerade, breites Maul, 160 mm, HSE-914-15	Hammacher, Solingen
Lötkolben R 539205, 230 V, 50 Hz, 100 W	LUX GmbH, Wermelskirchen
Lötkolbenspitze, Galvanokauter Art. 235 V	Meyer & Kerstin Medizintechnik, Hamburg
Ligaturfaden Vicryl 3/0 3 x 45 cm, violett geflochten, Polyglactin 910	Ethicon GmbH, Norderstedt
Mikro-Präparierpinzette aus Wormit, gebogen, 105 mm, HWC 115-10	Hammacher, Solingen
Mikro-Präparierschere aus Wornit, gerade, spitz/spitz, 110 mm , HWB 002-11	Hammacher, Solingen
Mikroschere nichtrostend, gerade, 80 mm (Vanas), HSB 534-08	Hammacher, Solingen

Mikroschere nichtrostend, gerade, 105 mm, Schnittlänge 15 mm, HSB 504-10	Hammacher, Solingen
Mikroschlauch, Non Sterile Polythene Tubing 0,58/0,96 mm	SIMS Portex Ltd., UK
Mikroskopierpinzette aus Wornit, gebogen, mit Stift, 105 mm, HWC 071-10	Hammacher, Solingen
Pinzette chirurgisch, 145 mm, 12-321-14	Carl Martin GmbH, Solingen
Pipetten Eppendorf 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Eppendorf 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitze 200 µl, gelb	Sarstedt AG u. Co., Nürnbergrecht
Pipettenspitze 1000 µl, blau	Sarstedt AG + Co, Nürnbergrecht
Reaktionsgefäße, Eppendorf 3810, 1,5 ml	Eppendorf-Nettler-Hinz GmbH
Schere für Physiologie, gebogen spitz/stumpf, BC 421 R	Aesculap AG u. Co. KG, Tuttlingen
Spritze Injekt-F Luer Lock 1 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzen Injekt Luer Lock 2 ml, 5 ml, 10 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritze, Injekt Luer Lock, 20 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen
Tracheostoma: Perfusorleitung, 180 cm gekürzt auf ca. 3,5 cm	Braun Melsungen AG, Melsungen
Zelletten, 5 x 4 cm NO.13350	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied
<u>Kathetersystem bestehend aus:</u>	
Mikroschlauch, Non Sterile Polythene Tubing 0,58/0,96 mm	SIMS Portex Ltd., UK
Verbindungsschlauch, Silikon 05 x 2,5 mm, transparent,	Herbert Kalensee, Giessen
Kanüle UNOLOK 18 x 1½ (1,20 x 38 mm)	HMD Healthcare Ltd., Leominster UK

Verschlusskonus: Kombi-Stopfen H7 1702	Intermedica GmbH, Klein-Winterhain
Mehrwegehahn, Discofix C-3	Braun Melsungen AG, Melsungen
<u>Infusionssystem (Nummer 1) bestehend aus:</u>	
Infusionsleitung 150 cm Luer Lock	Primed, Halberstadt
Perfusorspritze, Perfusion Plastipac, 50 ml	Becton Dickinson
Perfusor, Typ VI TYP 871222-0 Nr. 09438	Braun Melsungen AG, Melsungen
<u>Infusionssystem (Nummer 2) bestehend aus:</u>	
Infusionsleitung, siehe oben	
Perfusorspritze, siehe oben	
Perfusor, Typ Secura 871702-8, Nr. 3047	Braun Melsungen AG, Melsungen
<u>Infusionssystem (Nummer 3) bestehend aus:</u>	
Haward Syringe Pump 22	FMI GmbH, Seeheim/Oberseebach
Perfusorspritze, Injekt Luer Lock 2 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen

**Apparate und Geräte (in alphabetischer Reihenfolge):**

Brutschrank B 6030	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Druckmonitor Hewlett Packard Nr. 78342A	Hewlett Packard GmbH, Böblingen
Drucktransducer Combitrans Monitoring Set	Braun Melsungen AG, Melsungen
Faserlichtquelle FLQ 150 M	HUND, Wetzlar
Magnetrührer IKA-Combimag RET	Janke&Kunkel IKA-Werk, Staufen i.Breisgau
Plexiglasplatte mit eingelassenem Objektträger	
Rasierapparat Typ 1451 Headliner	Moser, Deutschland
Rührgerät REAX 2000	Heidolph, Kelheim
TD – 20/20 Luminometer für ATP-Messung	Turner Designs Instruments,
Serial #2-2191-CE	Sunnyvale CA, USA
Waage Sartorius 2357 (Tiergewicht)	Sartorius AG, Göttingen

Waage Sartorius BP 3109 (Substanzen, Herz)	Sartorius AG, Göttingen
Warmwasserumlaufpumpe Julabo V	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Wasserbad Thermomix 1419	Braun, Melsungen
Wasserbehälter Julabo F-10	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

### **Mikroskop:**

Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen
Binokularer Phototubus mit Schiebepisma 45° / 20 mit Strahleinteilung 70/30	
Contax Kameragehäuse	
DIC Prisma 0,3-0,4/0,55	
Filterkombination 487910-0000	
Lampengehäuse HAL mit Kollektor, Rückspiegel, Lampenfassung und Wärmeschutzfilter	
Lampengehäuse HBO 50 incl. Lampenfassung	
LD Kondensator 0,55 H, PH 1,2, DIC mit Irisblende	
Halogenlampe 12 V 100 W	
Mikroskopstativ Axiovert 135 mit integriertem 5-fach Revolver	
Mikroskoptisch 100/135, heizbar	
Netzgerät für HBO 50, 220-240 V, 50-60 Hz, 350 VA	
Objektiv LD Achroplan 40 x /0,60 Korr. PH	
Objektführer 85x130 mm	
Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 50	
Reflektorschieber 3 FL	
T2 Adapter für Bajonett	
Temperaturregler TRZ 3700	
Träger für Durchlicht-Beleuchtung, schwenkbar	

### **Kamera:**

Cameraadapter CMA-DL	Sony
RS-232 Interface	



Video Color Monitor MT-H 1480	Panasonic
Video Kassetten VHS Fuji 240 F Fine Q	Fujifilm
Videokamera 3 ccd, Modell DXC-930P	Sony
Videorecorder AG 7350	Panasonic

**Computer:**

Nummer 1:

PC Pentium 75 MHz, PCI + Matrox Grafikkarte IP-8/AT/2MC

Monitor Highscreen MS 15858 Seriennummer UI 20127

Nummer 2:

PC Intel-Pentium 4 CPU 3,2 GHz 1GB RAM + Grafikkarte Asus X300 Se/T 128 MB

Monitor AL 1913 ACER, 70 Hertz

Drucker Ecosys FS 101 Kyocera mita

**Versuchstiere:**

CD-Ratte, männlich, 300-450 g, Charles River, Sandhofer Weg 7, D-97633 Sulzfeld

**Medikamente und Reagenzien:**

Adenosine – 5´ - triphosphat (ATP)

Lot 93306120 Roche, Grenzach-Wyhlen

Albumin, Rat-fraction V

A 6272, Lot 035 K 7570 Sigma®, Bodenheim

Apyrase (EC 3.6.1.5) Grade I from Potato

Lot 014 K 7 949 Sigma®, Bodenheim

ARL 67156 trisodium salt Sigma®, Bodenheim

(6-N,N-Diethyl-D-β,γ-dibromomethyleneATP)

ENLITEN® luciferase / luciferin Reagent

FF 2021, Lot 237936 Progenia Corporation, Madison, USA

Fluorescein Isothiocyanate I	
F 7250, Lot 025 K 5312	Roche, Grenzach-Wyhlen
Isofluran – Baxter 250 ml	
Ch.-B. 06D13A34	Baxter GmbH, Unterschleißheim
Isotone Kochsalzlösung 0,9%	Braun Melsungen AG, Melsungen
Liquemin N 25000 (Heparin 25000 Einheiten)	
Ch.B. G 070631	Roche, Grenzach-Wyhlen
Narcofen, Pentobarbital-Natrium	
Ch.-B. 134063	Merck GmbH, Hallbergmoos
Paraffine, dünnflüssig,	
DAB, PH, Eur, BP, NF	Merck KGaA, Darmstadt
PBS Puffer pH 7,4(44,04 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 7 H <sub>2</sub> O, 4,9 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 160 g NaCl ad 1 l aqua dest.)	
Säulen Pharmacia columns PD-10	GE Healthcare Bio-Sciences AB
Urethan (Ethylcarbammat 99 % rein,	
51-59-6 EEC Nr. 200-123-1	Sigma®, Bodenheim

### Materialien zur Bestimmung der *in vitro*-Permeabilität

Langendorff-System:

- doppelwandiger Behälter mit Wasserbad
- Glasspiralen-Hitze-Ausstauscher
- Zwei Glaskanülen
- Verbindungsstück aus Glasrohr
- Sammel-Trichter
- Pasteur-Pipette

Becherglas, 50 ml

Becherglas, teflonbeschichtet, 50 ml

Costar Transwell Permeable Support	Corning Inc., New York, USA
------------------------------------	-----------------------------

(0,4 µm Polycarbon Membrane, 24 mm)

Culture Tubes 10 ml Greiner bio one GmbH, Frickenhausen

Einmalpipette, 5 ml

Eppendorf Cups 1000 µl Eppendorf AG, Hamburg

Falcon Plastik-Kulturschalen Becton Dickinson®, Heidelberg

Pipette 10 ml Greiner bio one GmbH, Frickenhausen

Pipette 200 µl Eppendorf AG, Hamburg

Pipette 10 µl Eppendorf AG, Hamburg

Pipettenspitzen in blau, gelb, weiß Eppendorf AG, Hamburg

Pipettierhilfe AcuBoy TecNoMara

Zentrifugenröhrchen 50 ml

Instrumente:

Schere

kleine Pinzette

Skalpell

**Apparate und Geräte:**

Magnetrührer Variomag Telesystem Variomag®, Daytona Beach, USA

Schlauchpumpe IPC-High Precision ISMATEC, Glattbrugg, Schweiz

Mikroskop Axiovert 135 (siehe oben) Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen

Multichannel Dispenser

Spektrometer Specord UV VIS S110 Analytik Jena, Jena

Waage Sartorius BP310S Sartorius AG, Göttingen

Wasserbad Von Keutz Labortechnik, Reiskirchen

Wasserpumpe Lauda A100 Lauda GmbH, Lauda-Königshofen

Zentrifuge Hettich Rotixa/RP Hettich, Tuttlingen

**Medikamente und Reagenzien:**

ATP, ARL 67156, Apyrase (siehe oben)

Ca-Stocklösung: 100 mM CaCl<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O

Isotone Kochsalzlösung 0,9%	Braun Melsungen AG, Melsungen
Kollagenase des Clostridium histolyticum	
Trypanblau	Sigma®, Bodenheim
Medium 199, Penicillin-Streptomycin	GIBCO Life Technologies®, Eggenstein
Mod. Tyrode-Lösung (Zusammensetzung in mM: 150 NaCl, 2,7 KCl, 1,2 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,2 MgSO <sub>4</sub> , 1,0 CaCl <sub>2</sub> , 30,0 N-2-Hydroxethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure; pH 7,4, 37°C)	
Puffer 1 (Zusammensetzung in mM) NaCl 110, KCl 2.6, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.2, MgSO <sub>4</sub> 1.2, NaHCO <sub>3</sub> 25, Glukose 11, 95% O <sub>2</sub> und 5% CO <sub>2</sub> ; pH 7.4, 37°C)	
PBS-Puffer (Zusammensetzung in mM): NaCl 137.0, KCl 2.6, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.5, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 8.1; pH 7.4, 37°C)	
Rinderserum-Albumin (BSA)	
Stocklösung: 10 mM Xestospongine C mit Dimethylsulfoxid (DMSO)	
Trypsin-EDTA, FCS, NCS	GIBCO Life Technologies®, Eggenstein

Alle weiteren Materialien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von den üblichen Herstellern in höchst möglicher Reinheit bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden gemäß den Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

### 2.1.1 Herstellung der Substanzen

Nachfolgend wird die Herstellung der verwendeten Substanzen beschrieben:

Urethan 30%: Herstellung einer 30 prozentigen Lösung durch Zugabe von 125 g Ethylcarbamate auf 417 ml einer physiologischen Kochsalzlösung.

Heparin: Zur Spülung des Carotis-Katheters wurden 200 µl Liquemin (1000 I.E. Heparin) in 40 ml NaCl gelöst.

Fluorescein-Isothiocyanat-markiertes Rattenserumalbumin (FITC-RSA): 3,066 g Albumin und 75 mg FITC (1 mg/1 ml Albuminlösung) wurden in 75 ml PBS-Puffer gelöst (=40 mg/ml) und bei 4°C über Nacht gerührt. Nach Equilibrierung der PD-10-Säulen mit 25 ml PBS-Puffer erfolgte die Zugabe von 2,5 ml Albuminlösung. Diese wurde anschließend mit 4 ml PBS-Puffer aus der Säule gewaschen. Es ergab sich eine Konzentration von 23,75 mg/ml FITC-RSA, die mit der Biuret-Methode bestimmt

wurde. Anschließend erfolgte die Portionierung und Gefriertrocknung von jeweils 1 ml in Eppendorf-Cups. Um eine 7,5%ige Lösung zu erhalten, erfolgte die Auflösung des FITC-RSA eines Cups mit 317 µl einer physiologischen Kochsalzlösung. Die Ratten erhielten 1,5 ml/kg KG i.v. der hergestellten Lösung.

Adenosin – 5´ - triphosphat (ATP): 4-10 mg ATP-Trockensubstanz wurden in 1000 µl physiologischer Kochsalzlösung gelöst, anschließend die errechnete Menge appliziert.

ARL 67156: ARL wurde zu je 2 mg in 100 µl physiologischer Kochsalzlösung in einem Eppendorf-Cup bei -19°C aufbewahrt. Nach entsprechender Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung wurde eine Konzentration von 1,0E-04 Mol/l im Versuchstier angestrebt.

Apyrase: 105 mg Apyrase wurden in 3500 µl physiologischer Kochsalzlösung gelöst und anschließend zu je 100 µl (3 mg ARL) in Eppendorf-Cups portioniert und ebenfalls bei -19°C eingefroren. Nach entsprechender Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung wurde eine Konzentration von von 1 E/ml im Versuchstier angestrebt.

## 2.2 Methodik zur Bestimmung der *in vitro*-Makromolekülpermeabilität

Zur Messung der Permeabilität wurde ein Zweikammersystem (Abb. 4) verwendet, deren Kompartimente durch eine Filtermembran voneinander getrennt sind. Die Filtermembran war im luminalen Kompartiment von einem Endothelzell-Monolayer definierter Zellzahl bedeckt (Noll et al. 1995).

Als Basismedium in beiden Kompartimenten diente eine modifizierte Tyrode-Lösung (Zusammensetzung in mM: 150 NaCl, 2,7 KCl, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 1,0 CaCl<sub>2</sub>, und 30,0 N-2-Hydroxethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure; pH 7,4, 37°C) ergänzt mit 2% (V/V) hitzeinaktiviertem NCS (10 Minuten bei 55° C). Zwischen den einzelnen Kompartimenten bestand keine hydrostatische Druckdifferenz.

Das „luminale“ Kompartiment hatte ein Volumen von 2,5 ml und enthielt neben der Endothelzellschicht zusätzlich Trypanblau-markiertes Albumin (60 µM), während das „abluminale“ Kompartiment ein Volumen von 9,5 ml besaß und lediglich das Basismedium enthielt.

Mittels Spektrophotometer, welches in einem Zwei-Wellenlängen-Modus arbeitete (Wellenlänge zur Messung von Trypanblau: 600 nm, versus Kontroll-Wellenlänge: 720 nm), wurde das Erscheinen des Trypanblau-markierten Albumins im abluminalen Kompartiment kontinuierlich detektiert. Dementsprechend wurde das abluminale Medium rezirkulierend über eine Durchfluß-Küvette des Spektrophotometers gepumpt und die Konzentration des Trypanblau-markierten Albumins mit einer kurzen Zeitverzögerung von weniger als 15 Sekunden bestimmt.

Die Konzentration des markierten Albumins im luminalen Kompartiment wurde während der Inkubationszeit in Abständen von jeweils 10 Minuten ermittelt. Sie änderte sich im Zeitrahmen des Experiments nicht signifikant.

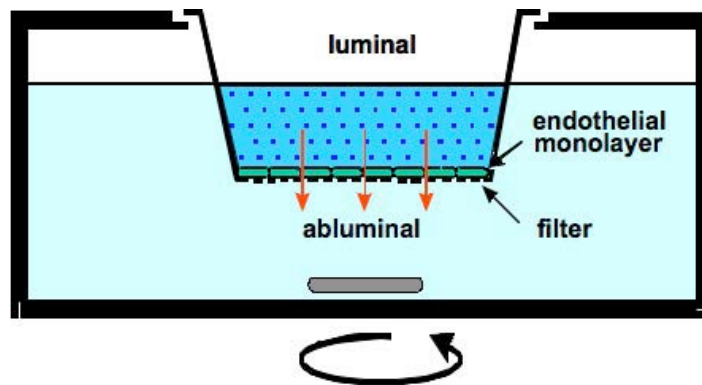
Der Albuminfluß (**F**, angegeben in mol/(sek x cm<sup>2</sup>)) durch die Endothelzellschicht mit der Fläche (**S**) wurde bestimmt durch den Anstieg der Albuminkonzentration (**d[A]<sub>2</sub>**) während des Zeitintervalls (**dt**) im abluminalen Kompartiment mit dem Volumen (**V**):

$$F = \frac{d[A]_2/dt \times V}{S} \quad (I)$$

Der Permeabilitätskoeffizient (**P**, angegeben als cm/s), der Kombination aus Zell-Monolayer und Filtermembran, wurde wie folgt berechnet:

$$P = \frac{F}{([A]_1 - [A]_2)} \quad (II),$$

wobei  $[A]_1$  und  $[A]_2$  die Albuminkonzentrationen im luminalen und abluminalen Kompartiment darstellen. Da die treibende Kraft  $([A]_1 - [A]_2)$  im Laufe des Experimentes praktisch konstant blieb, entsprechen die relativen Veränderungen von  $(F)$  denen des Permeabilitätskoeffizienten  $(P)$ .



**Abbildung 4:** Zweikammersystem zur Bestimmung der endothelialen Permeabilität, schematische Darstellung

Bei Verwendung eines unbehandelten endothelialen Monolayers änderte sich der Albuminfluss während des gesamten Beobachtungszeitraumes nicht.

