

Erhöhung der endothelialen Permeabilität in vitro und in vivo durch extrazelluläres Adenosin

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

vorgelegt von Uwe Harald Krieger
aus Giessen

Giessen 2010

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik I, Kardiologie-Angiologie

Leiter: Prof Dr. H. Tillmanns
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. R. Voss

Gutachter: Prof. Dr. T. Noll

Tag der Disputation: 27.06.2011

*Meinen Eltern Carmen und Harald,
meinen Geschwistern Stefanie, Björn und Kai
gewidmet*

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	3
1. EINLEITUNG	5
1.1 Endothelzellen und ihre Funktion als Permeabilitätsschranke	5
1.2 Veränderungen in der endothelialen Schrankenfunktion.....	6
1.3 Makro- und Mikrozirkulation	7
1.4 Extrazelluläres ATP	7
1.5 Das ATP-Abbauprodukt Adenosin	9
1.6 Ektonukleotidasen: Der Metabolismus von extrazellulärem ATP zu Adenosin	10
1.7 Purinerge Signalwege: P1 und P2 Rezeptoren	11
1.8 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	12
1.9 Ziele der Arbeit.....	13
2. MATERIAL	15
2.1 Endothelzellmonolayer	15
2.2 Intravitalmikroskopie.....	15
2.3 Mikroskop inklusive Hardware.....	17
2.4 Medien, Reagenzien und Substanzen	18
3. METHODEN	21
3.1 Isolation, Kultivierung und Identifizierung von mikro-vaskulären Endothelzellen.....	21
3.2 Makromolekül-Permeabilität von Endothelzellmonolayern	21
3.3 Immunhistochemische Bestimmung von VE-Cadherin	23
3.4 Intravitalmikroskopie.....	24
3.5 Bestimmung des myokardialen Wassergehaltes.....	28
3.6 Tierhaltung und -behandlung	29
3.7 Statistische Analyse	29
4. ERGEBNISSE	30
4.1 Der Einfluss von ATP und seinen Abbauprodukten auf die endotheliale Schrankenfunktion	30
4.1.1 Der Effekt von ATP mit und ohne Hemmung der Adenosin-Rezeptoren ..	30
4.1.2 Die Wirkung von ADP und AMP auf die endotheliale Schrankenfunktion.	32

4.1.3	Die Wirkung von Adenosin und NECA auf die endotheliale Schranken- funktion	34
4.1.4	Der Einfluss von Apyrase auf die ATP induzierte Stabilisierung der Schrankenfunktion	37
4.1.5	Der Effekt von ATP und Adenosin auf die interendotheliale Adhäsions- struktur	38
4.2	Der Einfluss von ATP und seinen Abbauprodukten auf die Permeabilität von Rattenmesenterialgefäßen in vivo	38
4.2.1	Die Wirkung von ATP auf die Permeabilität unter Hemmung der Adenosin-Rezeptoren in vivo	39
4.2.2	Die Wirkung von Adenosin auf die Permeabilität unter Hemmung der Adenosin-Rezeptoren in vivo	40
4.2.3	Veränderung des myokardialen Wassergehaltes in vivo	41
5.	DISKUSSION	43
6.	ZUSAMMENFASSUNG	48
7.	SUMMARY	50
8.	LITERATUR	52
9.	ANHANG	61
9.1	Veröffentlichungen	61
9.2	Erklärung	62
9.3	Danksagung	62

ABKÜRZUNGEN

[Ca ²⁺] _i	Zytosolische freie Calciumionenkonzentration
%	Prozent
°C	Grad Celsius
8PT	8-Phenyl-Theophyllin = 1,3-Dimethyl-8-phenylxanthine
Abb.	Abbildung
ADO	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyklisches Guanosinmonophosphat
EC50	Effektive Konzentration 50%
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E-NTPdase	Ekto-nukleosid-triphosphat-diphosphhydrolase
et al.	Und andere
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FITC-RSA	Fluorescein-Isothiocyanat-markiertes Rattenserumalbumin
GABA	γ-Aminobuttersäure
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
h	Stunde
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure
I.E.	Internationale Einheiten
i.m.	Intramuskulär
i.v.	Intravenös
K ⁺	Kalium-Ionen
kDa	Kilo Dalton (Gewichtseinheit)
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LDL	Low Density Lipoprotein

M	Mol / Liter
MLC	Myosinleichtketten
NaCl	Natriumchlorid
NCS	Neugeborenes Kälberserum
NECA	5-n-Ethylcarboxamidoadenosin
NO	Stickstoffmonoxid
NTP	Nukleosidtriphosphat
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
S.D.	Standardabweichung
sek	Sekunde
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
u.a.	Unter anderem
VE-Cadherin	Vaskuläres endotheliales Cadherin
vol / vol	Volumen / Volumen
z.B.	Zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1 Endothelzellen und ihre Funktion als Permeabilitätsschranke

Die Endothelzellen bedecken in allen intakten Blutgefäßen die gesamte luminale Oberfläche in einer einlagigen Zellschicht und bilden eine kontinuierliche semipermeable Barriere. Im Körper kommen bis zu 6×10^{13} Zellen vor, ihre Oberfläche beträgt geschätzt ca. 7000 m² und ihr Gesamtgewicht etwa 1 kg (Wolinsky, 1980; Simionescu et al., 1988). Ihre einzigartige Position stellt sowohl die Grenze als auch die Verbindung zwischen Blutplasma und dem interstitiellen Gewebe dar. Das Endothel ist an vielen physiologischen Prozessen beteiligt, darunter z.B. die Aufrechterhaltung der Hämostase, die Regulation des Vasotonus und der Permeabilität. Obwohl es regional deutliche Unterschiede der Endothelzellen gibt, kann es funktionell als ein Organ angesehen werden.

Mikrovaskuläre Endothelzellen kontrollieren als selektive Permeabilitätsbarriere die Extravasation von Makromolekülen, gelösten Stoffen sowie von zirkulierenden Zellen und halten den kontinuierlichen Blutfluss aufrecht, indem sie vor dem Verlust von Blutbestandteilen und Blutvolumen schützen. Zusätzlich sind sie in der Lage, immunkompetente Zellen aus dem Blutkreislauf zu rekrutieren und mit Hilfe von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen die Leukozytenadhäsion und -migration in das Interstitium zu regulieren. Der Austausch dieser Makromoleküle in gesundem kontinuierlichem Endothel findet durch die Aktivierung von Rezeptoren, Transportern oder über Vesikel statt (Predescu und Palade, 1993). Kleine lipid- und wasserlösliche Moleküle können die Endothelzellschicht durch Diffusion transzellulär ohne spezielle Transportmechanismen passieren; hierzu gehören neben O₂ und CO₂ auch Harnstoff und Anästhesiegase. Endothelzellen sind in dem vaskulären System enormen physikalischen und chemischen Stressoren ausgesetzt. Um eine stabile Gefäßwand bilden zu können, benötigen die Endothelzellen intakte fokale Adhäsionsproteine, bestehend aus Integrinen, Cadherinen und Tight Junctions (Wu, 2005). Die endotheliale Permeabilität wird durch zwei Mechanismen gesteuert, einerseits über eine Aktivierung des kontraktilen Apparates, andererseits über eine Desintegration der interzellulären Adhäsionsstrukturen. Ein wichtiges interzelluläres Strukturprotein ist VE-Cadherin.

Endothelzellen können auf verschiedene Arten Makromoleküle aufnehmen und weiter transportieren (Simionescu et al., 2002):

- [1] Endozytose: Die Zellen nehmen verschiedene Plasmaproteine und Moleküle für den Eigenbedarf auf, z.B. cholesterolhaltige Low Density Lipoproteine, Fettsäuren und Eisen.
- [2] Transzytose: Plasmaproteine werden zu den abluminalen Zellen (Fibroblasten, Histozyten, glatten Muskelzellen u.a.) transportiert. Hier wird nochmals zwischen zwei unterschiedlichen Mechanismen unterschieden.
 - [a] Transzellulärer Transport: Moleküle werden via Vesikel (Caveolae) und differenzierten Kanälen transportiert (Karnovsky, 1967). Dieser Weg wird durch die elektronenmikroskopische Entdeckung von sichtbaren Oberflächenvakuolen und zytoplasmatischen Vesikeln gestützt (Simionescu et al., 1988) und zeigt, dass die endotheliale Barriere nicht als physikalisches Sieb funktioniert (Predescu und Palade, 1993).
 - [b] Parazellulärer Transport: Moleküle werden über interzelluläre Spalträume (Majno, 1963) transportiert, die unter anderem durch inflammatorische Mediatoren wie Histamin und Thrombin entstehen können (van Hinsbergh et al., 1997).

Das Entstehen interendothelialer Spalträume, auch „Gaps“ genannt, führt zu Veränderungen der endothelialen Schrankenfunktion. Diese wird einerseits durch Störung der Zell-Zell-Komplexe, andererseits durch Aktivierung des kontraktiven Apparates verursacht.

1.2 Veränderungen in der endothelialen Schrankenfunktion

Die endotheliale Schrankenfunktion kann durch unterschiedliche Mediatoren beeinflusst werden, welche die Zellen über die Blutbahn oder das Interstitium erreichen. Unter verschiedenen pathologischen Bedingungen, beispielsweise verursacht durch inflammatorische Faktoren wie Histamin (Haraldsson et al., 1986) und Thrombin (Garcia et al., 1986), wird das Endothel eine gewisse Zeit hyperpermeabel für Makromoleküle. Dadurch können interzelluläre Lücken entstehen. Dieser Leakage bietet die Möglichkeit für den vermehrten Transport von Plasmaproteinen in das Interstitium, darunter auch Komplementfaktoren, Immunglobuline und Gerinnungsfaktoren (van Hinsbergh et al., 2002). *In vivo* kann eine gestörte vaskuläre Permeabilität zu lokalen Ödemen, Entzündungen oder

systemischen Reaktionen im Blutkreislauf und somit, wie zum Beispiel bei einer Sepsis (Simionescu et al., 1992), zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen.

Mediatoren wie ATP (Noll et al., 1999; Gündüz et al., 2003) und das atriale natriuretische Peptid (Lofton et al., 1990) können die endotheliale Schranke stabilisieren und die Permeabilität verringern. Abhängig vom Gefäßbett können auch Stickstoffmonoxid und cGMP einer endothelialen Hyperpermeabilität entgegenwirken (van Hinsbergh et al., 2002).

1.3 Makro- und Mikrozirkulation

Das Blutkreislaufsystem ist das Transportsystem und der Verteiler für Sauerstoff und Nährstoffe im Organismus. Die normale Funktion einer jeden lebenden Zelle ist abhängig von einem einwandfreien Regulationsmechanismus, der auf der Ebene von Blutgefäßen stattfindet. Der Austausch von Plasmamolekülen erfolgt im gesamten Gefäßnetz, hauptsächlich in der kapillären Mikrozirkulation, wo die Endothelzellen den größten Anteil ausmachen. Die Mikrozirkulation kann als Blutzirkulation des Endstromgebietes angesehen werden. Dieses setzt sich aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen zusammen. Auch die terminalen Lymphgefäße werden von diesem Terminus erfasst. Präkapilläre Arteriolen machen etwa 50% des peripheren Widerstandes aus. Sie sind entscheidend an der Aufrechterhaltung des systemischen Blutdrucks beteiligt. Die Kapillaren entspringen aus den Arteriolen und bilden untereinander ein funktionelles Netzwerk. In den postkapillären Venolen als Kapazitätsgefäße und Bestandteil des Niederdrucksystems sammelt sich das Kapillarblut zum Abtransport. Die Grundlagen der kapillären Mikrozirkulation wurden zuerst im Rattenmesenterium untersucht (Chambers et al., 1944).

1.4 Extrazelluläres ATP

Drury und Szent-Györgyia beschrieben 1929 kurz nach der Entdeckung von ATP zum ersten Mal die Wirkung von extrazellulären Nukleotiden auf das kardiovaskuläre System. Sie beobachteten einen hypotensiven Effekt, der zunächst Adenosin, dem Abbauprodukt von ATP, zugeschrieben wurde (Drury und Szent-Györgyia, 1929). Das Interesse an extrazellulären Nukleotiden nahm seit den Pionierarbeiten von Burnstock in den frühen Siebzigern weiter stetig zu.

Extrazelluläre Nukleotide haben eine Vielzahl von Effekten auf physiologische Prozesse in neuronalen und kardiovaskulären Systemen. ATP kann als schneller Neurotransmitter oder als Cotransmitter, mit z.B. Noradrenalin, Acetylcholin oder GABA, agieren (Ghildyal et al., 2002; Burnstock, 2004). Es reguliert die Entstehung von Schmerzsignalen mit (Chen et al., 1995), hemmt die ADP-vermittelte Thrombozytenaggregation (Macfarlane et al., 1974) und bewirkt eine Kontraktion in glatten Gefäßmuskelzellen (Burnstock, 1972). Extrazelluläre Nukleotide beteiligen sich an der Regulation des Gefäßtonus (Erlinge, 2001), indem sie unter anderem die Freisetzung von NO beeinflussen und somit in die flussregulierte arterielle Vasoregulation eingreifen. Außerdem vermitteln sie eine Vielzahl von antiinflammatorischen Reaktionen, inklusive der Freisetzung von Zytokinen, Tumornekrose-Faktor- α und Interleukin-1 β aus Monozyten. Über diese und weitere Mechanismen hemmt ATP das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren (Abraham et al., 2003), moduliert Immunzellen (Di Virgilio et al., 2005) und bewirkt die Abstoßung von Xenografts (=Heterotransplantaten) (Redegeld et al., 1999). Rasche Effekte extrazellulären ATPs sind abhängig vom Zelltyp, Permeabilitätsveränderungen, Zellnekrose, Apoptose, Zellproliferation und Akkumulation von Second Messenger (Redegeld et al., 1999).

Unter normalen Bedingungen kommen extrazelluläre Nukleotide in Konzentrationen von unter 0,1 μ M vor (Coade und Pearson, 1989; Zimmermann, 1992). Die intrazelluläre Konzentration von ATP beträgt etwa 5 mM. Schädigungen der Zelle bewirken einen Austritt von ATP in den extrazellulären Raum. Unter experimentellen Bedingungen, wie z.B. einer standardisierten Inzision von menschlicher Haut, kann somit dort eine Konzentration von 0,2-20 mM erreicht werden (Born et al., 1984). Die Sekretion und/oder Abgabe von ATP kann auf unterschiedlichster (patho)physiologischer Weise erfolgen: zum Beispiel aus sympathischen Nerven als Co-Release mit Noradrenalin (Burnstock, 1988), aus Thrombozyten und Zellen des Nebennierenmarks (Gordon et al., 1986), aus aktivierten zytotoxischen und T-Helfer Zellen (Filippini et al., 1990), während eines traumatischen Schocks (Green et al., 1949), unter inflammatorischen Bedingungen (Bodin und Burnstock, 1998), durch Schubspannung (shear-stress) (Bodin und Burnstock, 2001), Myokardhypoxie (Clemens und Forrester, 1981) und hypotonische Lösungen (Taylor et al., 1998). ATP kann außerdem aus einer weiteren Vielzahl von Zellen freigesetzt werden, u.a. Hepatozyten (Schlosser et al., 1996), Astrozyten

(Guthrie et al., 1999), Epithelzellen (Taylor et al., 1998), Erythrozyten (Bergfeld und Forrester, 1992), glatten Muskelzellen (El-Moatassim et al., 1993), Lymphozyten und Makrophagen (Rapaport und Fontaine, 1989).

ATP findet bereits in verschiedenen medizinischen Bereichen eine therapeutische Verwendung. Es wird bei Hyperalgesie, neuropathischen und ischämischen Schmerzen verwendet. Während Operationen wird es bei Hypotension eingesetzt und kann die Überlebenschance eines Patienten mit hämorrhagischem Schock erhöhen (Agteresch et al., 1999). Bei Patienten mit pulmonaler Hypertension kann ATP zu einer Dilatation der pulmonalen Gefäße führen. In der Kardiologie werden ATP und Adenosin zur Diagnose und Behandlung paroxysmaler supraventrikulärer Tachykardien angewendet. Desweiteren wird ATP erfolgreich zur Behandlung der zystischen Fibrose genutzt (Agteresch et al., 1999). Zusätzlich zu den antikanzerogenen Eigenschaften erhöht es die Resistenz der nicht-malignen Zellen gegenüber Chemo- und Radiotherapie und besitzt einen deutlichen antikachektischen Effekt. Vornehmlich bei älteren Patienten verringert ATP den Gewichtsverlust und verhindert hormonelle Entgleisungen (Abraham et al., 2003). In der Augenheilkunde wird ATP bei einigen Therapiekonzepten gegen Glaukom, Netzhautablösung und bei austrocknenden Augen eingesetzt (Pintor et al., 2003). In der Neurologie stellt ATP ein potentiell Ziel für antiepileptische Substanzen dar (Kumaria et al., 2008).

1.5 Das ATP-Abbauprodukt Adenosin

Adenosin ist ein sehr wichtiges Bindeglied für den Metabolismus der Purin-Nukleotide. Seine Wirkungen sind oft entgegengesetzt zu ATP. Extrazellulär entsteht Adenosin aus dem Katabolismus von Adenin-Nukleotiden. Eine weitere wichtige Quelle ist intrazelluläres Adenosin, welches mit Nukleosid-Transportern nach extrazellulär gelangt (Haskó und Pacher, 2008). Es moduliert eine Vielzahl von Zellfunktionen, darunter die Phagozytose (Salmon et al., 1993), die Antigenpräsentation, die Zielzelltötung (Priebe et al., 1990), die Expression von MHC Klasse II Molekülen und die Produktion von Interleukinen (Le Moine et al., 1996). Die Halbwertszeit von Adenosin beträgt nur wenige Sekunden, *in vivo* wird es schnell durch die Adenosindeaminase zu Inosin abgebaut (Bullough et al., 1994).

Die Produktion von NO wird in Epithelzellen durch Adenosin erhöht (Li et al., 1995). Das umfangreiche Wirkprofil von NO (Vasodilatation, Hemmung der Thrombo-

zytenadhäsion, –aggregation und Leukozytenadhäsion) ist wichtiger Bestandteil der endothelialen Schrankenfunktion. Laut Literatur verhindert Adenosin die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten (Zhao et al., 1996). Zudem verringert es vaskuläre Schäden durch die verminderte Freisetzung reaktiven Sauerstoffs und die Hemmung der Plättchenaggregation (Ely und Berne, 1992; Obata, 2002). Eine verringerte NO-Produktion, meist hervorgerufen durch freie Sauerstoffradikale, führt zu einer endothelialen Dysfunktion (Weidinger und Frick, 2000). Bei inflammatorischen Reaktionen unterstützt es die Vasodilatation und supprimiert die Leukozytenadhäsion an das vaskuläre Endothel (Ohta et al., 2001).

Adenosin wird aufgrund antiinflammatorischer Wirkungen in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt, u.a. bei Rheumatischer Arthritis (Szabo et al., 1998), Nephritis (Poelstra et al., 1988) und Uveitis (Marak et al., 1988).

1.6 Ektonukleotidasen: Der Metabolismus von extrazellulärem ATP zu Adenosin

Extrazelluläres ATP wird durch die Enzym-Familie der E-NTPdasen abgebaut. Mitglieder dieser Enzymgruppe können Nukleosid 5'-triphosphate und Nukleosid 5'-diphosphate hydrolysieren. Das jeweilige bevorzugte Nukleotid kann dabei variieren. Insgesamt aber repräsentieren sie alle eine Ecto-Nukleosid-5'-triphosphat-diphosphohydrolase (Zimmermann, 2000). Die bekannteste Ektonukleosid-triphosphat-diphosphohydrolase ist CD39 [NTPDase1, Ecto-ATPase, Apyrase]. Sie hydrolysiert Nukleosid Tri- und Diphosphate gleichwertig. Andere Enzyme, die sich an dem Abbau und der gegenseitigen Umwandlung von Nukleotiden beteiligen, sind die Ektonukleotidpyrophosphatasen, Ektonukleotidphosphodiesterasen, Nukleosidediphosphokinasen und die Adenylat-Kinase (Zimmermann, 2000).

CD39 ist ein transmembranäres Glykoprotein und hat eine Molekülmasse von 70-100 kDa (Plesner, 1995). Apyrase ist die lösliche Form. Es wird auf Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten exprimiert. Das Enzym findet sich auf über 90% der Monozyten, Neutrophilen, B-Lymphozyten und zu 6% auf T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen. Die Dichte der Expression pro Zelle variiert. Die höchste Expression besitzen Monozyten und B-Lymphozyten, die niedrigste T-Lymphozyten (Pulte et al., 2007). Laut Literatur bewirkt CD39 eine Thrombozytenaggregationshemmung (Marcus et al., 1997), desweiteren kann es

eine homozytische Adhäsion von Leukozyten durch monoklonale Antikörper induzieren (Kansas et al., 1991).

Der weitere Abbau von ADP/AMP erfolgt durch CD73 [Ecto-5'-Nukleotidase]. CD73 wird in vier Gruppen nach zellulärem Vorkommen und biochemischer Wirksamkeit eingeteilt: eine membranverankerte, eine lösliche und zwei zytoplasmatische Formen (Misumi et al., 1990). Dieses Protein kommt hauptsächlich als Dimer vor. Das Molekulargewicht eines Monomers liegt zwischen 62 und 74 kDa (Zimmermann, 2000). Es wird ebenfalls auf T- und B-Zell Lymphozyten exprimiert (Zimmermann, 1992; Zimmermann, 2000). Die Aktivität von CD73 wurde das erste Mal in Herz- und Skelettmuskelzellen vor über 75 Jahren beschrieben (Reis, 1934). CD73 ist hauptverantwortlich für die Bereitstellung von extrazellulärem Adenosin aus freigesetzten Adenin-Nukleotiden. Desweiteren beteiligt es sich an Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen und rezeptorvermittelten Signalkaskaden (Arias et al., 1995). Das Enzym findet sich neben den Endothelzellen unter anderem in Hepatozyten, Fibroblasten, Lymphozyten und Gliazellen (Resta et al., 1993).



Abbildung 1: Schema der Metabolisierung von ATP über ADP und AMP zu Adenosin.

1.7 Purinerge Signalwege: P1 und P2 Rezeptoren

Extrazelluläres ATP und seine Metabolite wirken über spezifische Purinrezeptoren. Früher erfolgte eine Einteilung in P1 und P2 Rezeptoren (Abbraccio und Burnstock, 1998). Heute verwendet man für P1 den Begriff Adenosin-Rezeptoren.