## 2.2.1 Zellkultur

### 2.2.1.1 Herkunft der Endothelzellen

Die verwendeten mikrovaskulären Endothelzellen wurden, wie von Piper et al. beschrieben, aus den Koronarien von vier 250 g schweren männlichen Wistar-Ratten isoliert (Piper et al. 1990) und vom Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

### **2.2.1.2 Isolation und Kultivierung**

Nach Exzision der Herzen wurden diese in zwei Langendorff-Systemen mit einem Puffer (zusammengesetzt aus (in mM) 110 NaCl, 2,6 KCl, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11 Glukose) und einer Kollagenase-Lösung 30 Minuten bei 37°C rezirkulierend perfundiert und mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> begast. Dann wurden die Vorhöfe entfernt und das Myokardgewebe in kleine Stücke geschnitten. Diese wurden für 10-15 Minuten im Medium mit einer Pipette zerrieben und das Material anschließend durch ein Nylon-Netz filtriert und zentrifugiert. Dem Überstand wurde 200 mg BSA hinzugegeben und mit 10 mg Trypsin und 30 µl Stocklösung in einem Teflon-Becherglas 30 Minuten lang bei 37°C trypsinisiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Pellet in zu jeweils 25 ml in drei Petrischalen bei 37°C inkubiert. Nach vier Stunden vorsichtig schütteln, das Medium erneuern. An jedem darauffolgenden Tag wird das Medium erneuert. Am fünften Tag enthalten die Schalen konfluente Endothelzell-Monolayer mit  $6-10 \times 10^6$  Zellen/100 mm-Schale (dies entspricht ca.  $1-2 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>).

Die konfluierenden Kulturen der primären Endothelzellen wurden in PBS (zusammengesetzt aus (in mM) 137 NaCl, 2,7 KCl, 1,5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 8,0 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, bei pH 7,4, ergänzt mit 0.05% (wt/vol) Trypsin, und mit 0,02% (wt/vol) EDTA) trypsinisiert und mit einer Dichte von  $7 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf runde, 24 mm große Polycarbonat-Filter (mit einer Poren-Größe von 0,4 µm) ausgesät und kultiviert.

### **2.2.1.3 Zellidentifikation**

Die Experimente wurden mit konfluierenden Endothel-Monolayern vier Tage nach deren Aussaat durchgeführt. Die Identifikation der Endothelzellen erfolgte anhand der typischen „Pflasterstein“-Morphologie konfluenter Endothelzellen und mit Hilfe fluoreszenzmarkierten Dil-ac-LDLs, welches von vitalen Endothelzellen aufgenommen wird.

## **2.2.2 Experimentelle Bedingungen**

Zu Beginn wurden die Endothelzellschichten in die Inkubationskammer überführt, in der sich als Inkubationsmedium die bereits erwähnte Tyrode-Lösung befand (Zusammensetzung siehe oben).

Im Anschluss an eine zwanzigminütige Äquilibrierungsphase wurde die basale Permeabilität der Endothelzellen über einen Zeitraum von 20 Minuten bestimmt.



Danach erfolgte die Applikation der angegebenen Substanzen, deren Auswirkungen im Hinblick auf die Permeabilität des markierten Albumins für weitere 90 Minuten beobachtet wurde. Eine Stammlösung von ATP (10 mM) wurde kurz vor Verwendung mit doppelt destilliertem Wasser und die Stocklösung von 10 mM Xestospongin C mit Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Alle durchgeführten Kontrollversuche enthielten dieselbe Endkonzentration von DMSO. Die Stammlösungen aller anderen Substanzen wurden in Basalmedium zubereitet (Zusammensetzung siehe oben) und in einer Endkonzentration von  $\leq 0.1$  % (vol/vol) eingesetzt.

## **2.3 Methodik zur Bestimmung der *in vivo*-Makromolekülpermeabilität**

### **2.3.1 Versuchsbedingungen**

Für die valide Durchführung der *in vivo*-Versuchsreihe mussten zu Beginn Bedingungen geschaffen werden, die eine wiederholbare Durchführung der Versuche mit Hilfe einer standardisierten Methodik möglich machten. Der Versuchsaufbau wurde bereits durch vorhergehende Arbeitsgruppen (Laux et al., 1995; Leithauser et al., 2002) etabliert und durch geringe Änderungen modifiziert.

Unter schonender Präparation und Beobachtung des ausgelagerten Mesenteriums wurden zunächst Referenzwerte für die mikrovaskuläre Permeabilität in Form einer Kontrollgruppe etabliert. Für das Aufsuchen geeigneter Gefäßareale wurde das intravitalmikroskopische Verfahren der Transilluminalmikroskopie verwendet, wohingegen die Plasmaextravasation von FITC-markiertem Rattenserumalbumin als indirekter Marker der endothelialen Permeabilitätserhöhung mit der Methode der Epiillumination (Fluoreszenzmikroskopie) dargestellt wurde.

### **2.3.2 Problemstellungen**

Im Folgenden soll auf besondere Problemstellungen und Störgrößen des Versuchsablaufes eingegangen werden:

- 1) Zur notwendigen individuellen Positionierung der Ratte bzw. des ausgelagerten Mesenteriums unter dem Mikroskop hat sich eine speziell angefertigte Plexiglasplatte mit eingelassenem Objektträger etabliert, die sich mit dem Objekttführer über den Tisch bewegen lässt. Die Reinigung des eingelassenen Objektträgers erfolgte ausschließlich mit Leitungswasser und desinfizierenden Lösungen, da Spülmittelrückstände das Mesenterium chemisch irritieren können.

- 2) Als geeignete und bewährte Narkoseform hat sich die intramuskuläre Injektion des Narkotikums Urethan erwiesen. Diese hat einen nur sehr geringen Einfluss auf systemische Parameter, wie Blutdruck, kardiale Auswurfleistung und Atmung und damit auch auf die Perfusion der mikrovaskulären Endstrombahn. Nach einmaliger Verabreichung führte dies zu einer finalen Anästhesie mit, bis auf Ausnahme der atemabhängigen Thoraxexkursionen, einer ausbleibenden Eigenbewegung des narkotisierten Tieres. Im weiteren Versuchsverlauf zeigten sich nur geringe Änderungen der Vitalparameter im Sinne einer langsamen, kontinuierlichen Abnahme des arteriellen Mitteldrucks im Vergleich zum Ausgangswert.
- 3) Um möglichst geringe Störeinflüsse zu erreichen, war eine schonende Präparationstechnik von immenser Bedeutung für die weitere Interpretation der ermittelten Versuchsergebnisse. Schon geringste Traumata während der Präparation können unter Umständen zu artifiziellen Mikrozirkulationsschäden führen. Deshalb wurde vor allem das Auslagern und Ablegen des Mesenteriums unter Vermeidung geringster mechanischer Irritationen durchgeführt. Anschließend wurde der ausgelagerte Darm während der gesamten Beobachtungszeit mit NaCl-getränktem Zellstoff und einer Latexschicht abgedeckt, um einer weiteren Austrocknung entgegenzuwirken. Das abgelegte Mesenterium-Areal wurde aus demselben Grund, aber auch um diffusionsbedingte Verluste des intravasalen FITC-markierten Albumins zu vermeiden, mit 37°C warmem Paraffinöl überschichtet. Die Darmtemperatur musste von Beginn der Präparation bis zum Ende der Untersuchung 37°C betragen, um eine temperaturinduzierte Beeinflussung der Mikrozirkulation zu vermeiden. Dies ermöglichte ein beheiztes und individuell regulierbares Mikroskopobjektiv in Verbindung mit zwei Temperatursonden. Zusätzlich wurde ein handelsüblicher Wärmeschutzfilter der Firma Leitz in den Strahlengang geschaltet.

Bei der Präparation der Arteria carotis zwecks Katheterisierung kann es aufgrund der topographischen Nähe des Nervus vagus zu Irritationen des Nerven verbunden mit Perfusionsstörungen innerhalb der mesenterialen Strombahn kommen. Daher wurde der Nerv mitsamt seiner Bindegewebsscheide vorsichtig von der Arterie abpräpariert und somit von der Gefäßligatur ausgespart.

- 4) Aus eigenen Erfahrungen und denen vorhergehender Arbeitsgruppen erwies sich die Verwendung von Versuchstieren mit einem Körpergewicht von 300 bis 450 g als besonders sinnvoll. Bei Ratten mit geringerem Körpergewicht zeigte sich oftmals keine zufriedenstellende Menge oder Morphologie mesenterialer Gefäßabschnitte, während der hohe Fettgehalt des Mesenteriums bei Tieren mit größerem Körpergewicht keine verwertbaren Gefäße auffinden ließ.
- 5) Die Äquilibrationsphase zwischen Präparationsende und Beobachtungsbeginn wurde auf 20 Minuten festgelegt. Innerhalb dieses Zeitraumes konnten sich nach dem präparationsbedingten Trauma wieder annähernd physiologische Perfusionsverhältnisse einstellen.
- 6) Um eine optimale Kontrastierung der Lumineszenz des in der Blutbahn befindlichen FITC-gekoppelten Albumins im Vergleich zur Umgebung zu erzielen, wurde auf ein bereits etabliertes adäquates Filtersystem der Firma Leitz zurückgegriffen (siehe Material). Zu beachten ist jedoch bei der Beleuchtung des Beobachtungsfeldes, dass eine dauerhafte Beleuchtung mit der Halogenlampe zu erheblichen Gewebsschäden führen kann. Daher wurde die Beleuchtungsdauer mit ca. 1 bis 2 Minuten in einem Zeitintervall von 10 Minuten auf ein Minimum beschränkt.
- 7) Die Versuchsdauer wurde auf 110 Minuten festgelegt.
- 8) Die zu schnelle intravenöse Applikation von ATP kann unter Umständen zu irreversiblen Rhythmusstörungen, Blutdruckabfällen und damit letztlich zum Tod des Versuchstieres führen. Deshalb wurden die Substanzen langsam unter Kontrolle der Vitalparameter infundiert.

### **2.3.3 Experimenteller Ablauf**

#### **2.3.3.1 Vorbehandlung**

Die Tierexperimente wurden nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes von 1993 und der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Der Tierversuchsantrag wurde von der ortsansässigen Tierschutzkommission überprüft (Permissionsnummer V 54-19 c 20-15 (1) GI 20/10 Nr. 13/2004).

Alle Versuchstiere wurden in einem klimatisierten Raum artgerecht in einem rostfreien Stahlkäfig und unter Verwendung des üblichen Laborfutters gehalten.

### 2.3.3.2 Narkose des Versuchstieres

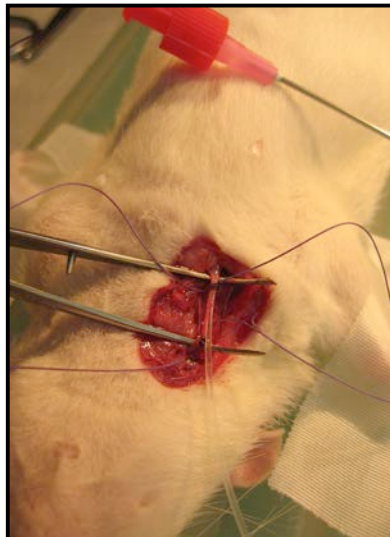
In einem fünf Liter Becherglas wurde eine männliche CD-Ratte mit einem Körpergewicht von 300-450 g mit 2 ml verdampftem Isoflurane vornarkotisiert. Nach ausbleibendem Schmerzreflex und fehlender Eigenbewegung, aber noch vorhandener Spontanatmung, erfolgte die intramuskuläre Injektion von insgesamt 6 ml/kg KG einer 30-prozentigen Urethanlösung zu jeweils zwei Depots in beide Oberschenkel. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde nach ca. 40-45 Minuten erreicht und durch das Erlöschen des Cornealreflexes überprüft.

### 2.3.3.3 Präparation

Nach sorgfältiger Rasur des Halses und des linksseitigen Abdomens erfolgte die Fixation des Versuchstieres auf einer vorgeheizten 37°C warmen Wärmeplatte (Abb.5).



**Abbildung 5:**  
*Lagerung des Versuchstieres*



**Abbildung 6:**  
*Kanülierung der Vena jugularis interna*

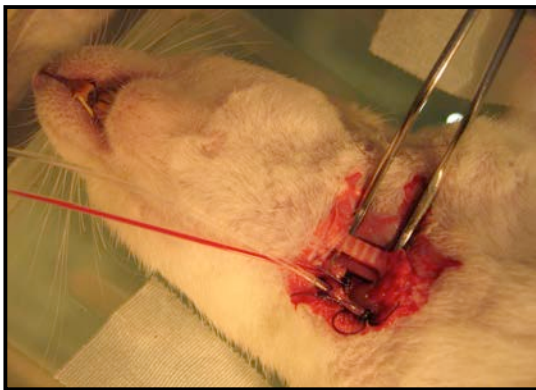


**Abbildung 7:**  
*Freilegung der Arteria carotis*

Nach einem ca. 2 cm langen Schnitt am Vorderrand des Musculus sternocleidomastoideus gelangt man an die relativ oberflächlich gelegene Vena jugularis interna. Diese wurde nach einer kleinen Inzision mit der Mikroschere mit dem oben beschriebenen Katheter-System kanüliert und mit 1,2 ml/h isotoner Kochsalzlösung zur Kompensation der intraoperativen Flüssigkeitsverluste perfundiert (Abb. 6). Etwas tiefer gelegen erreicht man die Arteria carotis interna, in

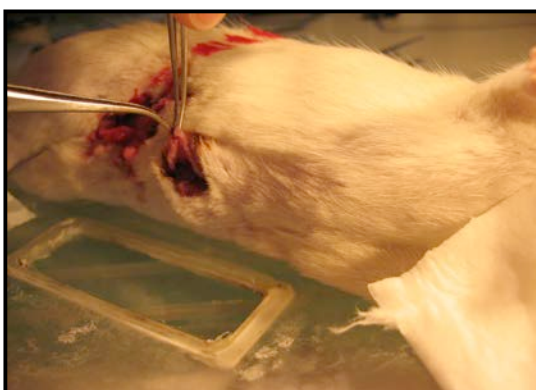
deren unmittelbarer Nachbarschaft sich der Nervus vagus befindet (Abb. 7). Nach vorsichtigem Freipräparieren des Nerven mitsamt der Bindegewebsscheide der freiliegenden Arterie, setzt man eine Gefäßligatur nach cranial und macht ebenfalls eine kleine Inzision des Gefäßes mit der Mikroschere. Nach Kanülierung der Arterie erfolgte eine Spülung des Katheters mit der oben beschriebenen Heparin-Lösung. Die verabreichte Menge war dabei so gering, dass kein therapeutischer Effekt zu erwarten war.

Zur Unterstützung der Spontanatmung wurde etwas weiter medial die Trachea aufgesucht, freipräpariert und nach einer kleinen Inzision mit einem ca. 3 cm langen Silikonschlauch intubiert (Abb. 8).



**Abbildung 8:** *Präparation der Trachea*

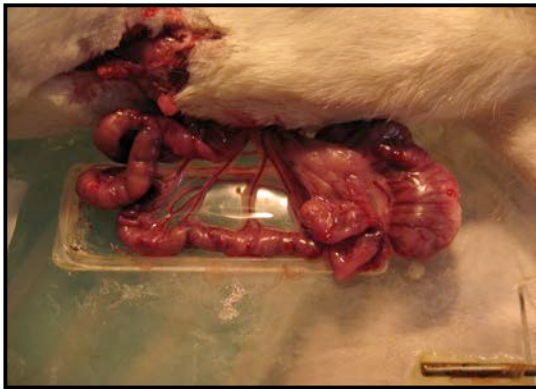
Der Bauchschnitt erfolgte, nach sorgfältiger feuchter Abdeckung des Präparationsareals am Hals, mit einem Elektrokauter und verlief ca. 1,5 cm lateral der Mittellinie vom Rippenbogen bis zur Regio inguinalis. Im Anschluss wurde das Versuchstier auf der gereinigten Plexiglas-Platte in Linksseitenlage fixiert (Abb. 9).



**Abbildung 9:** *Laparatomie*

Zunächst wurden das Caecum und eine terminale Ileumschlinge unter leichtem Zug aus dem Abdomen gezogen, auf der Plexiglasplatte abgelegt und mit einem feuchten Zellstoff-Tupfer und einem Latexstück abgedeckt. Unter ebenfalls leichtem Zug und

möglichst geringer mechanischer Irritation wurden nun weitere Darmschlingen aus dem Abdomen gezogen bis ein Ablegen des möglichst fettfreien Mesenteriums auf dem Objektträger unter geringer Spannung möglich war. Der ausgelagerte Darmabschnitt wurde umgehend mit 37°C warmem Paraffinöl überschichtet und lagerte sich daraufhin durch den Druck des vorsichtig aufgetropften Öls komplett dem Objektträger an (Abb. 10). Die das abgelegte Mesenterium umgebenden Darmschlingen wurden, wenn aufgrund starker Peristaltik notwendig, mit Klebeband fixiert. Sämtliche für die Aufnahme nicht notwendigen Darmabschnitte wurden auf der Plexiglasplatte abgelegt, mit feuchtem Zellstoff und Latexfolie abgedeckt und so vor der Austrocknung geschützt.



**Abbildung 10:** *Ablegen des Mesenteriums*

Im Anschluss erfolgte die Platzierung der Mikroskopierplatte auf dem bereits auf 37°C vorgeheizten Mikroskopiertisch und die Einstellung der verwendbaren Gefäßabschnitte (Abb. 11). Über den venösen Katheter wurde wiederum physiologische Kochsalzlösung (1,2 ml/h) perfundiert, während über den arteriellen Zugang mit Hilfe des oben genannten Druckaufnehmers und Monitors eine kontinuierliche Blutdruckmessung und -registrierung erfolgte. Im Rektum des Versuchstieres wurde eine Temperatursonde platziert, um eventuelle Änderungen der Körpertemperatur registrieren zu können.



**Abbildung 11:** *Intravitalmikroskopie*

#### **2.3.3.4 Equilibrium**

Nach Beendigung der Präparation wurde eine Äquilibrierungsphase von 20 Minuten eingehalten, um physiologische Flussverhältnisse innerhalb der mesenterialen Mikrozirkulation zu erreichen.

#### **2.3.3.5 Durchgeführte Messungen**

Bei allen Versuchen wurden die nachfolgend aufgeführten Messungen bzw. Maßnahmen durchgeführt:

##### **1. MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER MIKROZIRKULATION**

##### **2. BLUTDRUCK**

Der arterielle Blutdruck (systolisch, diastolisch, Mitteldruck) wurde über den Druckaufnehmer im Kathetersystem der A. carotis mit einem Monitorsystem kontinuierlich registriert und alle 20 Minuten im Protokoll dokumentiert.