Bisher wurden vier verschiedene G-Protein gekoppelte Adenosin-Rezeptoren auf molekularer Ebene charakterisiert: A1, A2A, A2B und A3 Rezeptoren (Fredholm et al., 1994; Ralevic und Burnstock, 1998). Die zellulären Antworten werden über cAMP-abhängige und unabhängige Reaktionswege vermittelt (Cronstein, 1993). Die A1-Rezeptoren sind klassischerweise mit der Inhibierung der Adenylatzyklase vergesellschaftet. Die Unterteilung der A2-Rezeptoren in A2A-Rezeptoren und A2B-Rezeptoren erfolgte aufgrund einer unterschiedlichen Bindungskapazität an

Antagonisten. Die Wirkung von A2A-Rezeptoren wird durch eine Aktivierung der Adenylatzyklase über ein G_s -Protein vermittelt. Die Aktivierung der A3-Rezeptoren bewirkt eine Erhöhung der zellulären Inositolphosphat-Konzentration und somit der intrazellulären Calciumkonzentration (Olah und Stiles, 1995). Im Gefäßsystem beobachtet man bei einer Innervation von A1-Rezeptoren eine Vasokonstriktion (Pearson und Carter, 1990). Ferner wird über denselben Rezeptor eine negativ inotrope und dromotrope Wirkung am Herzen ausgelöst (Pearson und Carter, 1990). Die Aktivierung von A2-Rezeptoren auf glatten Muskelzellen (Prentice und Hourani, 1996) und auf Endothelzellen (Iwamoto et al., 1994) bewirkt eine Vasodilatation.

Die Gruppe der Purin-Rezeptoren unterteilt sich nochmals in die zwei Hauptklassen der P2X und P2Y Rezeptoren. Diese Rezeptoren kommen auf vaskulären glatten Muskel- und Endothelzellen im gesamten kardiovaskulären System vor und spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus (Ralevic und Burnstock, 1998).

Die P2Y Rezeptoren sind G_o/G_q -gekoppelte Rezeptoren. Die meisten von ihnen wirken über das G-Protein an die Phospholipase C oder über eine Inhibierung der Adenylatzyklase und der N-Typ Ca^{2+} Kanäle; zudem kann eine Aktivierung der K^+ Kanäle vorkommen (North und Barnard, 1997; Burnstock, 2006). Eine Aktivierung von P2Y Rezeptoren vermittelt vaskuläre Effekte (Harden et al., 1998), auf Endothelzellen wirken sie konstriktorisch und auf Glattmuskelzellen dilatatorisch (Ralevic und Burnstock, 1998). Die protektive Wirkung von ATP auf vaskuläre Endothelzellen wird überwiegend über P2Y Rezeptoren vermittelt (Noll et al., 1999). Funktionell können P2X Rezeptoren eine Doppelrolle in Arterien übernehmen. Eine direkte Wirkung auf glatte Muskelzellen führt zu einer Konstriktion, eine indirekte Wirkung auf intakte Endothelzellen dilatierend (Harrington und Mitchell, 2004).

1.8 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie macht die Beobachtungen der Mikrozirkulation von Organen in narkotisierten oder bewusstlosen Tieren möglich. Die erste Beschreibung geht auf Waller zurück, der Leukozyten in Blutgefäßen von Froschzungen beobachtete (Waller, 1846). Mit Hilfe von speziellen Fluoreszenzmarkern, wie zum Beispiel FITC-markiertem Albumin, können detaillierte Ergebnisse über die mikrovaskuläre Permeabilität in verschiedenen Tiergeweben gewonnen werden. In den letzten Jahrzehnten wurden erfolgreich intravitalmikroskopische Versuche mit

verschiedenen chirurgischen Techniken an unterschiedlichen Tierorganen, wie z.B. an Herz (Tillmanns et al., 1974), Lunge (Kuhnle et al., 1993) und Darm (Laux und Seiffge, 1995; Lendemans et al., 2000) durchgeführt.

Video- und computerunterstützte *in vivo*-Studien der Mikrozirkulation am Mesenterium gehören zu den so genannten „akuten Präparationen“ (Menger et al., 2002). Diese Modelle haben den Nachteil, dass sie ein akutes chirurgisches Trauma beinhalten und nur in anästhesierten Tieren durchgeführt werden können. Daher ist auch die Beobachtungszeit dieser akuten Präparationen auf einige Stunden beschränkt. Vorteile dieser Methoden sind eine schnelle Beobachtungsmöglichkeit durch eine kurze Präparationszeit von ca. 45 min. Zu diesem Modell gibt es bereits eine umfangreiche Datenlage (Laux und Seiffge, 1995; Lendemans et al., 2000).

1.9 Ziele der Arbeit

Verschiedene Ereignisse führen zu einem endothelialen Schrankenversagen und begünstigen somit die Entstehung von Ödemen. Bis heute wurde keine effektive Substanz gefunden, die dauerhaft die endotheliale Barriere stabilisieren kann.

Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der Purin-Rezeptor-Agonist ATP an Endothelzellschichten verschiedener Herkunft eine Abnahme der Permeabilität hervorruft (Noll et al., 1999). Für den kausalen Zusammenhang wurde eine Myosin-Leichtketten-Phosphatase identifiziert, die durch Dephosphorylierung von MLC eine Hemmung des kontraktilen Apparates bewirkt (Noll et al., 2000). Gündüz et al. zeigten 2006, dass sowohl exogen als endogen freigesetztes ATP die endotheliale Schrankenfunktion stabilisiert. Diese Untersuchungen fanden mit kulturierten humanen Nabelschnurvenenendothelzellen und zusätzlich an isoliert perfundierten Rattenherzen statt (Gündüz et al., 2006).

Bestimmte (patho)physiologische Ereignisse, zum Beispiel im Rahmen eines traumatischen Schocks (Green et al., 1949) oder eines inflammatorischen Geschehens (Bodin und Burnstock, 1998), erhöhen den Gehalt an extrazellulärem ATP und folglich auch seiner Metabolite. In dieser Arbeit soll die Frage beantwortet werden, ob extrazelluläres ATP in der Lage ist, langfristig die endotheliale Permeabilität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu stabilisieren. Hierbei soll geklärt werden, ob ein antagonistischer Effekt zwischen ATP und seinen Abbauprodukten besteht. Als experimentelles *in vitro* Modell wurden zum einen koronare mikrovaskuläre Endothelzellschichten aus Ratten in einem Zweikammersystem

verwendet und zum anderen mit immunhistochemischen Methoden VE-Cadherin bestimmt. Die *in vivo* Untersuchung wurde an Rattenmesenterialgefäßen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Desweiteren wurde die Veränderung des Wassergehaltes von Rattenherzen gemessen. Dieses Wissen könnte in der Zukunft hilfreich sein, neue Therapiestrategien gegen Ödembildung und das „capillary leakage syndrome“ zu entwickeln.

2. MATERIAL

2.1 Endothelzellmonolayer

Brutschrank B 6030	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Costar Transwell® Permeable Support	Corning Inc., Corning, New York, USA
0,4µm Polycarbonate Membrane	
Culture Tubes 10ml	Greiner bio one GmbH, Frickenhausen
Falcon plastic tissue culture dishes, 100 mm, type 3003	Becton Dickinson, Heidelberg
Imago CCD Kamera	Tillvision, Martinsried
Magnetrührer Variomag	Telesystem
Mikroskop Axiovert 135	(siehe Material Intravitalmikroskopie)
Mikroskop Olympus IX 70	Olympus, Hamburg
Monochromator Polychrome IV	Tillvision, Martinsried
Pipette 10 ml in 1/10	Greiner bio one GmbH, Frickenhausen
Pipetten Eppendorf 10 µl und 200 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl	Sarstedt AG u. Co., Nümbrecht
Pipettierhilfe Acuboy	TecNoMara
Plexiglas-Schalen für Wasserbad des Zweikammersystems (Maßanfertigung)	
Schlauchpumpe IPC High Precision	ISMATEC, Glattbrugg, Schweiz
Multichannel Dispenser	
Spektrometer Specord UV VIS S10	Analytik Jena, Jena
Waage Sartorius BP 310S	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Von Keutz Labortechnik, Reiskirchen
Wasserpumpe Lauda A100	Lauda GmbH & Co KG, Lauda
Zentrifuge Hettich Rotixa/RP	Hettich, Tuttlingen

2.2 Intravitalmikroskopie

Präparationsinstrumente

Cellstar®, PP-Test tubes, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Glasröhrchen Borosilicate Glass	Corning Incorporated, Corning New York, USA
Disposable Culture Tubes, 12x75 mm, 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
Ligaturfaden Vicryl 3/0 3 x 45 cm, violett geflochten, Polyglactin 910	Ethicon GmbH, Norderstedt
Mikro-Präparierpinzette, Wornit, gebogen, 105 mm, HWC 115-10	Hammacher, Solingen
Mikro-Präparierschere, Wornit, gerade spitz/spitz, 110 mm, HWB 002-11	Hammacher, Solingen
Mikroschere nichtrostend, gerade, 80 mm (Vanas), HSB 534-08	Hammacher, Solingen
Mikroschlauch, Non Sterile Polythene Tubing 0,58/0,96 mm	SIMS Portex Ltd., UK
Mikroskopierpinzette aus Wornit, gebogen, 105 mm, HWC 071-10	Hammacher, Solingen
Pinzette chirurgisch, 145 mm, 12-321-14	Carl Martin GmbH, Solingen
Tracheostoma: Perfuserleitung, 180 cm gekürzt auf ca. 3,5 cm	Braun Melsungen AG, Melsungen
Verbindungsschlauch, Silikon 0;5 x 2,5 mm, transparent	Herbert Kalensee, Gießen

Infusionssysteme

Perfuser, Typ VI Typ 871222-0 Nr. 09438	Braun Melsungen AG, Melsungen
Perfuser, Typ Secura 871702-8 Nr. 3047	Braun Melsungen AG, Melsungen
Haward Syringe Pump 22	FMI GmbH, Seeheim/Oberseebach

Geräte und Apparate

Brutschrank B 6030	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Drucktransducer Combitrans Monitor Set	Braun Melsungen AG, Melsungen
Druckmonitor HP Nr. 78342A	Hewlett Packard GmbH, Böblingen
Elektrokauter 539 205	LUX Werkzeuge GmbH, Wermelskirchen
Faserlichtquelle FLQ 150 M	HUND, Wetzlar
Magnetrührer IKA-Combing RET	Janke&Kunkel IKA-Werk, Staufen
Pipetten Eppendorf 100 µl und 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Plexiglasplatte mit Objektträger	

Rasierapparat Typ 1451 Headliner	Moser, Deutschland
Rührgerät REAX 2000	Heidolph, Kelheim
Waage Sartorius 2357 (Tiergewicht)	Sartorius AG, Göttingen
Waage Sartorius BP 310S	Sartorius AG, Göttingen
Warmwasserlaufpumpe Julabo V	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Wasserbad Thermomix 1419	Braun, Melsungen
Wasserbehälter Julabo F-10	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zentrifuge Rotixa RP	Hettich; Tutlingen

2.3 Mikroskop inklusive Hardware

Mikroskop

Mikroskop Axiovert 135	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 Schutzfilter	
Lampengehäuse HBO 50 inklusive 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 Achromplan 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