##### **3. KÖRPERTEMPERATUR**

Aufgrund des erheblichen Einflusses der Temperatur auf die Hämodynamik wurde während des gesamten Versuches die Rektaltemperatur des Versuchstieres gemessen und die Temperatur des Mikroskopierfeldes mit Hilfe eines beheizbaren Mikroskoptisches konstant auf 37 °C gehalten. Diese wurden ebenfalls alle 20 Minuten dokumentiert.

##### **4. RAUMTEMPERATUR**

Da ebenfalls die Umgebungstemperatur auf die Mikrozirkulation Einfluss ausüben könnte, wurde diese konstant gehalten.

##### **5. MESSUNG DER EXTRAZELLULÄREN ATP-KONZENTRATION**

Nach Abnahme weniger Tropfen arteriellen Blutes wurden zu jeweils 20 µl Blut eine ebenso große Menge eines Luciferin/Luciferase-Gemisches pipettiert und anschließend kurz mit geringer Drehzahl auf einem Rührgerät vermischt. Mit Hilfe eines Luminometers wurde basierend auf der Lumineszenz der Luciferin/Luciferase-Reaktion alle 10 Minuten die Konzentration des extrazellulären ATP bestimmt.

##### **6. BESTIMMUNG DES HERZ-GEWICHTES**

Nach Versuchsende wurde das getötete Tier thorakotomiert und das Herz am Abgang der venösen Gefäße, sowie der Aorta und der Pulmonalarterie sorgfältig abpräpariert. Im Anschluss wurden sämtliche noch erkennbare Bindegewebsstrukturen vom Herzen entfernt, so dass lediglich das Myokard

verblieb. Nach sorgfältigem Abtupfen und Bestimmung des Feuchtgewichts wurde das Herz in einem Glasröhrchen 48 Stunden bei ca. 80°C in einem Brutschrank getrocknet. Jeweils nach 24 und 48 Stunden wurde erneut das Gewicht des Herzens bestimmt.

## **2.3.4 Intravitalmikroskopie und Videodokumentation**

### **2.3.4.1 Mikroskop und Hardware-Konfiguration**

Die intravitalen Untersuchungen wurden mit dem invertierten Mikroskop Axiovert 135 von ZEISS durchgeführt (siehe Material). Die Transilluminationsmikroskopie wurde mit dem LD-Achroplan 0,60/x40 (400-fache Vergrößerung) durchgeführt. Die Anregung des intravasalen FITC-RSA erfolgte mit der Quecksilberdampf Lampe HBO 50 W. Als Filterkombination für das FITC spezifische Anregungsmuster diente der FITC/TEXAS red 485/578 von ZEISS. Im Strahlengang des Mikroskops befand sich die 3CCD Videokamera von SONY, deren Belichtungsautomatik für die Dauer der Versuche abgeschaltet wurde. Das Ausgangssignal der Kamera war mit einem Videorekorder verbunden, der die eingestellten Gefäßareale in Echtzeit aufnahm. Über eine RS-232 Schnittstelle war der Videorekorder mit einem IBM-kompatiblen PC verbunden und steuerbar. Der zwischengeschaltete Monitor diente der Betrachtung der Mikrozirkulation und der späteren computergestützten Auswertung der Videoaufnahmen. Diese ermöglichte die Digitalisierung der Videobilder in Echtzeit bei einer Auflösung von 512x512 Bildpunkten mit 256 Graustufen.

### **2.3.4.2 Transillumination (Durchlichtmikroskopie)**

Mit der Übersichtsvergrößerung (50-fache Vergrößerung) wurde der auf dem Objektträger abgelegte Abschnitt des Mesenteriums zu Beginn jeder Aufzeichnung auf präparationsbedingte Artefakte (z.B. Lufteinschlüsse bedingt durch das Paraffinöl) und Gewebeschäden (z.B. Risse, Blutungen) untersucht. War ein präparationsbedingter Schaden aufgetreten, wurde der Versuch abgebrochen. Über einen Zeitraum von 110 Minuten wurden möglichst viele Gefäßabschnitte mit optimalen Bedingungen eingestellt und deren Verlauf zwecks Wiedererkennung mit verschiedenfarbigen Stiften auf dem Monitor gekennzeichnet. Die Abstände zwischen den Einstellungen wurden auf 10 Minuten festgelegt. Die Präparatbeleuchtung wurde unmittelbar nach jedem Untersuchungsgang ausgeschaltet, um die Temperatur des ausgelagerten Mesenteriums konstant zu



halten. Alle Versuche in Durchlichtmikroskopie wurden mit 400-facher Vergrößerung durchgeführt.

#### **2.3.4.3 Epiillumination (Fluoreszenz-Mikroskopie)**

Nach Ausschluss eines Gewebeschadens erhielten die Versuchstiere zwei Minuten vor Aufnahmebeginn die oben erwähnte Menge an FITC-RSA. Bei der Verabreichung war zu beachten, dass die Infusion des relativ zähflüssigen FITC-RSA sehr langsam erfolgen musste, da es andernfalls zu okklusiven Effekten im Gefäßsystem und unbeherrschbaren Blutdruckanstiegen kommen konnte. Kam es direkt zu Beginn der Aufnahme zu Austritten von FITC-RSA ins perivaskuläre Gewebe, so zeigte dies einen artifiziellen Schaden an und führte demnach zum Versuchsabbruch. Anschließend erfolgte die Einstellung eines Gefäßareals der mikrovaskulären Endstrombahn (Arteriole, kapilläres Netzwerk, Venole). Die Videoaufzeichnung wurde über 110 Minuten bei 400-facher Vergrößerung durchgeführt, wobei das Mesenterium nur alle zehn Minuten für ca. 1-2 Minuten der UV-Lampe ausgesetzt wurde.

#### **2.3.5 Auswertung der Videoaufnahmen**

Für die digitale Bildanalyse wurde das computergestützte System „CapImage Ver. 6.02“ von Dr. Dipl. Ing. Zeintl verwendet.

##### **2.3.5.1 Ermittlung der endothelialen Schrankenstörung**

Die Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie wurden hinsichtlich der Veränderungen in der Permeabilität der Mikrozirkulation untersucht. Der Anstieg der Fluoreszenz aufgrund des Austritts des Fluorescein-markierten Albumins ergab einen indirekten Hinweis auf das Ausmaß der endothelialen Schrankenstörung.

##### **2.3.5.2 Definition der Grauwertschwelle**

Das Videobildanalyzesystem ermöglichte eine analoge Auswertung der Videoaufnahmen hinsichtlich einer Veränderung der Leuchtkraft des eingestellten Gefäßareals. Ein Anstieg der Leuchtkraft nach Applikation einer, die Permeabilität beeinflussenden, Substanz führte zu einer definierten Zunahme der Grauwerte im Videoausgangssignal. Die Veränderung der Grauwerte des Videobildes wurde vom Programm über die Veränderung der Pixelzahl gemessen. Die Aufnahmen der Videobänder unterschieden sich in ihrer Leuchtintensität. Dies lag einerseits an der

geringfügig abnehmenden Leistung der Quecksilber-Kurzbogen-Lampe und andererseits an der unterschiedlichen Dichte der farbstoffmarkierten Gefäße. Aus diesem Grund wurde jedes Videoband vor jeder Messung auf einen Grauwertstandard kalibriert. Das bedeutet, dass die Anzahl der Bildpunkte, die sich über einer definierten Grauwertschwelle befinden, gleich ist. Die Extravasation von Makromolekülen wurde in einer Zunahme der Grauwerte über die Zeit gemessen und als integrierte optische Dichte ausgedrückt. Die Konzentration der fluoreszierenden Substanz in den Gefäßen war über die Versuchsdauer konstant und hatte demnach keinen Einfluss auf eine Veränderung der Leuchtkraft.

### **2.3.5.3 Grauwertanalyse**

Die optische Dichte der Videobilder wurde im Abstand von zehn Minuten über 110 Minuten mit jeweils einem, das gesamte Gefäßareal ausfüllenden, Fenster und drei kleinen, direkt in der Nachbarschaft einzelner Gefäßabschnitte befindlichen, Fenstern gemessen. Die Leuchtkraft wurde in Absolutwerten bestimmt und später als prozentuale Zunahme gemessen am Ausgangswert, der als Referenzwert für alle nachfolgenden Werte galt, ausgedrückt.

### **2.3.6 Messung der extrazellulären ATP-Konzentration**

Alle zehn Minuten wurden mit Hilfe des arteriellen Kathetersystems 1-2 Tropfen Blut entnommen. Im Anschluss wurden 20 µl Blut sowie 20 µl eines Luciferin/Luciferase-Gemisches in ein Glasröhrchen pipettiert, dann umgehend mit niedriger Drehzahl auf einem Rührgerät vermischt und im Luminometer die Plasma-Konzentration des extrazellulären ATP gemessen. Für die Lichterzeugung verantwortlich ist ein Reaktionsmechanismus, bei dem unter ATP-Verbrauch eine Carbonsäure (Luciferin) mit einem Enzym (Luciferase) reagiert. Am Ende dieser Reaktion kehrt das Reaktionsprodukt von seinem angeregten Zustand wieder zurück in seinen Ausgangszustand und emittiert dabei ein Photon. Die Menge der abgegebenen Photonen und damit die Leuchtintensität ist proportional zur ATP-Konzentration.

Wichtig bei diesem Verfahren ist der rasche, aber dennoch vorsichtige Umgang mit der Untersuchungssubstanz. Starke Traumatisierung der im Blut befindlichen Erythrozyten bei der Blutabnahme oder beim Pipettiervorgang kann zur Zerstörung einzelner Zellen und damit zu falsch hohen ATP-Plasma-Konzentrationen führen. Rasches Arbeiten ist dennoch erforderlich, da die auf den verschiedenen Blutzellen

befindlichen Ektonukleotidasen vorhandenes ATP sehr schnell abbauen und demnach zu niedrig gemessene Werte entstehen können.

#### **2.4 Tierhaltung und -behandlung**

Die Tiere wurden artgerecht nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und der Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki gehalten und behandelt. Die ortsansässige Tierschutzkommission hat den Tierversuchsantrag geprüft (Permissionsnummer V 54-19 c 20-15 (1) GI 20/10 Nr. 13/2004).

#### **2.5 Datenverarbeitung und statistische Auswertung**

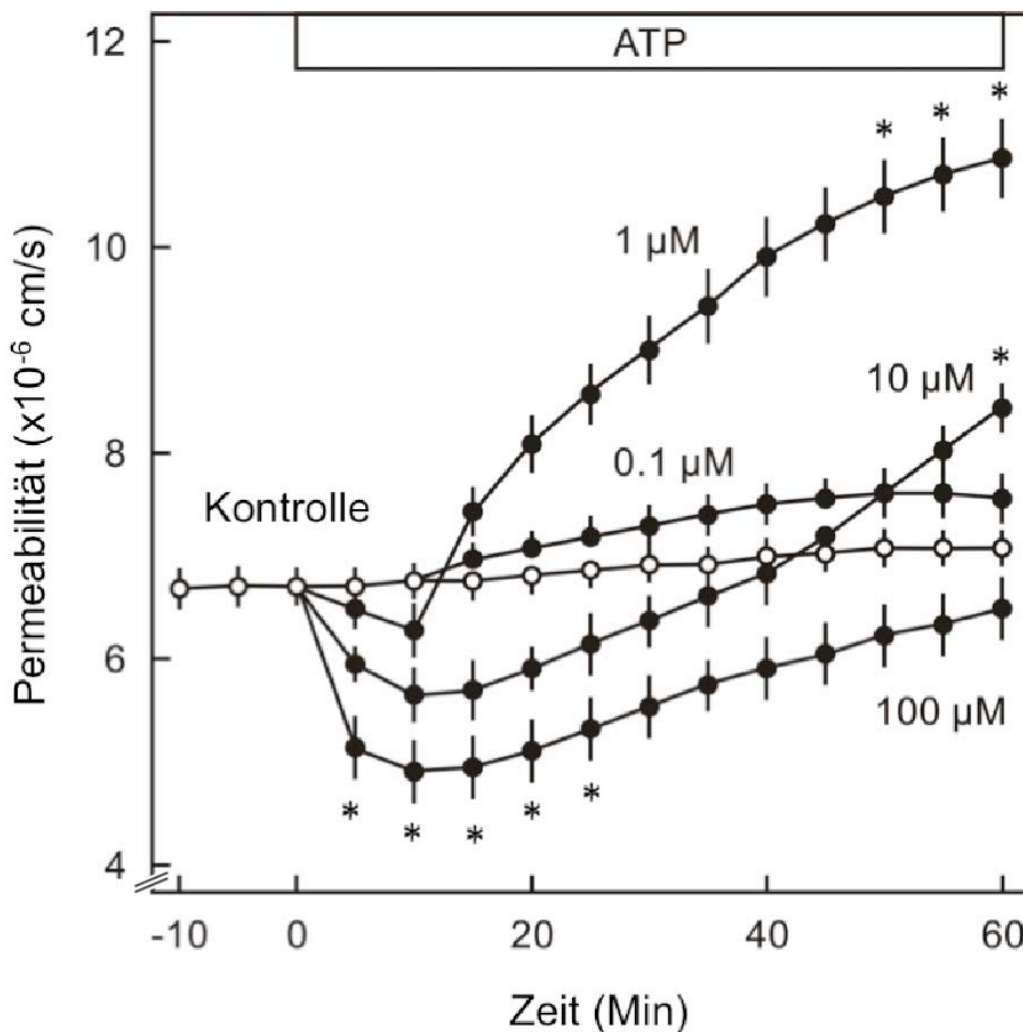
*In vitro* ist der Mittelwert + S.D. von bis zu  $n = 5$  Experimenten unabhängiger Zellpräparationen angegeben, für die *in vivo*-Versuche gilt  $n = 4$  Experimente unabhängiger Tierpräparation. Die statistische Auswertung wurde durchgeführt nach ANOVA in Verbindung mit dem Bonferoni-Test für post-hoc-Analyse. Wahrscheinlichkeitswerte (P) von  $< 0,05$  wurden als signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die endotheliale Schrankenfunktion in isolierten Endothelzellschichten

##### 3.1.1 Der konzentrationsabhängige Effekt von ATP auf die Permeabilität

Extrazellulär eingesetztes ATP in verschiedenen Konzentrationen zeigt einen konzentrationsabhängigen, biphasischen Permeabilitätsverlauf (Abb. 12).



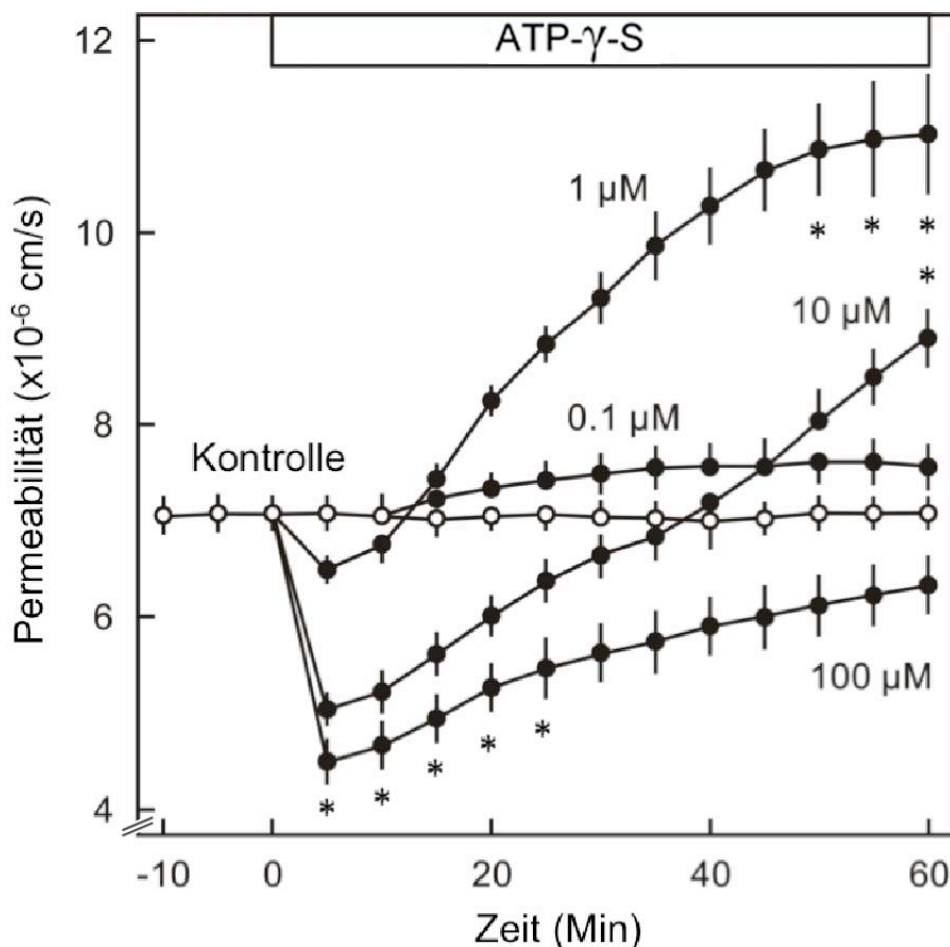
**Abbildung 12:** Wirkungen von ATP (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) auf die Permeabilität endothelialer Zellmonolayer im Vergleich zur Kontrollgruppe, der Beobachtungszeitraum liegt bei 60 Minuten, Daten als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt, \* $p < 0,05$ ,  $n = 5$

ATP führt initial zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Makromolekülpermeabilität in kultivierten Endothelzell-Monolayern und stabilisiert so die endotheliale Barrierefunktion.

0,1  $\mu\text{M}$  ATP bewirkt keinen protektiven Effekt. Es führt zu einem geringen Anstieg der Permeabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe. 1  $\mu\text{M}$  ATP hat hingegen initial einen stabilisierenden Effekt auf die endotheliale Schranke, gefolgt von einem raschen Anstieg der Permeabilität über den gesamten restlichen Beobachtungszeitraum.

Der Einsatz von 10  $\mu\text{M}$  ATP zeigt einen ausgeprägten biphasischen Verlauf. Innerhalb der ersten 45 Minuten nach Verabreichung bleibt die Kurve unterhalb des Niveaus der Kontrollgruppe und überschreitet diese erst im weiteren Verlauf, wohingegen 100  $\mu\text{M}$  ATP nach 60 Minuten weiterhin unterhalb der Permeabilität der Kontrollgruppe liegt.

Abbildung 13 zeigt den Einfluss des ATP-Analogons  $\text{ATP}\gamma\text{-S}$  auf die endotheliale Permeabilität unter Verwendung derselben Konzentrationen wie bei Abbildung 12.



**Abbildung 13:** Wirkungen von ATP $\gamma$ -S (0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) auf die Permeabilität in endothelialen Monolayern im Vergleich zur Kontrollgruppe, der Beobachtungszeitraum liegt bei 60 Minuten, Daten als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt, \* $p < 0,05$ , n = 5

Es zeigt sich ein im Vergleich zur Verwendung von ATP nahezu identischer Kurvenverlauf in den verschiedenen Konzentrationen, so dass der stabilisierende Effekt eindeutig der Wirkungsweise des ATP zuzuschreiben ist.