Kameraadapter 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

2.4 Medien, Reagenzien und Substanzen

8-Phenyl-Theophyllin 1 mmolare Lösung in 0,1 n NaOH sterilfiltriert (=1,3-Dimethyl-8-phenylxanthine)	Sigma®, Bodenheim
Adenosin Cat. No. 1160	Calbiochem®, EMD, San Diego CA, USA
Adenosin - 5'-triphosphat (ATP) Charge 10 519 979 001 1g Lot No: 93306120	Roche, Grenzach-Wyhlen
Albumin, Ratten-Fraktion V Sigma A Lot No: 035 K 7570	Sigma®, Bodenheim
Apyrase (EC 3.6.1.5) Grad I EC No 232-569-8 Lot No: 014 K 7 949	Sigma®, Bodenheim
Dil-ac-LDL Solution (Konzentration 200 µg/ml)	Biomedical Technologies Inc., Stoughton MA, USA
Endothel-Zellen-Wachstums Medium (10 ml FCS, 2 ml ECGS/H, 0,1 ng/ml EGF, 1,0 ng/ml bFGF, 1 µg/ml Hydrocortison) Lot No 7080709	Promocell, Heidelberg
ENLITEN® rLuciferase / Luciferin Lot No: 237936	Proemga Corporation, Madison, USA
FITC Sigma F 7250 Lot No: 025 K 5312	Sigma®, Bodenheim
FITC-konjugierte Anti-Maus IgG Antikörper	Sigma®, Bodenheim
Fluorescein Isothiozyanat I	Roche, Grenzach-Wyhlen Roth, Karlsruhe

HEPES -Lösung

(Zusammensetzung (in mM): NaCl (140,0);
KCl (2,6), KH₂PO₄ (1,2), MgSO₄ (1,2),
CaCl₂ (1,3), HEPES (25,0); Glukose (5,0))

Isofluran – Baxter 250 ml

Baxter Deutschland GmbH

Ch.-B. 6D13A34

Isotone Kochsalzlösung 0,9%

Braun Melsungen AG, Melsungen

Liquemin N 25000

Roche, Grenzach-Wyhlen

(Heparin 25000 Einheiten)

Ch.B. G 070631

Medium 1: Medium 199 mit Earle's salts
mit Puffer (26mM NaHCO₃, 5% CO₂,

Boehringer, Mannheim

pH 7,4 10% neugeborenes Kälber-
serum, 10% fetales Kälberserum,

Penicillin 250 I.E./ml, Streptomycin

250 µg/ml, Amphoterecin B

12,5 µg/ml, Gentamycin 50 µg/ml)

Medium 2: wie Medium 1, jedoch
geringere Konzentrationen der

Boehringer, Mannheim

Antibiotika (Penicillin 100 I.E./ml,

Streptomycin 100 µg/ml,

Amphotericin B 5 µg/ml)

Narcoren, Pentobarbital-Natrium

Merial GmbH, Hallbergmoos

Ch.-B. 134063

Paraffin, dünnflüssig,

Merck KGaA, Darmstadt

DAB, PH, Eur, BP, NF

PBS (Zusammensetzung in mM: 137

NaCl, 2,7 KCl, 1,5 KH₂PO₄ und 8,0

NA₂HPO₄, bei pH 7,4, supplimentiert mit

0,05% (wt/vol) Trypsin und 0,02%

(wt/vol) EDTA)

Säulen Pharmacia columns PD-10

GE Healthcare Bio-Sciences AB

Trypanblau in HBSS + Albumin

Sigma®, Bodenheim

Trypsin-EDTA (10x)

Cat No L11-003

Lot No L00306-1798

Tyrode-Lösung (Zusammensetzung in mM: 150 NaCl, 2,7 KCl, 1,2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, 1,0 CaCl₂, und 30,0 N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure; pH 7,4; 37°C)

Urethan (Ethylcarbammat 99 % rein),
51-59-6 EEC Nr. 200-123-1

PAA Laboratories GmbH, Pasching,
Österreich

Sigma®, Bodenheim

Die Konzentration der einzelnen Substanzen wurde an das Blutvolumen (60 ml/KG) der jeweiligen Ratte angepasst. 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.

3. METHODEN

3.1 Isolation, Kultivierung und Identifizierung von mikrovaskulären Endothelzellen

Die Isolierung der koronaren mikrovaskulären Endothelzellen erfolgte nach einer Methode von Piper et al. (1990). Die Zellen wurden mit Hilfe eines Langendorff-Systems gewonnen und stammten von 250 g schweren Wistar Ratten. 25 ml der gewonnenen Zellsuspension wurden jeweils auf eine der Falcon Kulturschalen gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach vier Stunden wurden die Kulturschalen heftig geschüttelt, anschließend der überflüssige Zelldebris und nicht adhärenente Zellen abgetragen. Es folgte die Zugabe von 40 ml des Medium 1 (siehe Material). Dieses Medium wurde nach 24 Stunden Kultivierung wieder erneuert. Zu diesem Zeitpunkt enthielt jede Schale etwa 1×10^6 Zellen. Das Medium wurde zwei Tage nach Beginn der Kultivierung durch Medium 2 (siehe Material) ersetzt. An jedem weiteren Tag wurde das Medium erneuert. Nach fünf Tagen Zellkultivierung enthielt jede Schale einen endothelialen Monolayer mit $6-10 \times 10^6$ Zellen/100 mm Schale, dies entspricht $1-2 \times 10^5$ Zellen/cm².

Die primäre Endothelzellkultur wurde nun mit einem PBS-Puffer (siehe Material) trypsiniert und die Zellen mit einer Dichte von 7×10^7 Zellen/cm² auf die 24 mm Polycarbonatmembranen gegeben. Die Experimente wurden mit konfluenten Monolayern vier Tage nach dem Umbetten durchgeführt.

Die Identifikation der Endothelzellen erfolgte anhand der klassischen „Pflasterstein“-Morphologie und mit Hilfe eines immunfluoreszenzmikroskopischen Antikörpernachweises von fluoreszierendem acetylierten LDL (Dil-ac-LDL; siehe Material) (Piper et al., 1990).

3.2 Makromolekül-Permeabilität von Endothelzellmonolayern

Die endotheliale Permeabilität wurde in einem Zweikammersystem gemessen. Diese war durch eine Filtermembran mit einer Porengröße von 0,4 µm getrennt (Noll et al., 1995) und auf der luminalen Seite mit einem Endothelzellmonolayer bedeckt. Beide Kompartimente waren mit einer als Basismedium modifizierten Tyrode-Lösung (siehe Material) und zusätzlich mit 2% (V/V) hitzeinaktiviertem NCS (10 Minuten bei 55°C) gefüllt. Zwischen beiden Kompartimenten existierte keine hydrostatische Druckdifferenz.

Im „luminalen“ Kompartiment befanden sich 2,5 ml Volumen, dieses enthielt die Endothelzellschicht. Das „abluminale“ Kompartiment hatte ein Volumen von 9,5 ml. Das Medium des abluminalen Kompartiments wurde stetig umgerührt. In dem luminalen Kompartiment befand sich zusätzlich trypanblau-markiertes Albumin (60 μM). Der Gehalt von trypanblau-markiertem Albumin im abluminalen Kompartiment wurde kontinuierlich mit Hilfe des Spektrophotometers Specord 10 gemessen, indem das abluminale Medium rezirkulierend über eine integrierte Durchflussküvette gepumpt wurde. Die Schläuche des Spektrophotometers wurden vor Beginn der Versuche mit Medium gespült und luftfrei gefüllt. Der Spektrophotometer arbeitete in einem Zwei-Wellenlängen-Modus: Wellenlänge zur Messung von Trypanblau: 600 nm, versus Kontroll-Wellenlänge: 720 nm. Eine Zunahme der trypanblau-markierten Albuminkonzentration wurde mit einer minimalen Zeitverzögerung von unter 15 Sekunden registriert. Während der Inkubationszeit und im Verlauf des Experiments wurde die Konzentration konstant alle 5 Minuten bestimmt. Es bestand eine direkte Verbindung des Spektrometers mit einem PC. Die Digitalisierung der Daten erfolgte mit der Software Aspect Plus.

Der Albumin-Fluss F [$\text{mol}/(\text{sek} \times \text{cm}^2)$] durch den Endothelzellmonolayer mit der Fläche S wurde durch den Anstieg der Konzentration von Albumin ($d[A]_2$) während des Zeitintervalls dt im albuminalen Kompartiment mit dem Volumen V berechnet:

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

Der Permeabilitätskoeffizient P [cm/s] aus dem Zellmonolayer und der Filtermembran wurde wie folgend bestimmt:

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

$[A]_1$ und $[A]_2$ stehen für die Konzentrationen von Albumin in den luminalen und abluminalen Kompartimenten. Da sich die treibende Kraft ($[A]_1 - [A]_2$) im Verlauf des Versuches annähernd konstant verhielt, entspricht der Permeabilitätskoeffizient P den relativen Veränderungen F . Bei unbehandelten Endothelmonolayern blieb der Albuminfluss während des ganzen Beobachtungsintervalls konstant.

Um die Makromolekül-Permeabilität bestimmen zu können, wurden die Filtermembranen mit den darauf kultivierten Endothelzellschichten in die Inkubationskammer gelegt. Als Medium für die Inkubation wurde die bereits beschriebene Tyrodelösung (Basalmedium) verwendet. Zunächst wurde eine Äquillibrierungsphase von 20 Minuten eingehalten, anschließend wurde die Basalpermeabilität der Endothelzellschichten über den Zeitraum von 20 Minuten hinweg bestimmt. Nun erfolgte die Substanzgabe. Für weitere 60 Minuten wurde die Albuminpermeabilität kontinuierlich gemessen.

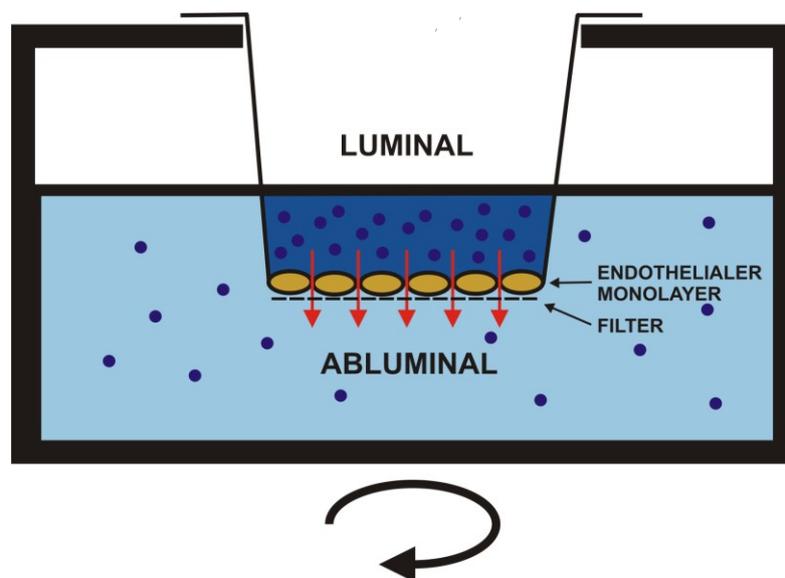


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zwei-Kompartimentensystems

3.3 Immunhistochemische Bestimmung von VE-Cadherin

Zur immunhistochemischen Bestimmung des interendothelialen Adhäsionsproteins VE-Cadherin wurde eine etablierte Methode der Immun-Fluoreszenzmikroskopie verwendet (Bindewald et al., 2004). Konfluierende Endothelzell-Monolayer wurden zunächst dreimal mit PBS Puffer gespült, anschließend mit 100% Methanol über 10 Minuten bei 20°C fixiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Zell-Proben wurden mit 100 μ l eines FITC-konjugierte Anti-

Maus IgG Antikörper (Verdünnung mit PBS 1:200) beschichtet und für 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Diese wurde hiernach auf die Objektträger gebracht. Die Deckgläser der Objektträger wurden jeweils mit einem Tropfen einer HEPES-gepufferten Glycerin Lösung [Verhältnis 1:2 (vol / vol), pH 8,5] (siehe Material) benetzt. Die Beobachtung erfolgte mit Hilfe des Immunfluoreszenz-Mikroskop Olympus IX 70. Immunhistochemisch wurde die Veränderung der VE-Cadherin Zelladhäsions-Komplexe 10 min nach der Substanzgabe bestimmt. Zur Luminierung der FITC markierten Antikörper wurde eine UV-Lampe verwendet. Als Filterung für das FITC-spezifische Strahlenmuster wurde die spezielle Filterkombination FITC/TEXAS red 485/578 benutzt. Die Bilder wurden mit der Imago CCD Camera aufgezeichnet und mit Hilfe der Analysesoftware „Till Photonics“ der Firma Tillvision auf einem PC digitalisiert.