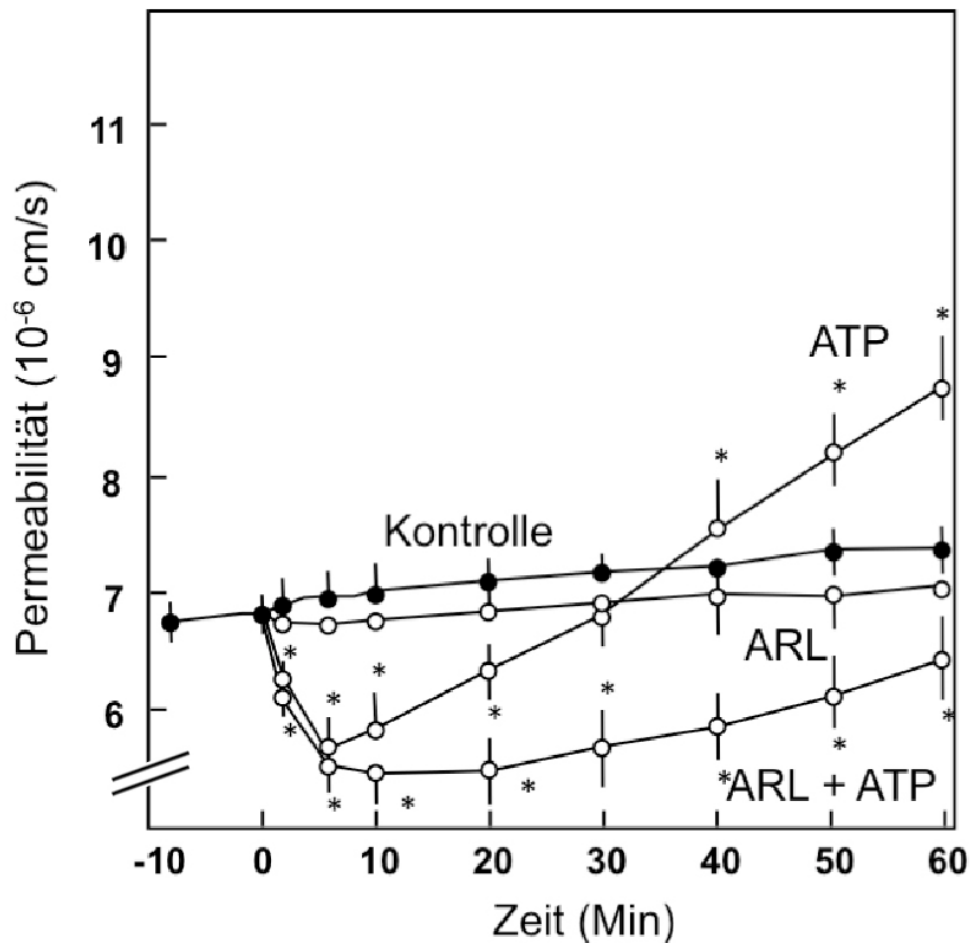
### 3.1.2 Modulation der ATP-Wirkung auf die endotheliale Permeabilität

Um den Effekt auf die Permeabilität nun genauer differenzieren zu können bzw. beurteilen zu können, ob die gezeigte Wirkung allein dem ATP oder doch dessen Abbauprodukten (ADP, AMP, Adenosin) zuzuordnen ist, wurden weitere Versuchsreihen durchgeführt.

Dazu wurde der Ektonukleotidase-Inhibitor ARL verabreicht, der die, unter physiologischen Bedingungen, rasche Metabolisierung von ATP hemmt, so dass der hieraus resultierende Effekt der Wirkung von ATP zugeschrieben werden kann.

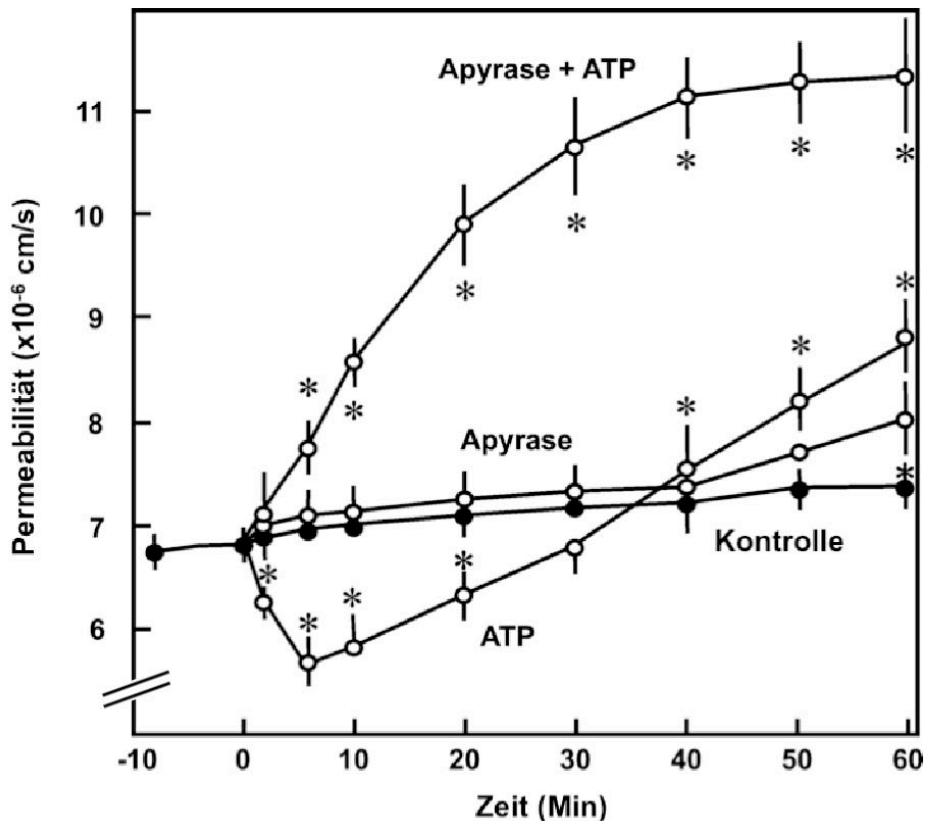
In der Abbildung 14 wird gezeigt, dass die kombinierte Gabe von ARL und 10  $\mu$ M ATP zu einer Absenkung unterhalb des Niveaus der Kontrollgruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum führt.

Die Applikation von ARL alleine bewirkt keine Permeabilitätsänderung. In Kombination mit ATP ist der Ektonukleotidase-Inhibitor in der Lage, den protektiven Effekt des ATP auf die endotheliale Schrankenfunktion weiter zu verstärken. Die rasche Metabolisierung des ATP wird inhibiert und die Wirkung der Metabolite wird dadurch reduziert. Um nun zu verdeutlichen, dass die Metabolite von ATP für das Versagen der endothelialen Barriere verantwortlich sind, wurde in der folgenden Versuchsreihe der Abbau des ATP unter Zugabe von Apyrase, einer löslichen Ektonukleotidase, beschleunigt. Dies hatte zur Folge, dass das applizierte ATP aufgrund seiner sofortigen Metabolisierung keine protektive Wirkung auf das Endothel entfalten konnte.



**Abbildung 14:** Der stabilisierende Effekt auf die endotheliale Permeabilität unter Verwendung des Ektonukleotidase-Inhibitors ARL. Dargestellt ist die alleinige Wirkung von ATP in 10  $\mu$ M Konzentration, ebenso der alleinige Effekt von ARL im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie die kombinierte Verwendung von ATP und ARL, der Beobachtungszeitraum liegt bei 60 Minuten, Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, \* $p < 0,05$ ,  $n = 5$

Abbildung 15 zeigt die Veränderung der Permeabilität unter Verwendung der löslichen Ektonukleotidase CD39 bzw. Apyrase alleine und in Kombination mit ATP.



**Abbildung 15:** Der permeabilitätssteigernde Effekt auf die endotheliale Permeabilität unter Verwendung der löslichen Ektonukleotidase Apyrase. Dargestellt ist die alleinige Wirkung von ATP in 10  $\mu$ M Konzentration, ebenso der alleinige Effekt von Apyrase im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie die kombinierte Verwendung von ATP und Apyrase, der Beobachtungszeitraum liegt bei 60 Minuten, Daten als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt, \* $p < 0,05$ ,  $n = 5$

Apyrase alleine bewirkt erst gegen Ende des Beobachtungszeitraumes einen geringgradigen Anstieg der Permeabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe. In Kombination mit ATP befindet sich die Kurve zu keinem Zeitpunkt unterhalb der Kurve der Kontrolle. Es kommt zu einem sofortigen steilen Anstieg der Permeabilität mit der Ausbildung eines Plateaus am Ende des Beobachtungszeitraumes, welches höher liegt als der Endpunkt der Kurve unter Verabreichung von ATP alleine.

Die hier erhobenen Befunde sind ein Hinweis dafür, dass der biphasische Verlauf der ATP-Kurve auf die unterschiedlichen Effekte der ATP-Metabolite zurückzuführen ist. Spezifische Aussagen über die Wirkung einzelner Metabolite wie ADP, AMP und Adenosin auf die mikrovaskuläre Permeabilität können jedoch auf diesem Wege nicht gemacht werden.



Zu erkennen ist jedoch, dass der initial protektive Effekt auf ATP zurückgeführt werden kann, da sich der Verlauf der Kurve in Kombination mit ARL über den gesamten Beobachtungszeitraum unter die Kontrollgruppe senken lässt. Wird jedoch der Abbau von ATP mit Hilfe der Apyrase gefördert, bleibt die stabilisierende Wirkung des ATP auf die endotheliale Schranke aus, stattdessen kommt vermehrt der permeabilisierende Effekt der Abbauprodukte zum Tragen, was zu einem raschen Anstieg der Kurve führt.

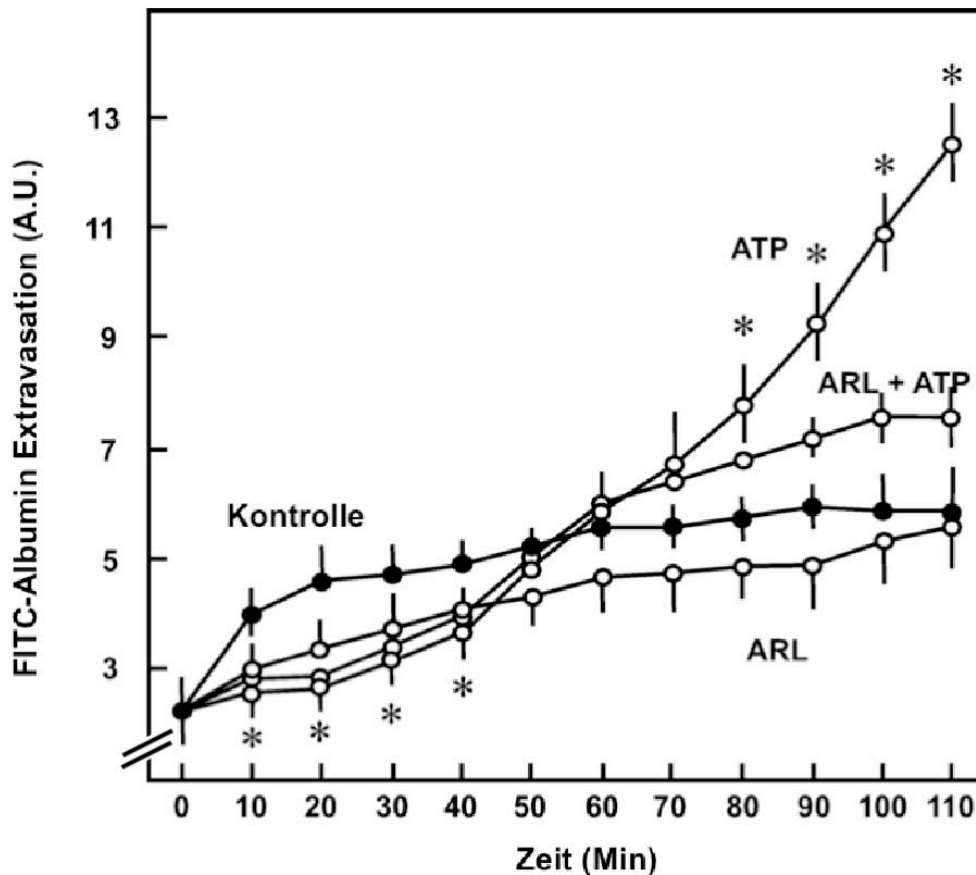
### **3.2 Die endotheliale Schrankenfunktion in Mikrogefäßen der Ratte**

#### **3.2.1 Modulation der ATP-Wirkung auf die endotheliale Permeabilität *in vivo***

In Abbildung 16 ist die Extravasation Fluoreszein-markierten Albumins über einen Beobachtungszeitraum von 110 Minuten dargestellt. Dieser Parameter dient indirekt zur Bestimmung der Permeabilität in den Mikrogefäßen des Rattenmesenteriums.

Im Vergleich zu den Abbildungen der *in vitro*-Versuchsreihe zeigt sich auch hier ein biphasischer Verlauf der ATP-Kurve, die hier innerhalb der ersten 50 Minuten unterhalb der Kurve der Kontrolltiere liegt. Erst im weiteren Verlauf überragt das Ausmaß der Schrankenstörung das der Kontrollgruppe. Steigt die ATP-Kurve über die gesamten 110 Minuten kontinuierlich steil an, so flacht die Kurve bei kombinierter Gabe von ARL und ATP nach 60 Minuten ab und erreicht nach 100 Minuten ein Plateau, welches deutlich unterhalb des Endpunktes der ATP-Kurve liegt.

Der Ektonukleotidase-Inhibitor ARL ist wiederum in der Lage, das Ausmaß der Permeabilitätserhöhung unter Verwendung von ATP zu senken.

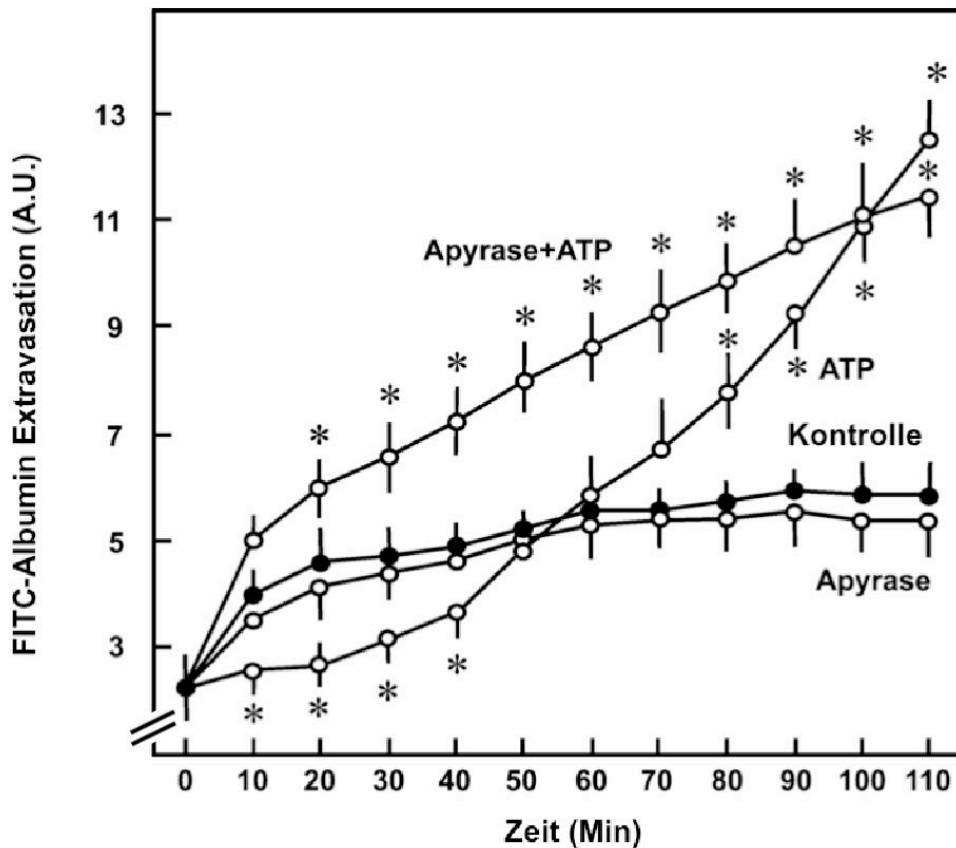


**Abbildung 16:** Der stabilisierende Effekt auf die Mikrogefäß-Permeabilität unter Verwendung des Ektonukleotidase-Inhibitors ARL. Dargestellt ist die Zunahme der FITC-Extravasation bei alleiniger Wirkung von ATP in 10  $\mu$ M Konzentration, ebenso der alleinige Effekt von ARL im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie die kombinierte Verwendung von ATP und ARL, der Beobachtungszeitraum liegt bei 110 Minuten, Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, \* $p < 0,05$ ,  $n = 4$

Wird nun der Abbau von ATP mit Hilfe der löslichen Ektonukleotidase CD39 bzw. Apyrase gefördert (Abb. 17), so zeigt sich ein ähnlicher Verlauf der Kurve wie in Abbildung 15 unter *in vitro*-Bedingungen.

Der biphasische Kurvenverlauf bleibt aus, die Kurve bei Gabe von Apyrase und ATP zeigt einen von Beginn des Beobachtungszeitraumes an bis zu dessen Ende stetigen Anstieg. Jedoch scheint das Ausmaß der Extravasation von FITC-Albumin nach alleiniger Injektion von ATP am Ende des Versuches noch ausgeprägter zu sein, ist jedoch für den durch Apyrase erzielten Effekt zu vernachlässigen.

Die in Abbildung 15 deutlich erkennbare Diskrepanz der Kurvenverläufe kommt aufgrund des hier längeren Beobachtungszeitraumes nicht in gleicher Weise zum Ausdruck.



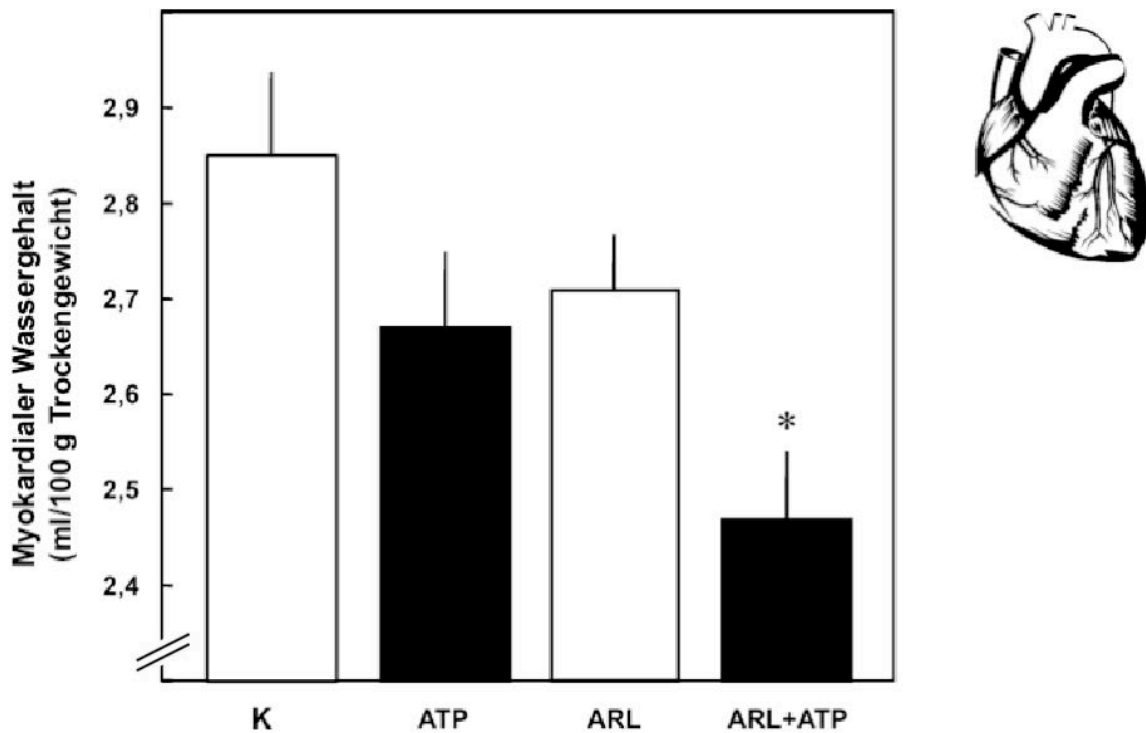
**Abbildung 17:** Der permeabilitätssteigernde Effekt auf die Mikrogefäß-Permeabilität unter Verwendung der löslichen Ektonukleotidase Apyrase. Dargestellt ist die Zunahme der Extravasation von FITC-Albumin mit 10  $\mu$ M ATP alleine, mit 1 E/ml Apyrase und die kombinierte Zugabe von 10  $\mu$ M ATP und 100  $\mu$ M ARL im Vergleich zur Kontrollgruppe, der Beobachtungszeitraum liegt bei 110 Minuten, Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ ,  $n = 4$

### 3.2.2 Die Bestimmung des myokardialen Wassergehaltes nach Versuchsende

In Abbildung 18 ist der myokardiale Wassergehalt der Rattenherzen dargestellt. Bestimmt wurde zunächst das Feuchtgewicht nach Entnahme und Präparation des Herzens direkt nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes sowie das entsprechende Trockengewicht nach 48 Stunden Verweildauer im Brutschrank bei 80°C.

Die Differenz der beiden Werte stellt ein Hinweis für die myokardiale Ödementwicklung dar.

Es ist zu erkennen, dass der myokardiale Wassergehalt bei Gabe des Ektonukleotidase-Hemmstoffes ARL in Kombination mit ATP, signifikant verringert werden kann. Dieses Ergebnis ist ebenfalls ein indirekter Hinweis auf die stabilisierende Wirkung von ARL auf die endotheliale Schrankenfunktion.



**Abbildung 18:** Dargestellt ist der myokardiale Wassergehalt Langendorff-perfundierter Rattenherzen. Verglichen werden 10  $\mu$ M ATP, 100  $\mu$ M ARL sowie die kombinierte Gabe von ATP und ARL im Vergleich zur Kontrolle, bestimmt wurde die Differenz aus dem Feuchtgewicht und dem Trockengewicht nach 48h, Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, \* $p < 0,05$ ,  $n = 4$

## 4. Diskussion

Der Verlust der endothelialen Schrankenfunktion und die damit einhergehende Insuffizienz der mikrozirkulären Strombahn stellt die zugrundeliegende Ursache für die Entwicklung von irreversiblen Gewebe- und Organschäden dar (Czabanka et al. 2007). Im klinischen Alltag stellt die Therapie solcher Krankheitsbilder ein großes Problem dar (Muckart et al. 1997). Eine suffiziente medikamentöse Therapie, die in die Entstehungsmechanismen der endothelialen Schrankenstörung eingreift, existiert bis heute nicht. Die Wirkungsweise extrazellulärer Nukleotide ist schon lange Gegenstand intensiver Forschungsarbeit (Burnstock 2006). In zahlreichen Organsystemen zeigten sich extrazelluläre Nukleotide als wirksame Modulatoren der endothelialen Permeabilität. In den letzten Jahren sind weitreichende Erkenntnisse über die genauen Wirkmechanismen von Mediatoren auf den kontraktilem Apparat von Endothelzellen erlangt worden, die Wirkungsweise der einzelnen ATP-Metabolite in diesem Zusammenhang wird jedoch immer wieder kontrovers diskutiert. So reduzierte ATP in einigen Studien die Permeabilität in der Aorta des Rindes und des Schweines sowie in Endothelzellen humaner Umbilikalvenen und in Koronarien der Ratte (Haselton et al. 1992, Noll et al. 1999; Kolosova et al. 2005, Gündüz et al. 2003 und 2006), erhöhte diese jedoch andererseits in kultivierten mikrovaskulären Endothelzellen der Lunge sowie in mesenterialen Kapillaren von Frosch und Ratte (He et al. 1993 und 1998, McClenahan et al. 2009).

Ziel dieser Arbeit war es nun, den Effekt von ATP und dessen Abbauprodukten, insbesondere des Adenosins, auf die endotheliale Permeabilität zu untersuchen. Die *in vitro* erhobenen Befunde sollten daraufhin im Tiermodell überprüft werden.

Die zentrale Hypothese, die dieser Untersuchung zugrunde liegt, ist, dass ATP bzw. dessen Analoga einen stabilisierenden Effekt auf die endotheliale Schrankenfunktion haben, wohingegen die Metabolite des ATP, insbesondere AMP und Adenosin, einen Anstieg der endothelialen Permeabilität verursachen. Diese Hypothese wurde zunächst an einem Modell mikrovaskulärer koronarer Endothelzellschichten analysiert und anschließend in zwei intakten mikrovaskulären Stromgebieten, den Mesenterial- und Koronargefäßen der Ratte, überprüft.

Die wesentlichen Befunde der Arbeit sind:

- 1) ATP als extrazelluläres Nukleotid stabilisiert konzentrations- und zeitabhängig die endotheliale Schrankenfunktion
- 2) Der Ektonukleotidase-Hemmstoff ARL 67156 unterstützt den stabilisierenden Effekt des ATP auf die endotheliale Schrankenfunktion
- 3) Die Abbauprodukte des ATP erhöhen die endotheliale Makromolekülpermeabilität
- 4) Die am Modell kultivierter koronarer Endothelzellschichten erhobenen Befunde lassen sich auf das Modell intakter mesenterialer sowie koronarer Gefäße der Ratte übertragen

Viele vorangegangene Studien beschäftigten sich mit dem Einfluss von Purinen auf die Permeabilität, sei es an lebenden Organismen, isolierten Geweben und Organen, perfundierten Mikrogefäßen oder mit Hilfe von Endothelzell-Monolayern (Michel et al. 1999). Hinsichtlich der Wirkungsweise des ATP wurden jedoch unterschiedliche Befunde erhoben. Lange Zeit galt ATP als Mediator, der über einen intrazellulären Anstieg der Calcium-Konzentration die endotheliale Permeabilität erhöhe und die perivaskuläre Ödembildung begünstige (He et al. 1993; 1998; Moore et al. 2000; McClenahan et al. 2009). Dem liegt die Aktivierung eines P2Y-Rezeptors zugrunde (Tanaka et al. 2003; 2004).

Erstmals konnte in dieser Arbeit der gegensätzliche Effekt von ATP und seinen Abbauprodukten dargestellt und deren Wirkung in isolierten Endothelzellen mit der in der Mikrozirkulation des Rattenmesenteriums verglichen werden.

Durch den Einsatz des spezifischen Ektonukleotidase-Inhibitors ARL 67156 und der löslichen Ektonukleotidase Apyrase konnte gezeigt werden, dass die erhobenen Befunde eindeutig der Wirkungsweise des ATP bzw. der seiner Metabolite zuzuordnen sind.

Abbildung 12 zeigt, dass extrazelluläres ATP sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig gegensätzliche Wirkungen auf die endotheliale Schrankenfunktion hat. In höherer Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) überwiegt die stabilisierende ATP-Wirkung, bei mittlerer Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) hat ATP initial eine stabilisierende und im späteren Verlauf eine permeabilitätssteigernde Wirkung, die bei geringen Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  überwiegt. Bei der letztgenannten Konzentration ist die stabilisierende Wirkung auf eine kurze Phase nach Zugabe beschränkt.

Eine mögliche Erklärung für die gegensätzliche konzentrations- und zeitabhängige Wirkung von ATP könnte in der Tatsache liegen, dass ATP durch ortsständige Ektonukleotidasen abgebaut wird und dass seine Abbauprodukte gegensätzliche Wirkungen im Vergleich zu ATP auf die Schrankenfunktion haben (Hempel et al. 1996; Bindewald et al. 2004).

Vermutlich ist bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  der Netto-Effekt von ATP so gering, dass seine protektive Wirkung gar nicht erst zum Tragen kommen kann, während aber auch die Wirkung seiner Metabolite nur ansatzweise erkennbar ist.

Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  wirkt möglicherweise lediglich zu Beginn des Versuchs das freie ATP stabilisierend auf die endotheliale Permeabilität, während im Verlauf der enzymatische Abbau des Purins in seine Metabolite die Permeabilität stetig ansteigen lässt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Konzentration des freien, und damit wirksamen Nukleotids im Vergleich zur Dichte an Ektonukleotidasen wesentlich geringer ist, wodurch der sichtbare Effekt den ATP-Metaboliten zugeschrieben werden kann.

Je höher nun die Konzentration an zugegebenem ATP ist, desto stärker ist der permeabilitätssenkende Effekt des Nukleotids zu erkennen. Während bei 10  $\mu\text{M}$  die Permeabilität erst im Verlauf das Niveau der Kontrollgruppe überschreitet, ist die Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ATP vermutlich so hoch, dass durch die ortsständigen Ektonukleotidasen zu keinem Zeitpunkt so viel ATP hydrolysiert wird, dass die Wirkung der Abbauprodukte die des freien ATPs übersteigt. Der biphasische Verlauf der Kurve bei 10  $\mu\text{M}$  ATP kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass zunächst die Menge des zugegebenen ATP so groß ist, dass zwar alle Ektonukleotidasen mit einem Substrat gesättigt sind, jedoch immer noch genügend ATP zur Verfügung steht, um über entsprechende Purinrezeptoren diejenigen Signalkaskaden in Gang zu setzen, die den kontraktilen Apparat der Endothelzellen hemmen und so die endotheliale Barriere stabilisieren. Im weiteren Verlauf erfolgt dann die Metabolisierung vermutlich deutlich schneller als die intrazellulären Wirkmechanismen, so dass das noch vorhandene ATP vollständig bis hin zum Adenosin abgebaut wird und somit der permeabilitätssteigernde Effekt der Metabolite die protektive Wirkung des ATP übersteigt.

Hinweise, die diese Annahmen stützen, geben Versuche mit nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga wie  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  oder Versuche in Gegenwart von Ektonukleotidase-Inhibitoren. So zeigten Kolosova et al., dass  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  zu einer Reduktion von

Entzündungszellen sowie Proteinen in der broncho-alveolären Lavage bei Mäusen mit akuter Lungenschädigung führte (Kolossova et al. 2008).

Für die weiteren Versuchsreihen wurde ATP in 10  $\mu$ M Konzentration verwendet, zum einen, weil bereits andere Arbeitsgruppen diese Konzentration verwendeten, um den Effekt von ATP auf die Permeabilität in Mikrogefäßen zu untersuchen (Noll et al. 1999; Tanaka et al. 2004; Gündüz et al. 2006), aber vor allem, weil sich der biphasische Kurvenverlauf besonders dazu anbietet, den gegensätzlichen Effekt der einzelnen Nukleotide zu untersuchen.

Wie in Abbildung 14 zu erkennen, zeigte sich, dass die im Verlauf auftretende Permeabilitätserhöhung bei alleiniger Gabe von ATP durch die zusätzliche Gabe des Ektonukleotidase-Inhibitors ARL 67156 signifikant verringert werden kann. Kommt es bei alleiniger Zugabe von ATP mit einer Konzentration von 10  $\mu$ M im Verlauf noch zu einem Anstieg der Permeabilität über das Niveau der Kontrollgruppe, so bewirkt die kombinierte Gabe von ATP und ARL 67156 eine Verringerung der Permeabilität während des gesamten Beobachtungszeitraumes.

Diese Beobachtung kann möglicherweise dadurch begründet werden, dass durch Zugabe des Ektonukleotidase-Hemmstoffes ARL 67156 nahezu alle lokal vorhandenen Ektonukleotidasen vom Inhibitor gehemmt werden. Dadurch verzögert sich der hydrolytische Abbau des vorhandenen ATP und die stabilisierende Wirkung des ATP auf die endotheliale Schrankenfunktion wird verstärkt. Bereits in früheren Versuchen zur Wirkung von ARL 67156 zeigte sich, dass die durch ATP hervorgerufene Kontraktion der Harnblase sowie des Vas deferens des Meerschweinchens durch den Ektonukleotidase-Inhibitor verstärkt werden konnte (Westfall et al. 1996; 1997).

Aus vorangegangenen Studien erwies sich eine ARL 67156-Konzentration von 100  $\mu$ M als sinnvoll (Crack et al. 1995; Gündüz et al. 2006). Levesque et al. weisen jedoch darauf hin, dass ARL 67156 zwar der einzige kommerziell erhältliche Ektonukleotidase-Inhibitor sei, dieser jedoch nicht in der Lage sei, jeden Enzym-Typ gleichermaßen zu blockieren und seine blockierende Wirkung mit steigender Substratkonzentration ausbleibe (Levesque et al. 2007).

Auf diese Ergebnisse aufbauend wurden nun Versuche in Gegenwart der löslichen Ektonukleotidase Apyrase durchgeführt.

Abbildung 15 verdeutlicht, dass es nach Zugabe von Apyrase und ATP zu einer unmittelbaren Steigerung der Permeabilität kommt. Dies liegt möglicherweise darin



begründet, dass der protektive Effekt des verabreichten ATP aufgrund der hohen Enzymdichte an hinzugegebenen Ektonukleotidasen nicht zur Geltung kommt. Stattdessen erfolgt vermutlich die Hydrolyse des gesamten ATP zu ADP, AMP und Adenosin, wodurch der Anstieg der Permeabilität der Wirkung des Adenosins bzw. der Intermediärprodukte zugeschrieben werden kann.

Die genauere Differenzierung der Wirkung der einzelnen ATP-Metabolite, insbesondere der des Adenosins, ist Bestandteil weiterer Studien unserer Arbeitsgruppe, weshalb ich an dieser Stelle nicht im Einzelnen darauf eingehen möchte.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der Versuche an kultivierten Endothelzellschichten mit den Versuchen in Mikrogefäßen des Mesenteriums der Ratte *in vivo*, so zeigen sich, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Versuchsdauer, ähnliche Ergebnisse. Zwar ist der Effekt von ARL 67156 *in vivo* (Abb. 16) im Gegensatz zu Abbildung 14 zu Versuchsbeginn noch nicht zu erkennen, im weiteren Verlauf zeigt sich jedoch eine signifikante Verringerung der FITC-Albumin-Extravasation ins perivaskuläre Gewebe. Wenn auch in Abbildung 14 nicht zu erkennen, so kann dennoch spekuliert werden, dass auch dort die Permeabilität im weiteren Verlauf weiter zunehmen wird. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass ARL 67156, wie bereits erwähnt, den ATP-Abbau lediglich verzögert, jedoch nicht vollständig unterbindet, wodurch die Wirkung von ADP, AMP und Adenosin im weiteren Versuchsablauf zur Geltung kommen kann.

Sowohl an kultivierten Endothelzellen als auch in den Mikrogefäßen des Ratten-Mesenteriums bewirkte Apyrase in Kombination mit ATP eine von Beginn an deutliche Zunahme der Extravasation FITC-markierten Albumins. Warum das Ausmaß der Makromolekülpermeabilität jedoch am Versuchsende ein Plateau zu erreichen scheint, während die Permeabilität mit ATP alleine am Versuchsende weiter zunimmt, kann an dieser Stelle jedoch nur vermutet werden. Möglicherweise hat Apyrase *in vivo* selbst oder durch andere Mechanismen ebenfalls einen Einfluss auf die Metabolisierung von Adenosin.

Wichtig zu erwähnen ist außerdem, dass ARL 67156 und Apyrase alleine keinen signifikanten Unterschied in der Makromolekülpermeabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe hervorrufen. Dies mag daran liegen, dass die Menge an physiologisch freigesetztem ATP so gering ist, dass es zu keinem sichtbaren Effekt kommen kann.

Vergleicht man die Kontrollgruppen der beiden Versuchsreihen miteinander, so ist in den Mikrogefäßen des Mesenteriums ein leichter Anstieg der Permeabilität zu verzeichnen, der am ehesten auf die präparationsbedingte Irritation der Gefäße zurückgeführt werden kann.

Aus Abbildung 18 ist zu ersehen, dass der myokardiale Wassergehalt durch ARL 67156 und ATP signifikant gesenkt werden kann. Der Wassergehalt des Rattenherzens am Ende des Versuchs ist somit ein indirektes Maß für die myokardiale Ödembildung und somit für Veränderungen in der Permeabilität der Koronargefäße.

Zu dem gleichen Ergebnis kamen Gündüz et al. als sie den Reperfusionsschaden in Endothelzellen des Rattenherzens untersuchten. Nach Ablauf der Ischämie-Phase zeigte sich unter dem Einfluss von exogen zugeführtem oder spontan freigesetztem ATP eine signifikante Abnahme des myokardialen Ödems im Verlauf der Reperfusion. Dieser Reperfusionsschaden ließ sich durch ARL 67156 weiter verringern. Apyrase hingegen führte zu einer vermehrten interendothelialen Lückenbildung und förderte somit die Ödementstehung (Gündüz et al. 2006).