3.4 Intravitalmikroskopie

Als *in vivo* Methode wurde ein Modell von Lendemans (2000) verwendet und weiterentwickelt. Dieses Modell der Intravitalmikroskopie ermöglicht eine reproduzierbare und schonende Betrachtung der Mesenterialgefäße der Ratte für die Epiillumination (Fluoreszenzmikroskopie mit FITC-RSA) zur Bestimmung von mikrovaskulärer Permeabilität *in vivo*. Für die Versuche wurden männliche CD-Ratten der Firma Charles River mit einem Gewicht von 280 g - 400 g verwendet. In Testpräparationen zeigte sich, dass Tiere ab 280 g bereits genügend Mesenterialgefäße aufwiesen, Tiere über 400 g jedoch häufig zu viel Fettgewebe besaßen und so die Fluoreszenzmikroskopie einschränkten. Zur Narkose wurde die Substanz Urethan i.m. verwendet, da der Einfluss auf Blutdruck, Herzfrequenz, Atmung und somit der peripheren Durchblutung äußerst gering ist. Zudem wird eine konstante Narkosetiefe erreicht (Lendemans et al., 2000). Urethan wurde bereits in weiteren intravitalmikroskopischen Arbeiten erfolgreich verwendet (Laux und Seiffge, 1995; Lendemans et al., 2000). Als Objektträger wurde eine Plexiglasplatte mit eingelassenem Sichtfenster verwendet, die den Abmessungen des Mikroskopiertisches entsprach. Für die Äquilibrationsphase wurde ein Zeitintervall von 20 min nach FITC-Gabe festgelegt, um eine weitestgehende Verteilung des FITC und eine Normalisierung des Kreislaufes zu erreichen. Die Beobachtungsdauer betrug 110 min. Um eine Schädigung der Gefäßendothelzellen durch UV-Licht so gering wie möglich zu halten, wurden alle Gefäßabschnitte nur jeweils 15 Sekunden

lang in einem Intervall von 10 min gefilmt. Die Infusionsmenge mit physiologischer Kochsalzlösung wurde auf 1,2 ml/h während der Präparation festgelegt, um respiratorische (durch das Tracheostoma verursachte) und präparationsbedingte Flüssigkeitsverluste auszugleichen. Während der Aufnahme wurde die NaCl-Infusion auf 2,5 ml/h erhöht, um den Blutdruck konstant zu halten.

Die CD-Ratte wurde mit Isoflurane vornarkotisiert. Es folgte die intramuskuläre Applikation von 6 ml/kg KG der 30 prozentigen Urethan-Lösung, jeweils in beide Seiten der Oberschenkel. Nach 45 min war eine ausreichende Narkosetiefe erreicht, was durch den erloschenen Kornealreflex kontrolliert wurde. Anschließend wurde das Tiergewicht ermittelt. Es folgte eine gründliche Rasur des Halses und der linkslateralen abdominellen Hälfte. Die Ratte wurde dann auf einer 37°C vorgewärmten Wärmeplatte fixiert. Um die Vena jugularis externa und die Arteria carotis zu kanülieren, erfolgte ein ca. 1,5 cm langer Halsschnitt entlang des rechten Musculus Sternocleidomastoideus. Der venöse Katheter wurde mit einem NaCl-Perfuser verbunden (1,2 ml/h). Der arterielle Katheter wurde mit 0,2 ml (5 I.E.) Heparin gespült. Bei dieser geringen Menge war kein therapeutischer Wert zu erwarten. Zum Abschluss der Halspräparation wurde zur Unterstützung der Spontanatmung wurde die Ratte mit einem ca. 3,5 cm langen Schlauch tracheotomiert. Sowohl die Fixierung der Katheter als auch des Tracheostomas wurden mit Ligaturen durchgeführt. Die Wunde wurde mit in kochsalzgetränkten Zellen abgedeckt. Der ca. 1 cm lange Bauchschnitt erfolgte linkslateral der Linea alba und verlief zwischen der Regio inguinalis und dem linken Rippenbogen. Hierfür wurde ein Elektrokauter zur direkten Blutstillung benutzt. Das Tier wurde nun in Linksseitenlage gebracht. Mit Pinzetten wurde nun sehr vorsichtig das Caecum und ein Stück terminales Ileum aus dem Abdomen geholt und ein gut vaskularisierter mesenterialer Abschnitt auf die Objektträgerplatte abgelegt. Der ausgelagerte Darmabschnitt wurde mit 37°C warmen Paraffinöl benetzt. Die präparierte Ratte wurde mitsamt des Objektträgers auf den beheizten Mikroskopiertisch (37°C) eingespannt. Der arterielle Katheter wurde für die Blutdruckmessung mit dem Drucktransducer, der venöse Katheter erneut mit einem Kochsalzperfusor (2,5 ml/h) verbunden. Eine Temperatursonde wurde rektal eingeführt.

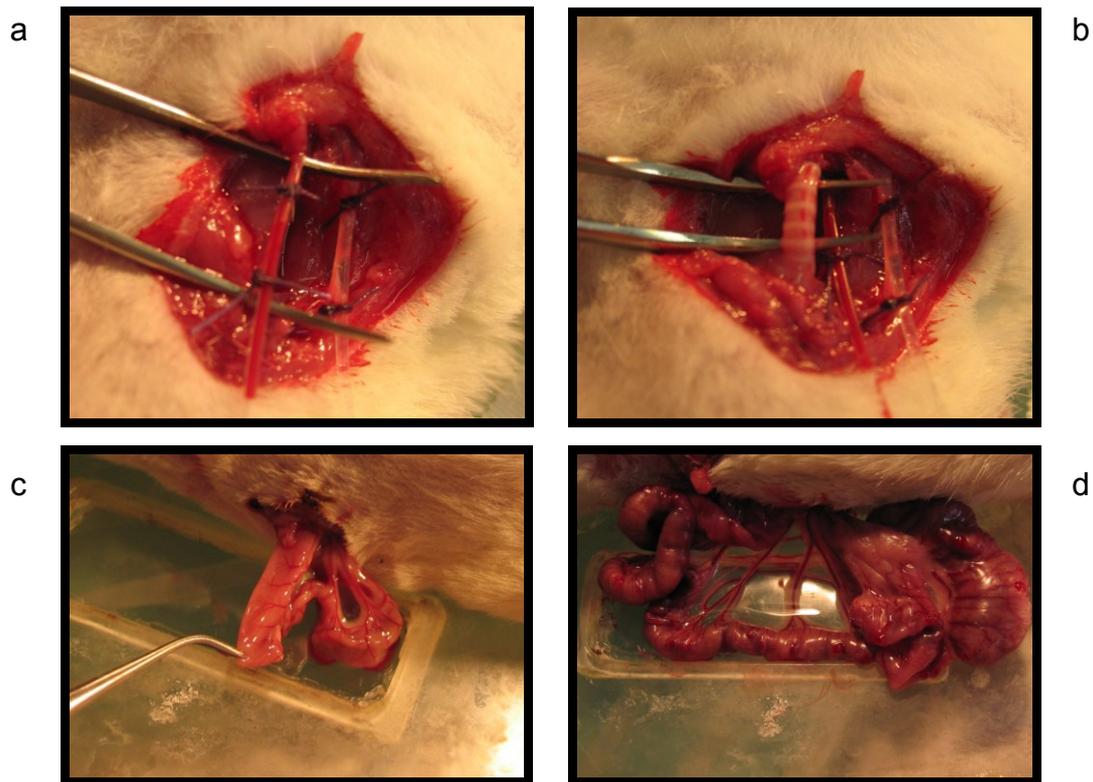


Abbildung 3 a: Präparation der rechten Arteria carotis. Die rechte Vena jugularis externa ist bereits kanüliert.

Abbildung 3 b: Präparation der Trachea.

Abbildung 3 c: Auslagerung von Anteilen des terminalen Ileums.

Abbildung 3 d: Ausgelagertes Caecum und Anteile des Ileums.

Nachdem die Präparationsphase beendet war, erfolgte in der Übersichtsvergrößerung (25-fach) eine Orientierung über das ausgelagerte Mesenterium und zugleich eine Kontrolle auf präparationsbedingte Artefakte (z.B. Paraffinluftblasen) oder Gefäßschäden (z.B. Blutungen, Einrisse, Überlagerungen). Es wurde unverzüglich mit der Aufnahme und der Versuchsdurchführung begonnen. Bei allen Tieren wurde stets dieselbe Reihenfolge eingehalten. Zur Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie wurde FITC-RSA (1,5 ml/kg KG) i.v. injiziert. Zunächst wurde eine Äquilibrationsphase von 20 min eingehalten, um eine komplette und gleichmäßige Verteilung des fluoreszenzmarkierten Albumins im Körperkreislauf zu gewährleisten. Von Beginn an wurden alle 10 Minuten drei bis acht Gefäßabschnitte der mikrovaskulären Endstrombahn jeweils 15 Sekunden lang auf Video dokumentiert. Die Epiillumination (Fluoreszenzmikroskopie) wurde in 50-facher Vergrößerung mit einem 5 x Objektiv durchgeführt. Die Felder wurden bei jeder Aufzeichnung exakt wieder eingestellt und so kurz wie möglich mit UV-Licht

beleuchtet, um Temperatur-Erhöhen und somit externe Schäden am Mesenterium zu verhindern. Der Blutdruck wurde kontinuierlich invasiv über den arteriellen Katheter und die Körpertemperatur rektal gemessen. Die Raumtemperatur wurde während des ganzen Versuches auf über 24°C gehalten.