Leider zeigte sich in unseren Versuchen keine signifikante Abnahme des myokardialen Ödems bei alleiniger Gabe von ATP oder ARL 67156 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen beschäftigt sich zurzeit unsere Arbeitsgruppe mit dem Effekt von ATP und Adenosin auf den Reperfusionsschaden im Anschluss an eine Ischämie des Rattenmesenteriums *in vivo*.

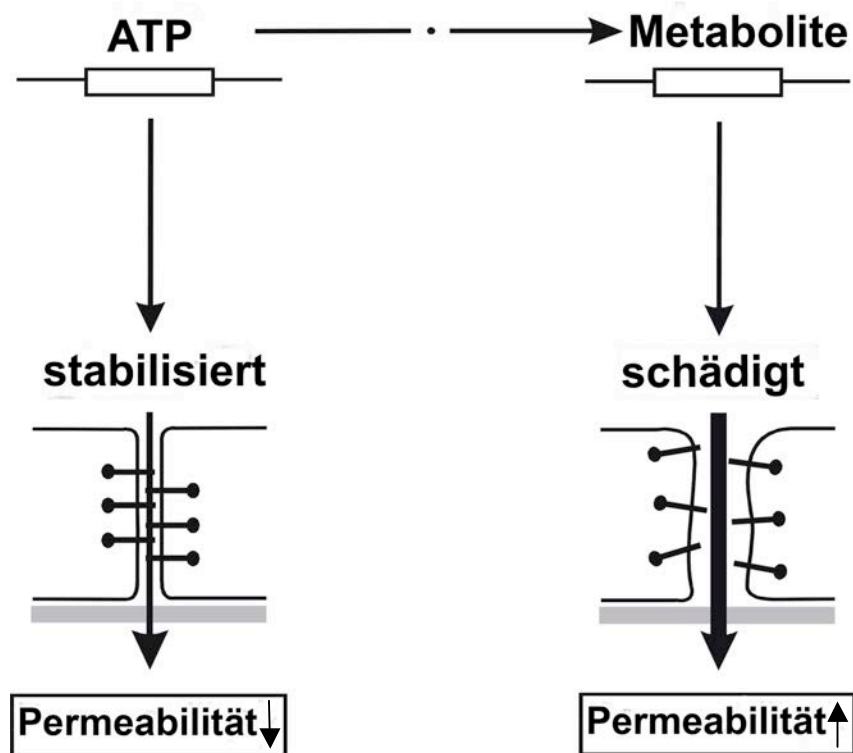
An dieser Stelle möchte ich aber darauf hinweisen, dass *in vivo*-Versuche stets einer Vielzahl an Einflussfaktoren unterliegen, die sich bei der Untersuchung der Permeabilität *in vitro* suffizient kontrollieren lassen oder überhaupt keine Rolle spielen. Die Endothelzellen in Mikrogefäßen eines lebenden Organismus stehen in ständigem Kontakt mit zellulären und humoralen Blutbestandteilen nach luminal, nach abluminal sind die Wechselwirkungen mit dem umliegenden Gewebe, wie zum Beispiel mit den Gefäßmuskelzellen, nicht zu vernachlässigen. In Endothelzell-Monolayern oder isolierten Mikrogefäßen können diese Wechselwirkungen vernachlässigt werden, da die entsprechenden perivaskulären Gewebe nicht vorhanden sind und die Perfusionslösungen dem individuellen Bedarf angepasst werden können. Physiologische Stellgrößen, wie der Perfusionsdruck oder die

Konzentration bestimmter Substanzen, können *in vitro* deutlich leichter beeinflusst und somit Standardbedingungen geschaffen werden. Jedoch stellen auf der anderen Seite Experimente an lebenden Organismen die einzige Möglichkeit dar, den Einfluss bestimmter Substanzen oder anderer Faktoren unter physiologischen Bedingungen untersuchen zu können. Hinsichtlich der Permeabilitätsforschung in Mikrogefäßen ist natürlich Voraussetzung, dass die zu untersuchenden Gefäßareale der Intravitalmikroskopie zugänglich sind, was sich heutzutage immer noch auf wenige Bereiche der Mikrozirkulation beschränkt.

Andere Arbeiten haben bereits gezeigt, in Übereinstimmung mit den hier erhobenen Befunden, dass ATP in der Lage ist, den negativen Einfluss von Entzündungsmediatoren, so zum Beispiel von Thrombin, auf die Permeabilität von Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen bzw. Kornealepithelien des Rinds signifikant zu mindern (Gündüz et al. 2003; Satpathy et al. 2005). Kolosova et al. beschrieben den protektiven Effekt von ATP und seinen nicht-hydrolysierbaren Analoga bezüglich der endothelialen Barrierefunktion *in vitro* sowie *in vivo* (Kolosova et al. 2005 und 2008). Neben einer Hemmung des kontraktiven Apparates der Endothelzellen verursache ATP ein sogenanntes Remodelling bzw. eine Verdichtung der Zell-Zell-Verbindungen mit gesteigerter Ausbildung von Zonulae occludentes, die für die Stabilität der Kontakte verantwortlich sind (Gündüz et al. 2006, Härtel et al. 2007). In den letzten Jahren wird der Glykocalyx als „Bindeglied“ zwischen Gefäßlumen und Endothelzelle eine immer größere Bedeutung in der Ausbildung der endothelialen Barriere beigemessen (Becker et al. 2010). Chappell et al. beschrieben den Abbau der Glykocalyx unter dem Einfluss von TNF-alpha (Chappell et al. 2009), Brands et al. zeigten, dass Adenosin den Abbau der Glykocalyx-Struktur in den Koronarien der Ziege bewirkt (Brands et al. 2010).

Erst kürzlich wurde der Effekt von Intermedin auf den kontraktiven Apparat und die Anwesenheit von VE (vaskulär-endotheliale)-Cadherinen in Endothelzellen des Rattenherzens sowie humanen Umbilikalvenen beschrieben (Aslam et al. 2011).

Der wesentliche Befund dieser Arbeit ist, dass der stabilisierende, also permeabilitätssenkende, Effekt auf die endotheliale Schrankenfunktion der Wirkungsweise des ATP zuzuordnen ist, wohingegen dessen Metabolite die Barriere des Endothels schädigen und so zu einer Erhöhung der Permeabilität führen (Abb. 19).



**Abbildung 19:** Der gegensätzliche Effekt von ATP und dessen Metabolite auf die endotheliale Schrankenfunktion.

Durch den gezielten Einsatz von ATP-Derivaten und durch die zusätzliche Verwendung von Ektonukleotidase-Inhibitoren lässt sich demnach die Entstehung eines „capillary leakage“ wirksam verhindern. Aufgrund des Ausbleibens einer ausgeprägten Ödematisierung des perivaskulären Gewebes wird der suffiziente Stofftransport und Gasaustausch zwischen zirkulierendem Blutvolumen und der Peripherie garantiert. Die Organfunktion bleibt somit erhalten und die Entstehung eines Multiorganversagens aufgrund von Mikrozirkulationsstörungen kann am Anfang seiner Entstehung unterdrückt werden.

Einige Studien haben sich schon mit den zellulären Signaltransduktionskaskaden und Mechanismen beschäftigt. Auf den Einfluss von ATP auf den Phosphorylierungsstatus der Myosin-Leichtketten und die Freisetzung intrazellulärer Calcium-Ressourcen wurde bereits hingewiesen. Die Frage, welche P2-Rezeptoren jedoch im Einzelnen an der stabilisierenden Wirkung des ATP auf die endotheliale Permeabilität beteiligt sind bzw. welche P1-Rezeptoren den permeabilitätserhöhenden Effekt des Adenosins regulieren, muss jedoch in zukünftigen Studien beantwortet werden, um die Basis für eine

pharmakotherapeutische Rezeptorblockade zu schaffen. Aufgrund der Vielzahl der bisher entdeckten P-Rezeptoren bleibt zu bedenken, ob die gezielte Blockade oder Stimulation eines einzigen Rezeptors ausreicht, um den gewünschten Effekt zu erzielen, ist jedoch die Wirkung extrazellulärer Nukleotide stets das Resultat des Zusammenspiels mehrerer Rezeptor-Antworten mit unterschiedlichen Sekundärantworten. So zeigten Neely et al., dass die Blockade des A1-Rezeptors einen protektiven Effekt auf die Entwicklung eines Reperfusionsschadens in der Lunge hat (Neely et al. 1995 und 1997) während Reece et al. den positiven Effekt einer A2A-Rezeptor-Aktivierung und Eckle et al. den Nutzen einer Aktivierung des A2B-Rezeptors betonten (Reece et al. 2005, Eckle et al. 2008). Ebenso sind aktuell Daten zur spezifischen Wirkung einzelner Nukleotide auf verschiedene Purinrezeptoren von unserer Arbeitsgruppe veröffentlicht worden (siehe Kapitel 8).

Weiterhin bleibt jedoch die Frage offen, ob überhaupt und wenn ja, in welcher Dosierung ATP als medikamentöse Substanz verabreicht werden kann, damit einerseits ein therapeutischer Effekt erzielt werden kann und andererseits die Wirkung durch den Abbau der Ektonukleotidasen nicht weitgehend unterbunden wird. Reicht die Konzentration des unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen freigesetzten ATP aus, um durch Minderung dessen Metabolisierung einen messbaren Nutzen zu verzeichnen oder muss die Dosis der Wirksubstanz durch exogene Zufuhr gesteigert werden, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen? Um diese Frage zu beantworten, haben wir die intravasale ATP-Konzentration per Lumineszenz-Verfahren bestimmt. Die Messung unterlag jedoch ausgeprägten methodischen Störgrößen wodurch es zu starken Schwankungen der ermittelten Messwerte kam. Dies ermöglichte es daher nicht, eine sinnvolle Aussage über therapeutische ATP-Spiegel machen zu können, weshalb diese Befunde nicht in den Ergebnissen dieser Arbeit wiederzufinden sind.

Die Ergebnisse dieser Studie sind dahingehend von großem Interesse, da sie die lange bestehende Kontroverse um die Wirkung extrazellulären ATPs auf die Permeabilität von Endothelzellen zu klären versucht. Die isolierten Effekte extrazellulärer Nukleotide wurden in dieser Art wie noch in keiner anderen Studie zuvor miteinander verglichen und deren Gegensätzlichkeit dargestellt.

Durch die Möglichkeit, den protektiven Effekt durch Hemmung des ATP-Abbaus zu verstärken bzw. den negativen Effekt der Abbauprodukte durch Rezeptor-Inhibition

zu unterdrücken, ergeben sich für die medikamentöse Therapie von Mikrozirkulationsstörungen neue und potentiell wirksame Strategien.

Der Vorteil des ATP liegt dabei eindeutig in seiner Eigenschaft als körpereigene Substanz, keinerlei Unverträglichkeiten oder anaphylaktische Reaktionen hervorrufen zu können. Solche Substanzen haben aber auch den Nachteil, dass sie aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens im lebenden Organismus vielfältige Wirkungen in zahlreichen Organsystemen und Geweben hervorrufen können. Gerade ATP als intrazellulärer Energieträger, aber auch aufgrund seiner Effekte als extrazellulärem Nukleotid, sind die systemischen Wirkungen des ATP und seiner Metabolite ADP und Adenosin nicht zu vernachlässigen. Dabei soll an dieser Stelle vor allem noch einmal deren Einfluss auf den Gefäßtonus, das Erregungsbildungs- und -leitungssystem des Herzens und die Thrombogenese erwähnt werden. Bei der Durchführung der Versuche zeigte sich der systemische Effekt der Nukleotide in vielerlei Hinsicht. Direkt nach Applikation der Substanz kam es immer wieder zu deutlichen Bradykardien im Sinne einer Blockade des Reizleitungssystems und zu Blutdruckabfällen, die jedoch jeweils nur von begrenzter Dauer waren. Hinsichtlich einer verstärkten Thrombogenese zeigten sich unter ADP-Einfluss häufiger Verschlüsse einzelner Gefäßabschnitte im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Der Effekt der ATP-Metabolite auf die Ödementstehung in den Myokardiozyten des Rattenherzens ist in Abbildung 18 dargestellt. Anhand dieser Befunde wird deutlich, dass ATP auch einen schützenden Effekt auf die endotheliale Funktion der koronaren Mikrozirkulation ausübt. Wir nehmen an dieser Stelle an, dass sich der gezeigte Effekt, unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Rezeptor- und Enzymprofils, weitestgehend auf die Mikrozirkulation des gesamten Organismus übertragen lässt.

Im Gegensatz dazu stellen Ektonukleotidase-Inhibitoren wie ARL67156, lösliche Ektonukleotidasen wie Apyrase, aber auch spezifische Inhibitoren der P-Rezeptoren sinnvolle therapeutische Alternativen dar, die nur dort wirksam werden, wo extrazelluläre Nukleotide in entsprechend hoher Konzentration vorhanden sind. Da dieser Zustand lediglich unter pathologischen Bedingungen vorzufinden ist, kann man davon ausgehen, dass solche Substanzen vorwiegend dort ihre Wirkung entfalten, wo sie auch benötigt werden.

Mögliche Angriffspunkte für solche Substanzgruppen sind im menschlichen Organismus in nahezu unbegrenzter Zahl vorhanden, wodurch sich eine

therapeutische Option für zahlreiche Krankheitsbilder aus annähernd sämtlichen Disziplinen der Medizin eröffnet.

Es bleibt also abzuwarten, inwieweit weitere Medikamente auf Basis der Wirkungsweise extrazellulärer Nukleotide in naher Zukunft Einzug in die Pharmakotherapie halten werden.

## 5. Zusammenfassung

Nukleotide stellen nicht nur intrazellulär die Grundbausteine des menschlichen Genoms, sowie in Form von ATP den wichtigsten Energielieferanten für zelluläre Prozesse dar, sondern auch extrazellulär spielen sie eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung im menschlichen Organismus.

ATP wird, wie so viele andere Mediatoren, unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen freigesetzt und hat, neben vielen weiteren Effekten in anderen Organsystemen, über eine Hemmung des kontraktiles Apparates der Endothelzellen eine stabilisierende Wirkung auf die endotheliale Schrankenfunktion. Im Vergleich dazu bewirken die einzelnen Abbauprodukte von ATP einen der Wirkungsweise des ATP vollkommen gegensätzlichen Effekt, indem ADP, AMP und Adenosin die Permeabilität der Endothelzellen erhöhen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich die erwähnten gegensätzlichen Effekte der einzelnen Nukleotide sowohl auf zellulärer Ebene als auch im Tierversuch bestätigen und gleichzeitig durch Verabreichung des Ektonukleotidase-Hemmstoffes ARL 67156 und der löslichen Ektonukleotidase Apyrase differenzieren lassen.

Anhand kultivierter Endothelzellen aus Ratten-Koronarien wurden die Effekte einzelner Nukleotide auf die Makromolekülpermeabilität ermittelt. Unter Zuhilfenahme der Intravitalmikroskopie wurde durch die Veränderung der Konzentration FITC-markierten Albumins im perivaskulären Gewebe der Einfluss extrazellulären ATP auf die Permeabilität in der Mikrozirkulation des Rattenmesenteriums untersucht. Darüber hinaus wurde über den myokardialen Wassergehalt des Rattenherzens indirekt die Ödematisierung des perivaskulären Gewebes bestimmt.

ATP allein bewirkte kurzfristig eine Senkung der endothelialen Permeabilität, führte aber im Verlauf zu einer deutlichen Störung der Barrierefunktion. Wurde der Abbau von ATP durch den spezifischen Ektonukleotidase-Hemmstoff ARL 67156 inhibiert, so zeigte sich eine langfristige Stabilisierung der endothelialen Schranke.

Wurde jedoch die Metabolisierung von ATP durch die lösliche Ektonukleotidase Apyrase beschleunigt, so stellte sich der störende Effekt deutlich rascher ein im Vergleich zur alleinigen Gabe von ATP.

Durch zusätzliche Gabe von ARL 67156 ließ sich der myokardiale Wassergehalt signifikant senken.



Es zeigte sich, dass die Befunde der *in vitro*-Versuche auf das Tiermodell übertragbar sind.

Erstmals konnte gezeigt werden, dass der protektive Effekt extrazellulären ATPs auf die endotheliale Permeabilität entscheidend von dessen Metabolisierungsstatus abhängt. Dies führt zu einem funktionellen Antagonismus von ATP und seinen Abbauprodukten auf die Integrität der endothelialen Barriere.

In Zukunft könnten durch genaueres Verständnis der Signaltransduktionswege neue therapeutische Strategien entwickelt werden.

## 6. Summary

ATP not only presents an important energy reserve for the cell but also plays an important role in signal transduction. ATP is released, like other mediators, under certain (patho)-physiological conditions and, beside other effects in different organ-systems, has a barrier stabilizing effect on endothelium.

Unlike its metabolites such as ADP, AMP and adenosine which have both barrier stabilizing and destabilizing effects, ATP has barrier stabilizing effect on coronary microvascular endothelial monolayers. ATP mediates its barrier stabilizing effects via inhibition of endothelial contractile machinery and an enhancement of cell-cell adhesions.

Present study was carried out to differentiate the effects of ATP and its metabolites on microvasculature *in vivo*. The experiments were carried out on rat mesentery artery and vascular leakage was measured by analyzing extravasations of FITC-labelled albumin using intravital microscopy. Similarly, the myocardial water contents were measured to analyze the effects of ATP on coronary microvasculature.

ATP caused a transient reduction in vascular leakage followed by a marked increase in leakage. Co-administration of ARL67156, an ectonucleotidase inhibitor, prolonged while apyrase, a soluble ectonucleotidase, abrogated the barrier stabilizing effects of ATP. Similarly, ATP reduced myocardial water contents indicating a barrier stabilizing effects and these were potentiated by co-administration of ARL67156.

Altogether the study shows that *in vitro* experiments performed on isolated cell culture model can be transformed to the animal models. The study indicates for the first time, that the effects of extracellular ATP on the endothelial barrier are essentially dependent on its metabolic state. ATP itself has barrier stabilizing while its metabolites like AMP and adenosine have barrier disrupting effects on coronary microvasculature.

In future new therapeutic strategies could be developed by understanding the exact receptor distribution and the specific signal transduction pathways, which possibly are able to lower the mortality of vascular diseases.

## 7. Literatur:

- Abbracchio MP: P1 and P2-Receptors in Cell-Growth and Differentiation. *Drug Dev Res* 1996; 39: 393-406.
- Abbracchio MP, Brambilla R, Ceruti S, Kim HO, von Lubitz DK, Jacobson KA, Cattabeni F: G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol* 1995; 48(6): 1038-1045.
- Abbracchio MP, Burnstock G: Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 1994; 64(3): 445-475.
- Abbracchio MP, Burnstock G: Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 1998; 78(2): 113-145.
- Agteresch HJ, Dagnelie PC, van den Berg JW, Wilson JH: Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs* 1999; 58(2): 211-232.
- Algire GH: An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 1943; 4: 1-11.
- Ando J, Komatsuda T, Kamiya A: Cytoplasmic calcium response to fluid shear stress in cultured vascular endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 1988; 24(9): 871-877.
- Aslam M, Gündüz D, Schuler D, Li L, Sharifpanah F, Sedding D et al.: Intermedin induces loss of coronary microvascular endothelial barrier via dearrangement of actin cytoskeleton: Role of RhoA and Rac1. *Cardiovasc Res* 2011; 92: 276-86.
- Baluk P, Hirata A, Thurston G, Fujiwara T, Neal CR, Michel CC, McDonald DM: Endothelial gaps: time course of formation and closure in inflamed venules of rats. *Am J Physiol* 1997; 272(1 Pt 1): L155-170.
- Bazzoni G: Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall. *Thromb Haemost* 2006; 95(1): 36-42.
- Becker BF, Chappell D, Jacob M: Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Res Cardiol* 2010; 105: 687-701
- Belardinelli L, Shryock JC, Song Y, Wang D, Srinivas M: Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. *FASEB J* 1995; 9(5): 359-365.
- Bendayan M: Morphological and cytochemical aspects of capillary permeability. *Microsc Res Tech* 2002; 57(5): 327-349.
- Benham CD, Tsien RW: A novel receptor-operated Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature* 1987; 328(6127): 275-278.
- Bergfeld GR, Forrester T: Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc Res* 1992; 26(1): 40-47.
- Bindewald K, Gündüz D, Härtel F, Peters SC, Rodewald C, Nau S, Schäfer M, Neumann J, Piper HM, Noll T: Opposite effect of cAMP signaling in endothelial barriers of different origin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C1246-55
- Bodin P, Burnstock G: ATP-stimulated release of ATP by human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27(6): 872-875.
- Bodin P, Burnstock G: Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation. *Inflamm Res* 1998; 47(8): 351-354.
- Born GVR: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927-929.
- Born GVR, Kratzer MA: Source and concentration of extracellular adenosine triphosphate during haemostasis in rats, rabbits and man. *J Physiol* 1984; 354: 419-429.

- Brands J, Spaan JA, van den Berg BM, Vink H, VanTeefelen JW: Acute attenuation of glycocalyx barrier properties increases coronary blood volume independently of coronary flow reserve. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298: H515-H523
- Burnstock G: Neural Nomenclature. *Nature* 1971; 229(5282): 282-283.
- Burnstock G: Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews* 1972; 24(3): 509-581.
- Burnstock G: A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. New York, Raven Press 1978.
- Burnstock G: Purinergic receptors in the heart. *Circ Res* 1980; 46(6): 1175-182.
- Burnstock G: Purinergic cotransmission. *Brain Res Bull* 1999a; 50(5-6): 355-357.
- Burnstock G: Release of vasoactive substances from endothelial cells by shear stress and purinergic mechanosensory transduction. *J Anat* 1999b; 194(Pt 3): 335-342.
- Burnstock G: Purinergic Signalling. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 172-181.
- Burnstock G, Meghji P: The effect of adenylyl compounds on the rat heart. *Br J Pharmacol* 1983; 79(1): 211-218.
- Cargnoni A, Ceconi C, Boraso A, Bernocchi P, Monopoli A, Curello S, Ferrari R: Role of A2A receptor in the modulation of myocardial reperfusion damage. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33(6): 883-893.
- Carman AJ, Mills JH, Krenz A, Kim DG, Bynoe MS: Adenosine receptor signaling modulates permeability of the blood-brain barrier. *J Neurosci* 2011; 31: 13272-80
- Carter RD, Joyner WL, Renkin EM: Effects of histamine and some other substances on molecular selectivity of the capillary wall to plasma proteins and dextran. *Microvasc Res* 1974; 7(1): 31-48.
- Cattaneo M: Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007; 5(1): 45-55.
- Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, Rehm M, Briegel J, Welsch U et al.: TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol* 2009; 104: 78-89
- Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN: A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 1995; 377(6548): 428-431.
- Chen W, Guidotti G: Soluble apyrases release adp during ATP hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282(1): 90-95.
- Chen ZP, Kratzmeier M, Poch A, Xu S, McArdle CA, Levy A, Mukhopadhyay AK, Lightman SL: Effects of extracellular nucleotides in the pituitary: adenosine triphosphate receptor-mediated intracellular responses in gonadotrope-derived alpha T3-1 cells. *Endocrinology* 1996; 137(1): 248-256.
- Clemens MG, Forrester T: Appearance of adenosine triphosphate in the coronary sinus effluent from isolated working rat heart in response to hypoxia. *J Physiol* 1981; 312: 143-158.
- Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, Malmberg AB, Cain G, Berson A, Kassotakis L, Hedley L, Lachnit WG, Burnstock G, McMahon SB, Ford AP: Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 2000; 407(6807): 1011-1015.
- Crack BE, Pollard CE, Beukers MW, Roberts SM, Hunt SF, Ingall AH, McKechnie KC, Ijzerman AP, Leff P: Pharmacological and biochemical analysis of FPL 67156, a novel, selective inhibitor of ecto-ATPase. *Br J Pharmacol* 1995; 114(2): 475-481.

- Cronstein BN: Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 1994; 76(1): 5-13.
- Czabanka M, Peter C, Martin E, Walther A: Microcirculatory endothelial dysfunction during endotoxemia - insights into pathophysiology, pathologic mechanisms and clinical relevance. *Curr Vasc Pharmacol* 2007; 5(4): 266-275.
- Davies MG, Hagen PO: Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg* 1997; 84(7): 920-935.
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR: Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; 97(3): 587-600.
- Di Virgilio F, Pizzo P, Zanovello P, Bronte V, Collavo D: Extracellular ATP as a possible mediator of cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 1990; 11(8): 274-277.
- Dixon SJ, Sims SM: P2 purinergic receptors on osteoblasts and osteoclasts: Potential targets for drug development. *Drug Dev Res* 2000; 49(3): 187-200.
- Drury AN, Szent-Györgyi A: The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of Physiology* 1929; 68(3): 213-237.
- Dubyak GR: Signal transduction by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 4(4): 295-300.
- Dubyak GR, el Moatassim C: Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 1993; 265(3): C577-606.
- Eckle T, Grenz A, Laucher S, Eltzhig HK: A2B adenosine receptor signalling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 3301-15.
- Eckle T, Faigle M, Grenz A, Laucher S, Thompson LF, Eltzhig HK: A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. *Blood* 2008; 111: 2024-35
- El Moatassim C, Dornand J, Mani JC: Extracellular ATP and cell signalling. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1134(1): 31-45.
- Engelhardt WA: *Proc Int Symp Enzyme Chem* 1957; 2: 163-166.
- Erlinge D: Vascular Effects of Extracellular Nucleotides. *Kidney Blood Press Res* 2001; 24: 213-440.
- Farias Mr, Gorman MW, Savage MV, Feigl EO: Plasma ATP during exercise: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288(4): H1586-1590.
- Ferrari D, Los M, Bauer MK, Vandenabeele P, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K: P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett* 1999; 447(1): 71-75.
- Filippini A, Riccioli A, De Cesaris P, Paniccia R, Teti A, Stefanini M, Conti M, Ziparo E: Activation of inositol phospholipid turnover and calcium signaling in rat Sertoli cells by P2-purinergic receptors: modulation of follicle-stimulating hormone responses. *Endocrinology* 1994; 134(3): 1537-1545.
- Filippini A, Taffs RE, Sitkovsky MV: Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(21): 8267-8271.
- Fink MP, Delude RL: Epithelial barrier dysfunction: a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level. *Crit Care Clin* 2005; 21(2): 177-196.
- Firestein GS: Anti-inflammatory effects of adenosine kinase inhibitors in acute and chronic inflammation. *Drug Dev Res* 1996; 39: 371-376.

- Fischer B: Therapeutic applications of ATP-(P2)-receptors agonists and antagonists. *Exp Opin Ther Patents* 1999; 9(4): 385-399.
- Fischer S, Knöll R, Renz D, Karliczek GF, Schaper W: Role of adenosine in the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in porcine brain derived microvascular endothelial cells. *Endothelium* 1997; 5(3): 155-165.
- Franke N, Endrich B: Effects of halothane and enflurane on the microcirculation. *Anästh Intensivther Notfallmed* 1983; 18: 283-290.
- Franke N, Endrich B, Laubenthal H, Peter K, Messmer K: The effect of pentobarbital on the microcirculation of skeletal muscles and the subcutis. An animal-experimental study. *Anästh Intensivther Notfallmed* 1982; 17: 11-14.
- Fredholm BB: Adenosine receptors as targets for drug development. *Drugs New Perspect* 2003; 16(5): 283-289.
- Fredholm BB, Burnstock G, Harden KT, Spedding M: Receptor nomenclature. *Drug Dev Res* 1996; 39: 461-466.
- Gandia L, Garcia AG, Morad M: ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *J Physiol* 1993; 470: 55-72.
- Garcia JG, Siflinger-Birnboim A, Bizios R, Del Vecchio PJ, Fenton JWn, Malik AB: Thrombin-induced increase in albumin permeability across the endothelium. *J Cell Physiol* 1986; 128(1): 96-104.
- Gendron FP, Benrezzak O, Krugh BW, Kong Q, Weisman GA, Beaudoin AR: Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. *Curr Drug Targets* 2002; 3(3): 229-245.
- Goeckeler ZM, Wysolmerski RB: Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerization, and myosin phosphorylation. *J Cell Biol* 1995; 130(3): 613-627.
- Gonzales FA, Wang DJ, Huang NN, Heppel LA: Activation of early events of the mitogenic response by a P2Y purinoceptor with covalently bound 3'-O-(4-benzoyl)-benzoyl-adenosine 5'-triphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(24): 9717-9721.
- Gordon JL: Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 1986; 233(2): 309-319.
- Green HN, Stoner HB: Biological actions of adenine nucleotides. London, Lewis, H K & Co. Ltd. 1950.
- Greene RW, Haas HL: The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1991; 36(4): 329-341.
- Grinthal A, Guidotti G: CD39, NTPDase 1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why? *Purinergic Signal* 2006; 2(2): 391-398.
- Gündüz D, Hirche F, Härtel FV, Rodewald CW, Schäfer M, Pfitzer G, Piper HM, Noll T: ATP antagonism of thrombin-induced endothelial barrier permeability. *Cardiovasc Res* 2003; 59(2): 470-478.
- Gündüz D, Kasseckert SA, Härtel FV, Aslam M, Abdallah Y, Schäfer M, Piper HM, Noll T, Schäfer C: Accumulation of extracellular ATP protects against acute reperfusion injury in rat heart endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2006; 71(4): 764-773.
- Gündüz D, Thom J, Hussain I, Lopez D, Härtel FV, Erdogan A et al.: Insulin stabilizes microvascular endothelial barrier function via Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Mediated Rac1 Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1237-45
- Gustafson LA, Zuurbier CJ, Bassett JE, Barends JP, van Beek JH, Bassingthwaighte JB, Kroll K: Increased hypoxic stress decreases AMP hydrolysis in rabbit heart. *Cardiovasc Res* 1999; 44(2): 333-343.

- Handa M, Guidotti G: Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218(3): 916-923.
- Härtel FV, Rodewald CW, Aslam M, Gündüz D, Hafer L, Neumann J, Piper HM, Noll T: Extracellular ATP induces assembly and activation of the myosin light chain phosphatase complex in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2007; 74(3): 487-496.
- Haslam RJ, Cusack NJ: Blood platelet receptors for ADP and for adenosine. London, New York, Chapman & Hall 1981.
- He P, Curry FE: Differential actions of cAMP on endothelial  $[Ca^{2+}]_i$  and permeability in microvessels exposed to ATP. *Am J Physiol* 1993; 265 (3 Pt 2): H1019-23
- He P, Zeng M, Curry FE: cGMP modulates basal and activated microvessel permeability independently of  $[Ca^{2+}]_i$ . *Am J Physiol* 1998; 274: H1865-H1874
- Hechler B, Leon C, Vial C, Vigne P, Frelin C, Cazenave JP, Gachet C: The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood* 1998; 92(1): 152-159.
- Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H: Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur J Biochem* 1999; 262(1): 102-107.
- Hempel A, Noll T, Muhs A, Piper HM: Functional antagonism between cAMP and cGMP on permeability of coronary endothelial monolayers. *Am J Physiol* 1996; 270 (4 Pt. 2): H1264-71
- Hirano S, Rees RS, Yancy SL, Welsh MJ, Remick DG, Yamada T, Hata J, Gilmont RR: Endothelial barrier dysfunction caused by LPS correlates with phosphorylation of HSP27 in vivo. *Cell Biol Toxicol* 2004; 20(1): 1-14.
- Hirata A, Baluk P, Fujiwara T, McDonald DM: Location of focal silver staining at endothelial gaps in inflamed venules examined by scanning electron microscopy. *Am J Physiol* 1995; 269(3 Pt 1): L403-418.
- Hoebertz A, Arnett TR, Burnstock G: Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24(6): 290-297.
- Holton FA, Holton P: The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *J Physiol* 1953; 119(4): 50P-51P.
- Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B: *Biochemie des Menschen*. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag 2002.
- Hourani SM, Hall DA: Receptors for ADP on human blood platelets. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15(4): 103-108.
- Housley GD: Physiological effects of extracellular nucleotides in the inner ear. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27(8): 575-580.
- Hwang TH, Schwiebert EM, Guggino WB: Apical and basolateral ATP stimulates tracheal epithelial chloride secretion via multiple purinergic receptors. *Am J Physiol* 1996; 270(6): C1611-1623.
- Imai M, Takigami K, Guckelberger O, Kaczmarek E, Csizmadia E, Bach FH, Robson SC: Recombinant adenoviral mediated CD39 gene transfer prolongs cardiac xenograft survival. *Transplantation* 2000; 70(6): 864-870.
- IUPHAR: Compendium on Receptor Characterization and Classification. International Union of Pharmacology, London, IUPHAR Media, 1998.
- Jackson E: Renal actions of purines. New York, Wiley-Liss 1997.
- James TN: The chronotropic action of ATP and related compounds studied by direct perfusion of the sinus node. *J Pharmacol Exp Ther* 1965; 149(2): 233-247.

- Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP: Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem* 1998; 273(4): 2030-2034.
- Jochum M, Fritz H: *Pathobiochemical Mechanisms in Inflammation*. Berlin, Heidelberg, Springer Verlag 1989.
- Jordan JE, Zhao ZQ, Sato H, Taft S, Vinten-Johansen J: Adenosine A2 receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation, superoxide generation and coronary endothelial adherence. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280(1): 301-309.
- Kaczmarek E, Koziak K, Sevigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH, Robson SC: Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem* 1996; 271(51): 33116-33122.
- Kamada S, Blackmore PF, Oehninger S, Gordon K, Hodgen GD: Existence of P2-purinoceptors on human and porcine granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78(3): 650-656.
- Karnovsky MJ: The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J Cell Biol* 1967; 35(1): 213-236.
- Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper HM, Noack E, Schrader J: Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 154(1): 236-244.
- Kemp BK, Cocks TM: Adenosine mediates relaxation of human small resistance-like coronary arteries via A2B receptors. *Br J Pharmacol* 1999; 126(8): 1796-1800.
- Kerkhof CJ, Van der Linden PJ, Sipkema P: Role of myocardium and endothelium in coronary vascular smooth muscle responses to hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282(4): H1296-1303.
- Klyscz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H: Cap Image - ein neuartiges computergestütztes Videobildanalyse-System für die dynamische Kapillarmikroskopie. *Biomedizinische Technik* 1997; 42: 168-175.
- Knutsen LJS, Murray TF: *Adenosine and ATP in Epilepsy*. New York, Wiley-Liss 1997.
- Kolossova IA, Mirzapozazova T, Adyshev D, Usatyuk P, Romer LH, Jacobson JR, Natarajan V, Pearse DB, Garcia JG, Verin AD: Signalling pathways involved in adenosine triphosphate-induced endothelial cell barrier enhancement. *Circ Res* 2005; 97(2): 115-124.
- Kolossova IA, Mirzapozazova T, Moreno-Vinasco L, Sammani S, Garcia JG, Verin AD: Protective effect of purinergic agonist ATP $\gamma$ S against acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294: L319-L324
- Kubes P, Granger DN: Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol* 1992; 262(2): H611-615.
- Lasley RD, Anderson GM, Mentzer RMJ: Ischaemic and hypoxic preconditioning enhance postischaemic recovery of function in the rat heart. *Cardiovasc Res* 1993; 27(4): 565-570.
- Leithauser B, Schumacher J, Lendemanns S, Tillmanns H, Matthias FR: Antithrombin attenuates microvascular leakage and leukocyte-endothelial interaction in response to endotoxin. *Semin Thromb Hemost* 2002; 28 Suppl 1: 87-94
- Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Sevigny J: Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. *Br J Pharmacol* 2007; 152(1): 141-150.
- Li BY, Li WH, Bai Y: Relationship between platelet density and platelet aggregation, ATP release, and cytosolic-free calcium mobilization in rabbits. *Acta Pharmacol Sin* 1995; 16(4): 367-372.



- Linden J: Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 775-787.
- Liu GS, Downey JM, Cohen MV: Adenosine, Ischemia and Preconditioning. New York, Wiley-Liss 1997.
- Lofton CE, Newman WH, Currie MG: Atrial natriuretic peptide regulation of endothelial permeability is mediated by cGMP. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172(2): 793-799.
- Londos C, Cooper DM, Wolff J: Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(5): 2551-2554.
- Loubatieres-Mariani MM, Hillaire-Buys D, Chapal J, Bertrand G, Petit P: P2 Purinoceptor Agonists: New Insulin Secretagogues Potentially Useful In The Treatment of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. New York, Wiley-Liss 1997.
- Lush CW, Kvietys PR: Microvascular dysfunction in sepsis. *Microcirculation* 2000; 7(2): 83-101.
- Lüthje J: Origin, metabolism and function of extracellular adenine nucleotides in the blood. *Klin Wochenschr* 1989; 67(6): 317-327.
- Macfarlane DE, Mills DC: The effects of ATP on platelets: evidence against the central role of released ADP in primary aggregation. *Blood* 1975; 46(3): 309-320.
- Majno G: Ultrastructure of the vascular membrane. Washington, American Physiological Society 1963.
- Majno G, Palade GE: Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 11: 571-605.
- Malik AB, Horgan MJ: Mechanisms of thrombin-induced lung vascular injury and edema. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136(2): 467-470.
- Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, Hajjar KA, Posnett DN, Schoenborn MA, Schooley KA, Gayle RB, Maliszewski CR: The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest* 1997; 99(6): 1351-1360.
- Marquardt DL, Walker LL, Heinemann S: Cloning of two adenosine receptor subtypes from mouse bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 1994; 152(9): 4508-4515.
- Mason SJ, Paradiso AM, Boucher RC: Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Br J Pharmacol* 1991; 103(3): 1649-1656.
- McClenahan D, Hillenbrand K, Kapur A, Carlton D, Czuprynski C: Effects of extracellular ATP on bovine lung endothelial and epithelial cell monolayer morphologies, apoptoses and permeabilities. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16: 43-8
- Megson AC, Dickenson JM, Townsend-Nicholson A, Hill SJ: Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A1-receptors and constitutive P2-purinoceptors in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol* 1995; 115(8): 1415-1424.
- Mehta D, Malik AB: Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Physiol Rev* 2006; 86: 279-367.
- Menger MD, Lehr HA: Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 1993; 14(11): 519-522.
- Michel CC, Curry FE: Microvascular permeability. *Physiol Rev* 1999; 79(3): 703-761.