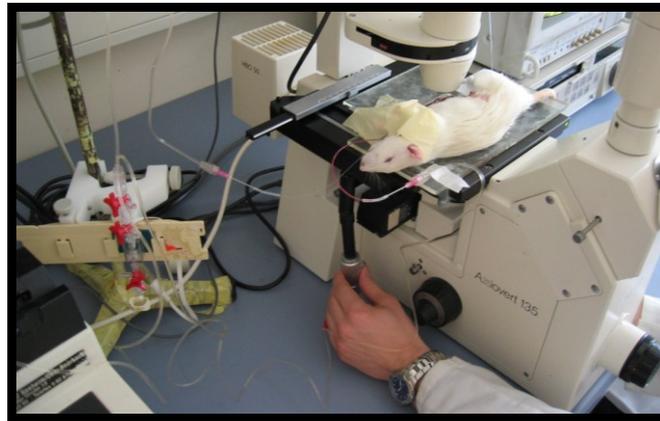


Abbildung 4: Versuchsaufbau zur Zeit der Aufnahme phase.

Die Intravitalmikroskopie wurde mit Hilfe des Mikroskops Axiovert 135 durchgeführt. Übersichtsaufnahmen erfolgten in einer 25-fachen Vergrößerung mit einem 2,5 x Objektiv. Zur Fluoreszenzmikroskopie wurde eine Quecksilberlampe verwendet, um das intravasale FITC-RSA zur Lumination anzuregen. Diese wurde alle 100 Betriebsstunden ausgewechselt, um die Leuchtintensität möglichst konstant zu halten. Zur Filterung für das FITC-spezifische Strahlenmuster wurde die spezielle Filterkombination FITC/TEXAS red 485/578 benutzt. Das im Strahlengang vorhandene Bild wurde zusätzlich mit der Videokamera 3CCD erfasst und an einen Videorekorder gesendet, wo die eingestellten Gefäßareale in Echtzeit aufgezeichnet wurden. Das jeweilig vorhandene Bild der Mikrozirkulation wurde zusätzlich auf einem zwischengeschalteten Monitor betrachtet, der später auch zur Auswertung der computerunterstützten Auswertung diente. Der Videorekorder war mit einem PC verbunden. Der PC ermöglichte die für die Auswertung notwendige Digitalisierung der Videobilder in Echtzeit.

Die Fluoreszenzmikroskopie diente zur Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilitätsveränderungen. Gemessen wurde eine Veränderung der Leuchtkraft des jeweils eingestellten Gefäßareals. Permeabilitätssteigernde Substanzen führten zu einer Zunahme der Leuchtkraft und somit zu einer definierten Zunahme der gemessenen Grauwerte im Videoausgangssignal. Die digitale Bildauswertung

erfolgte mit der PC-Software „Cap-Image“ von Dr. Dipl. Ing. Zeintl. Diese berechnete die Veränderung der Grauwerte durch eine Veränderung der Pixelzahl. Da sich die einzelnen Videobänder hinsichtlich der Leuchtintensität unterschieden, wurde zu Beginn jeder einzelnen Messung eines Videobandes ein Grauwertstandard kalibriert. Die Unterschiede der Leuchtkraft lagen zum einen an der unterschiedlichen Dichte der mit FITC markierten Gefäße, zum anderen an der gering abnehmenden Leuchtintensität der Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe. Die Konzentration des FITC-RSA in den Gefäßen blieb den ganzen Versuch über nahezu konstant und konnte somit keinen Einfluss auf eine Veränderung der Leuchtintensität haben. Die Extravasation der Makromoleküle wurde als eine Zunahme der Grauwerte über die Versuchsdauer gemessen und in einer integrierten optischen Dichte dargestellt.

Damit alle Videoaufnahmen das gleiche Ausgangsniveau der Helligkeit besaßen, wurde jeweils zu Beginn des Versuchs ein kleines repräsentatives Bildareal ausgewählt und markiert. Das Helligkeitsniveau wurde nun auf einen definierten Wert gesetzt und der dort gemessene Grauwert als Null-Wert definiert. Vor jeder einzelnen Messreihe wurden die später zu untersuchenden Gebiete markiert und die jeweiligen Grauwerte in absoluten Zahlen gemessen. Die Veränderung der Grauwerte wurde in einem Abstand von 10 min über insgesamt 110 min in den jeweils vorher definierten Fenstern gemessen. Diese lagen möglichst dicht den Gefäßabschnitten an und enthielten nur extravasales mesenteriales Gewebe. Die Zunahme der Leuchtintensität wurde ebenfalls in absoluten Zahlen angegeben und jeweils in Bezug zu dem am Anfang definierten Null-Wert gesetzt.

3.5 Bestimmung des myokardialen Wassergehaltes

Mit Hilfe einer Präparierschere wurde die Ratte linkslateral entlang des Sternums thorakotomiert. Das Perikard wurde sorgfältig eröffnet und anschließend alle dem Herzen zu- und abfließenden Gefäße herznah durchtrennt. Das Herz wurde entnommen, von allen Bindegewebsstrukturen befreit und vorsichtig trocken getupft, so dass sich kein weiteres Blut in den Herzkammern oder den Vorhöfen befand. Nach Herzentnahme wurde zunächst das Feuchtgewicht des Herzens bestimmt. Anschließend wurde es bei einer Temperatur von 70°C für 48 Stunden getrocknet. Mit der Berechnung des Verhältnisses von Feucht- und Trockengewicht konnte der myokardiale Wassergehalt als Maß für Ödementwicklung bestimmt werden.

3.6 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).

3.7 Statistische Analyse

In vitro ist der Mittelwert + S.D. von bis zu $n = 6$ 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.

4. ERGEBNISSE

4.1 Der Einfluss von ATP und seinen Abbauprodukten auf die endotheliale Schrankenfunktion

Die folgenden Untersuchungen wurden an kultivierten Endothelzellmonolayern durchgeführt. Hierzu wurden Endothelzellen aus der Mikrostrombahn des Rattenherzens eingesetzt. Als Modell wurde ein Zwei-Kompartimenten-System verwendet, welches den Durchfluss von farbstoffmarkierten Albumin (Makromolekülpermeabilität) misst.

4.1.1 Der Effekt von ATP mit und ohne Hemmung der Adenosin-Rezeptoren

Die Zugabe von extrazellulärem ATP löste konzentrations- und zeitabhängig sowohl eine Senkung als auch eine Steigerung der Permeabilität in diesem Modell aus. Während hingegen die Makromolekülpermeabilität der Kontrolle über den gesamten Zeitraum konstant blieb.

Um die Frage zu klären, ob ein Teil der Permeabilitätsveränderungen durch ATP über Adenosin-Rezeptoren vermittelt wird, wurden die Zellen für 10 min mit 10 μM 8-Phenyl-Theophyllin [= 1,3-Dimethyl-8-phenylxanthine, 8-PT], einem nicht selektiven Adenosinrezeptor-Antagonisten, vorbehandelt. Anschließend wurde ATP hinzugefügt. Die Permeabilität der endothelialen Monolayer blieb bei einer Konzentration von 0,1 μM ebenfalls knapp über der Kontrolle, aber die deutliche Permeabilitätserhöhung unter 1 μM (siehe Abb. 5) konnte gehemmt werden. Die Permeabilität sank im Vergleich zum Versuch ohne 8-PT (siehe Abb. 5) um über die Hälfte und näherte sich im Verlauf der Kontrolle an. Die Vorbehandlung mit 8-PT hatte keinen Einfluss auf ATP-induzierte Abnahme der Permeabilität.

Diese Daten zeigen, dass der Permeabilitätsanstieg über Adenosin-Rezeptoren vermittelt wird und nach Hemmung dieser, die protektive Wirkung von ATP verlängert wird.

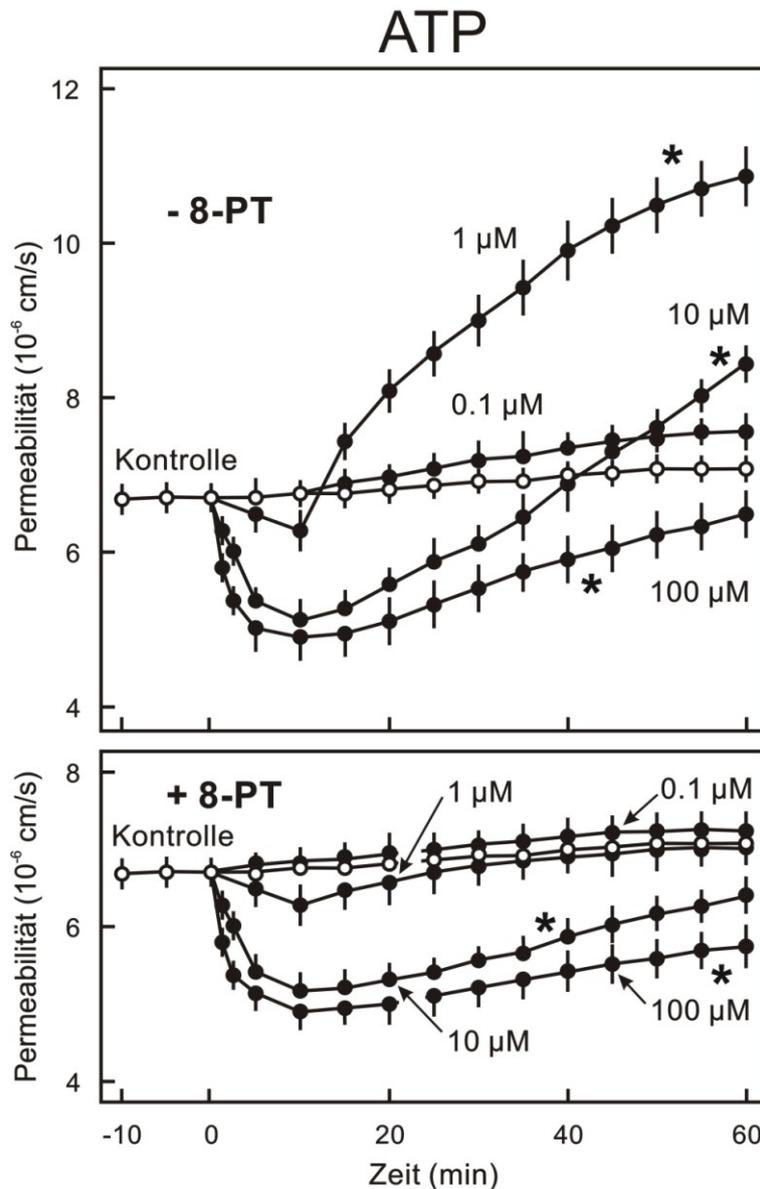


Abbildung 5: Obere Abbildung: Die Wirkung von ATP ohne 8-PT in den Konzentrationen 0,1 μM, 1 μM, 10 μM und 100 μM auf die Albumin-Permeabilität von koronaren, mikrovaskulären Endothelzellmonolayern. Mittelwerte ± SD, n = 6, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. Zu den Zeitpunkten zwischen 0 und 60 Minuten ist die Permeabilität in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration signifikant verschieden ($P < 0,05$), für * gilt = signifikant gegenüber der Kontrolle. Untere Abbildung: Die Wirkung von ATP unter Zugabe von 8-PT in den Konzentrationen 0,1 μM, 1 μM, 10 μM und 100 μM auf die Albumin-Permeabilität von koronaren, mikrovaskulären Endothelzellmonolayern. Mittelwerte ± SD, n = 6, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. Zu den Zeitpunkten zwischen 0 und 60 Minuten ist die Permeabilität in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration signifikant verschieden ($P < 0,05$), für * gilt = signifikant gegenüber der Kontrolle.