- Mills DC: ADP receptors on platelets. *Thromb Haemost* 1996; 76(6): 835-856.
- Minshall RD, Malik AB: Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 176(Pt 1): 107-144.
- Moore TM, Norwood NR, Creighton JR, Babal P, Brough GH, Shasby DM, Stevens T: Receptor-dependent activation of store-operated calcium entry increases endothelial cell permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(4): L691-698.
- Muckart DJ, Bhagwanjee S: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference definitions of the systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. *Crit Care Med* 1997; 25(11): 1789-1795.
- Neely CF, Jin J, Keith IM: A1-adenosine receptor antagonists block ischemia-reperfusion injury of the lung. *Am J Physiol* 1995; 268: L1036-L1046
- Neely CF, Jin J, Keith IM: A1-adenosine receptor antagonists block endotoxin-induced lung injury. *Am J Physiol* 1997; 272: L353-L361
- Nehlig A: Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neurosci Biobehav Rev* 1999; 23(4): 563-576.
- Nichols CG, Shyng SL, Nestorowicz A, Glaser B, Clement JPt, Gonzales G, Aguilar-Bryan L, Permutt MA, Bryan J: Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* 1996; 272(5269): 1785-1787.
- Noll T, Hölschermann H, Koprek K, Gündüz D, Haberbosch W, Tillmanns H, Piper HM: ATP reduces macromolecule permeability of endothelial monolayers despite increasing  $[Ca^{2+}]_i$ . *Am J Physiol* 1999; 276(6): H1892-1901.
- Noll T, Schäfer M, Schavier-Schmitz U, Piper HM: ATP induces dephosphorylation of myosin light chain in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279(3): C717-723.
- Nolte D, Zeintl H: Functional Capillary Density: An Indicator of Tissue Perfusion *Int J Microcirc* 1995; 15: 244-249.
- Ohta A, Sitkovsky MV: Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; 414(6866): 916-920.
- Penn MS, Chisolm GM: Relation between lipopolysaccharide-induced cell injury and entry of macromolecules into the rat aorta in vivo. *Circ Res* 1991; 68(5): 259-269.
- Petruzzi E, Orlando C, Pinzani P, Sestini R, Del Rosso A, Dini G, Tanganelli E, Buggiani A, Pazzagli M: Adenosine triphosphate release by osmotic shock and hemoglobin A1C in diabetic subjects' erythrocytes. *Metabolism* 1994; 43(4): 435-440.
- Pfeil U, Aslam M, Paddenberg R, Quanz K, Chang CL, Park JI et al.: Intermedin/adrenomedullin-2 is a hypoxia-induced endothelial peptide that stabilizes pulmonary microvascular permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 297: L837-L845
- Phillis JW, O'Regan MH: Prevention of Ischemic Brain Injury by Adenosine Receptor Activation. *Drug Dev Res* 1993; 28: 390-394.
- Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, Stocking KL, Fujita T, Ramasamy R, Connolly ES, Huang J, Kiss S, Zhang Y, Choudhri TF, McTaggart RA, Liao H, Drosopoulos JH, Price VL, Marcus AJ, Maliszewski CR: Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2002; 109(8): 1031-1040.

- Pintor J: Adenine nucleotides and dinucleotides as new substances for the treatment of ocular hypertension and glaucoma. *Curr Opin Investig Drugs* 2005; 6(1): 76-80.
- Piper HM, Spahr R, Mertens S, Krützfeldt A, Watanabe H: Microvascular endothelial cells from heart. In: Piper HM, editor. *Cell Culture Technique in Heart and Vessel Research*. Heidelberg: Springer; 1990; p. 158-77
- Plesner L: Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol* 1995; 158: 141-214.
- Predescu D, Palade GE: Plasmalemmal vesicles represent the large pore system of continuous microvascular endothelium. *Am J Physiol* 1993; 265(2 Pt 2): H725-733.
- Pries AR, Kuebler WM: Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 176(Pt 1): 1-40.
- Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews* 1998; 50(3): 413-492.
- Rapaport E: Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle. *J Cell Physiol* 1983; 114(3): 279-283.
- Reece TB, Ellman PI, Maxey TS, Crosby IK, Warren PS, Chong TW et al.: Adenosine A2A receptor activation reduces inflammation and preserves pulmonary function in an in vivo model of lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 129: 1137-43
- Richardson PJ, Kase H, Jenner PG: Adenosine A2A receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18(9): 338-344.
- Rotrosen D, Gallin JI: Histamine type I receptor occupancy increases endothelial cytosolic calcium, reduces F-actin, and promotes albumin diffusion across cultured endothelial monolayers. *J Cell Biol* 1986; 103(6): 2379-2387.
- Ryan LM, Rachow JW, McCarty BA, McCarty DJ: Adenosine triphosphate levels in human plasma. *J Rheumatol* 1996; 23(2): 214-219.
- Sandison JC: A new method for the microscopic study of living growing tissue by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat Res* 1924; 28: 281-287.
- Sato K, Okajima F, Kondo Y: Extracellular ATP stimulates three different receptor-signal transduction systems in FRTL-5 thyroid cells. Activation of phospholipase C, and inhibition and activation of adenylate cyclase. *Biochem J* 1992; 283(1): 281-287.
- Satpathy M, Gallagher P, Jin Y, Srinivas SP: Extracellular ATP opposes thrombin-induced myosin light chain phosphorylation and loss of barrier integrity in corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2005; 81(2): 183-192.
- Sawynok J: Purines in pain management. *Curr Opin CPNS Invest Drugs* 1999; 1: 27-38.
- Sawynok J: Adenosine and ATP receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 177: 309-328.
- Schiebler TH, Schmidt W, Arnold G, Beier HM, Herrmann M, Kaufmann P, Kretschmann HJ, Kühnel W, Steiniger B, Winckler J, van der Zypen E, Zilles K: *Anatomie*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag 2003.
- Schnitzer JE, Carley WW, Palade GE: Albumin interacts specifically with a 60-kDa microvascular endothelial glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(18): 6773-6777.
- Segerdahl M, Sollevi A: Adenosine and pain relief: A clinical overview. *Drug Dev Res* 1999; 45(3-4): 151-158.

- Seiffge D, Bissinger T, Kremer E, Laux V, Schleierbach R: Inhibitory effects of pentoxifylline on LPS-induced leukocyte adhesion and macromolecular extravasation in the microcirculation. *Inflamm Res* 1995; 44: 281-286.
- Shea SM, Karnofsky MJ, Bossert WH: Vesicular transport across endothelium: simulation of a diffusion model. *J Theor Biol* 1969; 24(1): 30-42.
- Sheldon R, Moy A, Lindsley K, Shasby S, Shasby DM: Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction. *Am J Physiol* 1993; 265(6 Pt 1): L606-612.
- Shryock JC, Snowdy S, Baraldi PG, Cacciari B, Spalluto G, Monopoli A, Ongini E, Baker SP, Belardinelli L: A2A-adenosine receptor reserve for coronary vasodilation. *Circulation* 1998; 98(7): 711-718.
- Silinsky EM, Von Kügelgen I, Smith A, Westfall DP: Functions of extracellular nucleotides in peripheral and central neuronal tissues. Totowa, NJ, USA, Humana Press 1998.
- Simionescu M, Antohe F: Functional ultrastructure of the vascular endothelium: changes in various pathologies. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 176(Pt 1): 41-69.
- Simionescu M, Simionescu N: Endothelial cell biology, New York, Ienum 1988.
- Simionescu M, Simionescu N: Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol Rev* 1991; 25(1): 1-78.
- Sneddon P, Westfall TD, Todorov LD, Mihaylova-Todorova ST, Westfall DP, Kennedy C: Modulation of purinergic neurotransmission. *Prog Brain Res* 1999; 120: 11-20.
- Srinivas M, Song Y, Shryock JC, Belardinelli L: Cardiac electrophysiological actions of adenosine. *Drug Dev Res* 1999; 45(3-4): 420-426.
- Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB: Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(3): L419-422.
- Svensjö E, Arfors KE, Raymond RM, Grega GJ: Morphological and physiological correlation of bradykinin-induced macromolecular efflux. *Am J Physiol* 1979; 236(4): H600-606.
- Szabo A, Menger MD, Boros M: Microvascular and epithelial permeability measurements in laboratory animals. *Microsurgery* 2006; 26(1): 50-53.
- Tanaka N, Kawasaki K, Nejime N, Kubota Y, Nakamura K, Kunitomo M, Takahashi K, Hashimoto M, Shinozuka K: P2Y receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling increases human vascular endothelial cell permeability. *J Pharmacol Sci* 2004; 95(2): 174-180.
- Tanaka N, Kawasaki K, Nejime N, Kubota Y, Takahashi K, Hashimoto M, Kunitomo M, Shinozuka K: P2Y receptor-mediated enhancement of permeation requires Ca<sup>2+</sup> signalling in vascular endothelial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003; 30(9): 649-652.
- Tranum-Jensen J, Janse MJ, Fiolet WT, Krieger WJ, D'Alnoncourt CN, Durrer D: Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart. *Circ Res* 1981; 49(2): 364-381.
- Van Calker D, Müller M, Hamprecht B: Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature* 1978; 276(5690): 839-841.
- van Hinsbergh V, van Nieuw Amerongen G: Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. *J Anat* 2002; 200(5): 525.
- van Hinsbergh VW, Scheffer MA, Langelier EG: Macro- and microvascular endothelial cells from human tissue. Heidelberg, Germany, Springer 1997.

- van Nieuw Amerongen GP, Draijer R, Vermeer MA, Van Hinsbergh VW: Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin. *Circ Res* 1998; 83(11): 1115-1123.
- Vassort G: Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purineric agonist in the myocardium. *Physiol Rev* 2001; 81(2): 767-806.
- Vilsvik JS, Persson CG, Amundsen T, Brenna E, Naustdal T, Syvertsen U, Storstein L, Källén AG, Eriksson G, Holte S: Comparison between theophylline and an adenosine non-blocking xanthine in acute asthma. *Eur Respir J* 1990; 3(1): 27-32.
- Von Kügelgen I, Allgaier C, Schobert A, Starke K: Co-release of noradrenaline and ATP from cultured sympathetic neurons. *Neuroscience* 1994; 61(2): 199-202.
- Waller A: *Philos Mag J Sci* 1846; 29: 397-405.
- Watanabe H, Kuhne W, Schwartz P, Piper HM: A2-adenosine receptor stimulation increases macromolecule permeability of coronary endothelial monolayers. *Am J Physiol* 1992; 262: H1174-H1181
- Westfall DP, Kennedy C, Sneddon P: The ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 enhances parasympathetic neurotransmission in the guinea-pig urinary bladder. *Eur J Pharmacol* 1997; 329(2-3): 169-173.
- Westfall DP, Sedaa KO, Shinozuka K, Bjur RA, Buxton IL: ATP as a cotransmitter. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 603: 300-310.
- Westfall TD, Kennedy C, Sneddon P: Enhancement of sympathetic purineric neurotransmission in the guinea-pig isolated vas deferens by the novel ecto-ATPase inhibitor ARL 67156. *Br J Pharmacol* 1996; 117(5): 867-872.
- Westfall TD, Menzies JR, Liberman R, Waterston S, Ramphir N, Westfall DP, Sneddon P, Kennedy C: Release of a soluble ATPase from the rabbit isolated vas deferens during nerve stimulation. *Br J Pharmacol* 2000; 131(5): 909-914.
- White TD: Role of adenine compounds in autonomic neurotransmission. *Pharmacol Ther* 1988; 38(2): 129-168.
- Wiesner JB, Ugarkar BG, Castellino AJ, Barankiewicz J, Dumas DP, Gruber HE, Foster AC, Erion MD: Adenosine kinase inhibitors as a novel approach to anticonvulsant therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289(3): 1669-1677.
- Wilcox CS, Welch WJ, Schreiner GF, Belardinelli L: Natriuretic and diuretic actions of a highly selective adenosine A1 receptor antagonist. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(4): 714-720.
- Williams CA, Forrester T: Possible source of adenosine triphosphate released from rat myocytes in response to hypoxia and acidosis. *Cardiovasc Res* 1983; 17(5): 301-312.
- Williams M: Developments in P2 receptor targeted therapeutics. *Prog Brain Res* 1999; 120: 93-106.
- Williams M, Jarvis MF: Purineric and pyrimidineric receptors as potential drug targets. *Biochem Pharmacol* 2000; 59(10): 1173-1185.
- Wolf MM, Berne RM: Coronary vasodilator properties of purine and pyrimidine derivatives. *Circ Res* 1956; 4(3): 343-348.
- Yegutkin GG, Henttinen T, Jalkanen S: Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via phosphotransfer reactions. *FASEB J* 2001; 15(1): 251-260.
- Yerxa BR, Mundasad M, Sylvester RN, Garden JC, Cooper M, Kellerman DJ: Ocular safety of INS365 ophthalmic solution, a P2Y2 agonist, in patients with mild to moderate dry eye disease. *Adv Exp Med Biol* 2002; 506(Pt B): 1251-1257.
- Zheng JS, Christie A, Levy MN, Scarpa A: Modulation by extracellular ATP of two distinct currents in rat myocytes. *Am J Physiol* 1993; 264(6): C1411-1417.

- Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL, Civelli O: Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(16): 7432-7436.
- Ziganshina LE, Ziganshin AU, Hoyle CHV, Burnstock G: Acute paw oedema formation induced by ATP: re-evaluation of the mechanisms involved. *Inflamm Res* 1996; 45(2): 96-102.
- Zimmermann H: 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 1992; 285(Pt 2): 345-365.
- Zimmermann H, Beaudoin AR, Bollen M, Goding JW, Guidotti G, Kirley TL, Robson SC, Sano K: Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolyzing enzyme families expressed on the cell surface. Maastricht, Shaker Publishing BV 2000.
- Zweifach BW: The microcirculation in the intestinal mesentery. *Microvasc Res* 1973; 5(3): 363-367.

## 8. Bisherige Veröffentlichungen

Gündüz D, Krieger U, **Becker L**, Grebe M, Schaefer C, Tillmanns H, Noll T, Voss R.

Opposing effects of ATP and its metabolite adenosine on barrier function of microvascular coronary endothelial monolayers in vitro and rat mesenteric microcirculation in vivo.

51. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung, Dresden 2007

Gündüz D, Krieger U, **Becker L**, Aslam M, Conzelmann C, Grebe M, Erdogan A, Voss R, Noll T, Tillmanns H.

Gegensätzliche Wirkungen von ATP und seinem Abbauprodukt Adenosin auf die mikrovaskuläre, koronarendotheliale Schrankenfunktion in vitro und mesenteriale Mikrozirkulation in vivo.

Clin Res Cardiol 2009; 98: Suppl 1

Gündüz D, Krieger U, **Becker L**, Aslam M, Hussain I, Haertel F V, Voss R, Grebe M, Noll T, Tillmanns H.

Inhibition of ATP degradation reduces macromolecule permeability in rat mesentery arterioles and oedema formation in rat hearts in vivo

European Heart Journal 2009; 30 (Abstract Supplement): 248

Gündüz D, Aslam M, Krieger U, **Becker L**, Grebe M, Arshad M, Sedding DG, Härtel FV, Abdallah Y, Piper HM, Voss RK, Noll T.

Opposing effects of ATP and adenosine on barrier function of rat coronary microvasculature

J Mol Cell Cardiol. 2012 May;52(5):962-70. Epub 2012 Jan 13

## **9. Eidesstattliche Erklärung**

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind eingehalten.

Ulm, im Januar 2011



## 10. Danksagungen

Zunächst möchte ich mich bei **Hrn. Prof. Dr. H. Tillmanns** dem Direktor der Medizinischen Klinik I des Universitäts-Klinikums Giessen und Marburg, für die freundliche Aufnahme in die Abteilung und Ermöglichung meiner Promotion bedanken.

**Hrn. Prof. Dr. R. Voss**, ehemaliger Oberarzt der Medizinischen Klinik I des Universitäts-Klinikums Giessen und ehemaliger Leiter des Angiologischen Funktionslabors, in dem ich meine Dissertation anfertigen durfte, danke ich für die gute Betreuung.

Meinem Betreuer **Dr. Dursun Gündüz** möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank für die kompetente und unkomplizierte Begleitung während meiner gesamten Arbeit aussprechen. Vielen Dank für jede Tasse Kaffee in der Leitstelle Nidda und für die Aufrechterhaltung des Kontaktes auch über die hessischen Grenzen hinaus bis ins tiefste Schwabenländle.

Recht herzlichen bedanken möchte ich mich auch bei **Hrn. Prof. Dr. T. Noll**, ehemaliger Leiter des Physiologischen Instituts des Universitäts-Klinikums Giessen, der mit seiner Kompetenz und seinem Fachwissen die Anfertigung dieser Arbeit begleitet hat.

Für die Erklärung der Labormethoden und Unterstützung beim Anfertigen der Objekte bin ich **Fr. Daniela Reitz, Fr. Henrike Thomas und Fr. Sabine Schäfer**, Medizinisch – Technische Assistentinnen des Angiologischen Funktionslabors, sehr dankbar. Vielen Dank, dass Ihr mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt.

Vielen Dank auch an meinen Leidensgenossen, Freund und Kollegen **Uwe Krieger** für die unzähligen und scheinbar endlosen gemeinsamen Stunden im Labor, ganz besonders für Deine Motivation und die lebensnotwendige musikalische Untermalung.

Im Folgenden danke ich all denjenigen, die durch Schaffung einer freundlichen Arbeitsatmosphäre und durch hilfreiche Ratschläge sehr zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen haben sowie allen weiteren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Giessen und Marburg und denen des Angiologischen Funktionslabors.

Darüber hinaus danke ich ganz besonders meiner Familie – **meinen Eltern und**

**meiner Schwester** – da sie mehr als jeder andere an mich geglaubt und mich in meinem Tun unterstützt haben.

Natürlich auch all **meinen Freunden**, die mich immer wieder motiviert und die mich in Gedanken stets begleitet haben.