4.1.2 Die Wirkung von ADP und AMP auf die endotheliale Schrankenfunktion

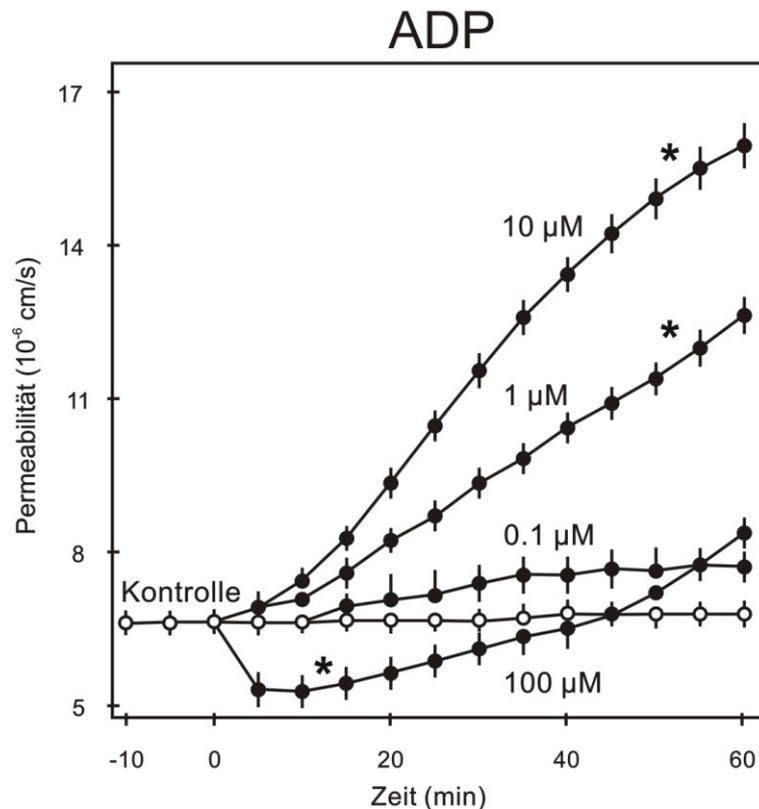


Abbildung 6: Die Wirkung von ADP in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM, 10 µM und 100 µM auf die Albumin-Permeabilität von koronaren, mikrovaskulären Endothelzellmonolayern. Mittelwerte ± SD, n = 6, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. Zu den Zeitpunkten zwischen 0 und 60 Minuten ist die Permeabilität in Abhängigkeit von der ADP-Konzentration signifikant verschieden ($P < 0,05$), für * gilt = signifikant gegenüber der Kontrolle.

Um den Effekt von ATP auf die endotheliale Schrankenfunktion zu beurteilen, untersuchten wir die Abbauprodukte von ATP. Hierzu wurde ADP und AMP in den Konzentrationen 0,1 µM bis 100 µM getestet (Abb. 6). Im Gegensatz zu ATP induzierte ADP bei Konzentrationen zwischen 0,1 µM und 10 µM eine konzentrationsabhängige Zunahme der Permeabilität, zum Teil bis über das Zweifache der Kontrolle (10 µM). Eine Verminderung der Permeabilität konnte nur bei 100 µM beobachtet werden. Diese betrug ca. 25% zwischen der 5. und 10. Minute gegenüber der Kontrolle, stieg anschließend ebenfalls konstant an und erreichte Werte oberhalb des basalen Niveaus. Somit kann ADP auch in hohen

Konzentrationen die Permeabilität der Endothelzellen nicht über einen längeren Zeitraum stabilisieren.

Abbildung 7 zeigt die Veränderungen der Permeabilität in Abhängigkeit von AMP, einem weiterem Abbauprodukt von ATP.

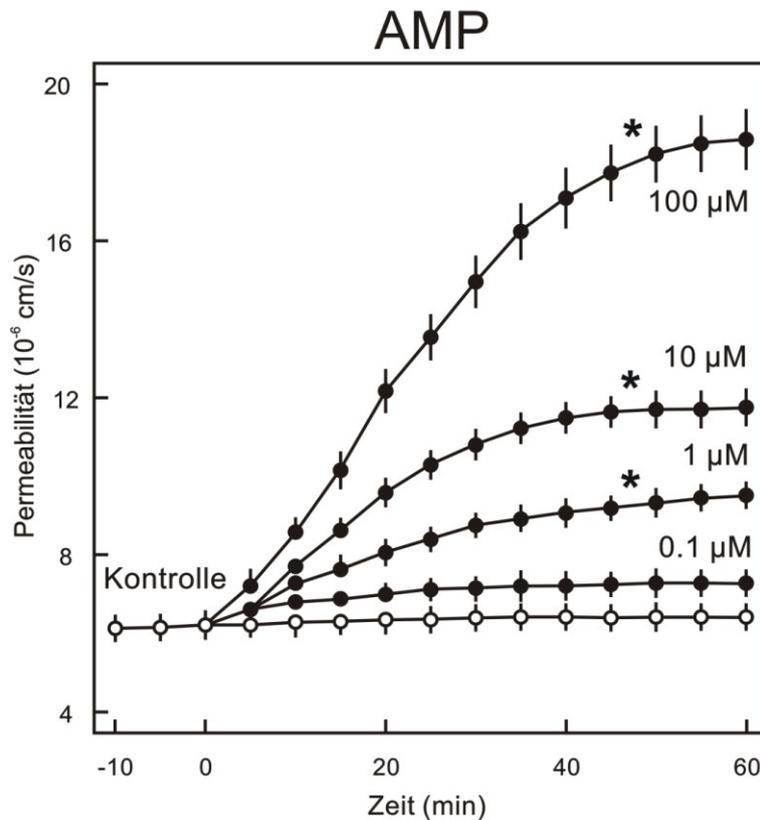


Abbildung 7: Die Wirkung von AMP in den Konzentrationen 0,1 μM, 1 μM, 10 μM und 100 μM auf die Albumin-Permeabilität von koronaren, mikrovaskulären Endothelzellmonolayern. Mittelwerte ± SD, n = 6, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. Zu den Zeitpunkten zwischen 0 und 60 Minuten ist die Permeabilität in Abhängigkeit von der AMP-Konzentration signifikant verschieden ($P < 0,05$), für * gilt = signifikant gegenüber der Kontrolle.

AMP zeigte im Gegensatz zu ATP und ADP eine konzentrationsabhängige Zunahme der Permeabilität. Diese stieg unter 10 μM bis auf das Zweifache und für 100 μM bis auf das Dreifache gegenüber der Kontrolle an.

4.1.3 Die Wirkung von Adenosin und NECA auf die endotheliale Schrankenfunktion

Im Nachfolgenden wurde die Wirkung von Adenosin selbst auf die Permeabilität endothelialer Zellschichten untersucht. Adenosin bewirkte ohne Zugabe von 8-PT eine konzentrationsabhängige Zunahme der Permeabilität. Bei der höchsten Dosis (100 μM) kam es zu einem Anstieg der Permeabilität bis auf über das Zweifache der Kontrolle. Ähnlich wie bei AMP (siehe Abb. 7) erreichten alle Kurven während der Versuchsdauer eine Sättigung.

Die Vorbehandlung der Zellen mit 8-PT supprimierte die Wirkung von Adenosin auf die endotheliale Permeabilität. Konzentrationen von 0,1 μM und 1 μM zeigten hier nur noch eine geringe Zunahme der Permeabilität für Albumin. Bei 10 μM konnte der Effekt von Adenosin um mehr als 80% reduziert werden, bei einer Adenosin-Konzentration von 100 μM immerhin noch um etwa 50%. Um zu überprüfen, ob eine Aktivierung der Adenosin-Rezeptoren zu einer Zunahme der Permeabilität führt, wurde NECA, ein unspezifischer Adenosin-Rezeptor-Agonist verwendet. Es zeigte sich, dass NECA zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Permeabilität führt. Auch hier lässt sich dieser permeabilitätssteigernde Effekt durch die Hemmung der Adenosin-Rezeptoren mittels 8-PT nahezu vollständig hemmen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Erhöhung der Permeabilität von koronaren, mikrovaskulären Endothelzellmonolayern der Ratte durch ADP, AMP und Adenosin über Adenosin-Rezeptoren vermittelt wird.

Adenosin

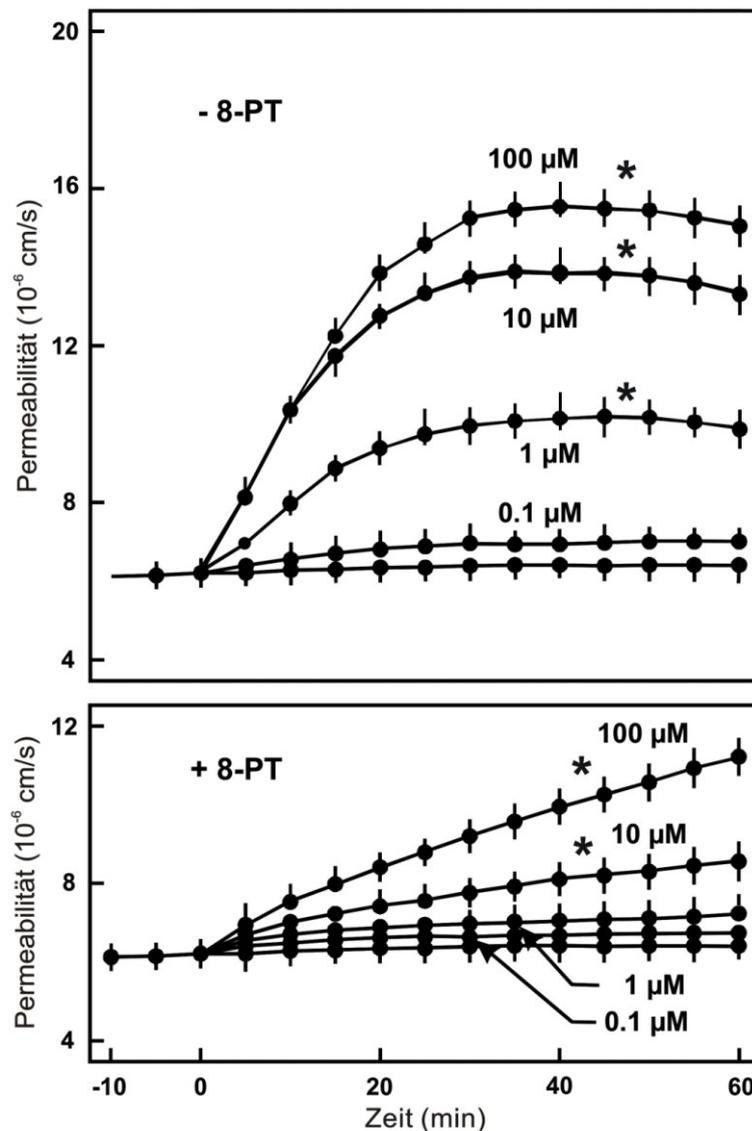


Abbildung 8: Obere Abbildung: Die Wirkung von Adenosin in den Konzentrationen 0,1 μM, 1 μM, 10 μM und 100 μM auf die Albumin-Permeabilität von koronaren, mikrovaskulären Endothelzellmonolayern. Mittelwerte ± SD, n = 6, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. Zu den Zeitpunkten zwischen 0 und 60 Minuten ist die Permeabilität in Abhängigkeit von der Adenosin-Konzentration signifikant verschieden (P < 0,05), für * gilt = signifikant gegenüber der Kontrolle. Untere Abbildung: Wirkung von Adenosin unter Zugabe von 8-PT in den Konzentrationen 0,1 μM, 1 μM, 10 μM und 100 μM auf die Albumin-Permeabilität von koronaren, mikrovaskulären Endothelzellmonolayern. Mittelwerte ± SD, n = 6, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. Zu den Zeitpunkten zwischen 0 und 60 Minuten ist die Permeabilität in Abhängigkeit von der Adenosin-Konzentration signifikant verschieden (P < 0,05), für * gilt = signifikant gegenüber der Kontrolle.

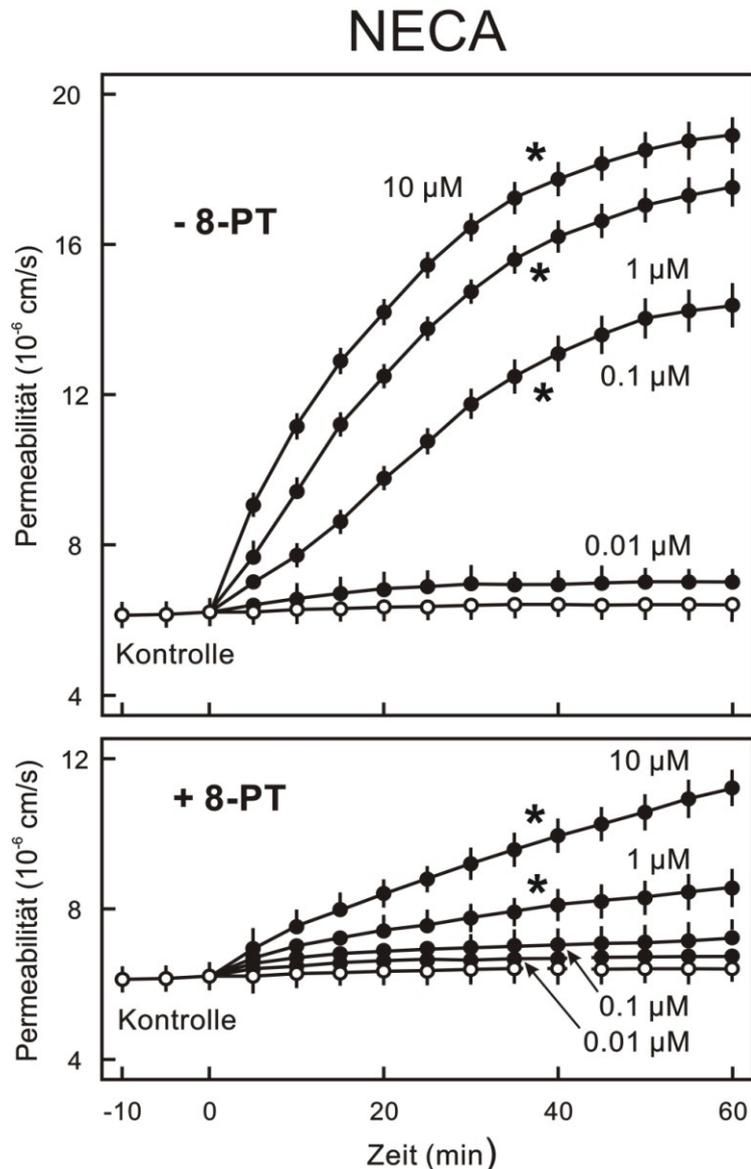


Abbildung 9: Obere Abbildung: Wirkung von NECA in den Konzentrationen 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M auf die Albumin-Permeabilität von koronaren, mikrovaskulären Endothelzellmonolayern. Mittelwerte \pm SD, $n = 6$, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. Zu den Zeitpunkten zwischen 0 und 60 Minuten ist die Permeabilität in Abhängigkeit von der NECA-Konzentration signifikant verschieden ($P < 0,05$), für * gilt = signifikant gegenüber der Kontrolle. Untere Abbildung: Wirkung von NECA unter Zugabe von 8-PT in den Konzentrationen 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M auf die Albumin-Permeabilität von koronaren, mikrovaskulären Endothelzellmonolayern. Mittelwerte \pm SD, $n = 6$, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. Zu den Zeitpunkten zwischen 0 und 60 Minuten ist die Permeabilität in Abhängigkeit von der NECA-Konzentration signifikant verschieden ($P < 0,05$), für * gilt = signifikant gegenüber der Kontrolle.

4.1.4 Der Einfluss von Apyrase auf die ATP induzierte Stabilisierung der Schrankenfunktion

Die Ektonukleotidase Apyrase beschleunigt den Metabolismus von ATP zu Adenosin. Apyrase mit einer Konzentration von 1 IE/ml zeigte allein keine signifikante Änderung der Permeabilität der endothelialen Monolayer gegenüber der Kontrolle. Der beschleunigte Abbau von ATP durch Zugabe von Apyrase führte im Gegensatz zur alleinigen ATP-Gabe zu einer sofortigen Zunahme der Permeabilität um über 50% gegenüber der Kontrolle.

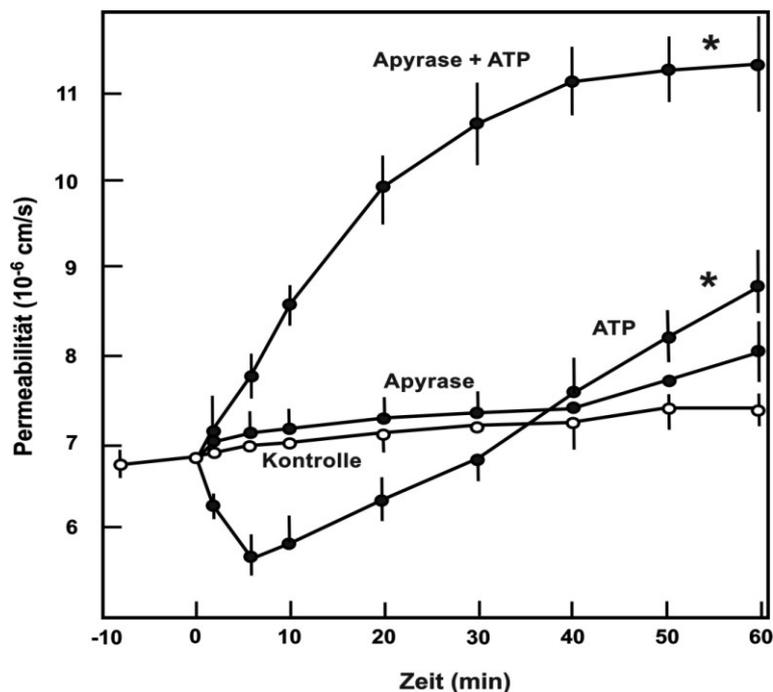


Abbildung 10: Wirkung von ATP, Apyrase und Apyrase + ATP auf die Albumin-Permeabilität von koronaren, mikrovaskulären Endothelzellmonolayern. Konzentrationen: 10 μ M ATP, 1 IE/ml Apyrase. Mittelwerte \pm SD, n = 6, Experimente unabhängiger Zellpräparationen. Zu den Zeitpunkten zwischen 0 und 60 Minuten ist die Permeabilität in Abhängigkeit von der Kontrolle signifikant verschieden ($P < 0,05$), für * gilt = signifikant gegenüber der Kontrolle.

Dieses Ergebnis verstärkt die Annahme, dass der Permeabilitätsanstieg nicht durch ATP, sondern durch dessen Abbauprodukte vermittelt wird.

4.1.5 Der Effekt von ATP und Adenosin auf die interendotheliale Adhäsionsstruktur

Bindewald et al. beschrieben 2004, dass ein Anstieg von intrazellulärem cAMP zu einer Destabilisierung der interendothelialen Adhäsionsstrukturen führt. Dieser cAMP Anstieg wurde durch Forskolin induziert (Bindewald et al., 2004). Es ist bekannt, dass eine Aktivierung von Adenosinrezeptoren ebenfalls zu einem Anstieg von intrazellulärem cAMP führt. Um zu untersuchen, ob die interzellulären Adhäsionsstrukturen für den protektiven Prozess von ATP eine Rolle spielen, wurde mittels immunhistochemischer Methoden VE-Cadherin bestimmt.

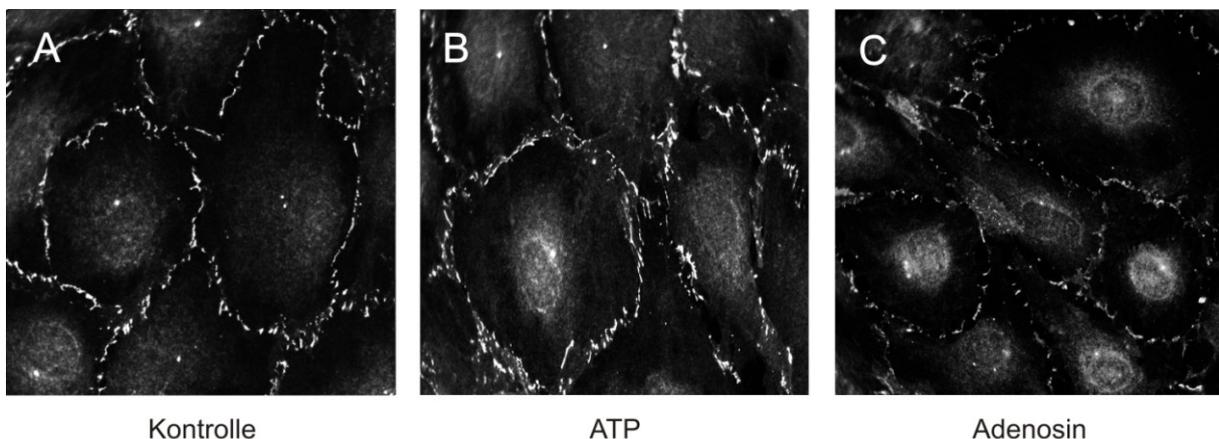


Abbildung 11: Der Effekt von ATP und Adenosin in einer Konzentration von jeweils $10 \mu\text{M}$ auf die zelluläre Lokalisation von VE-Cadherin auf koronaren, mikrovaskulären Endothelzellmonolayern nach 10 min.

Es zeigte sich, dass ATP eine Translokation von VE-Cadherin an die Zellgrenzen bewirkte, ATPs Abbauprodukte hingegen zu dessen Abnahme führte. Diese Daten zeigen, dass ATP initial die interendotheliale Adhäsionsstruktur stabilisiert, seine Abbauprodukte allerdings zu einer Störung führen.

4.2 Der Einfluss von ATP und seinen Abbauprodukten auf die Permeabilität von Rattenmesenterialgefäßen *in vivo*

Um eine Relevanz der *in vitro* erhobenen Daten beurteilen zu können, wurden weitergehende Untersuchungen in einem *in vivo* Modell durchgeführt. Hierfür wurde ein intravitalmikroskopisches Verfahren eingesetzt, welches mit FITC markiertem Albumin die Makromolekülpermeabilität an mesenterialen Ratten-Mikrogefäßen bestimmt.

4.2.1 Die Wirkung von ATP auf die Permeabilität unter Hemmung der Adenosin-Rezeptoren *in vivo*

Zunächst wurde der *in vivo* Effekt von ATP auf die Makromolekül-Permeabilität untersucht. 50 μM ATP zeigte gegenüber der Kontrollgruppe einen biphasischen Verlauf. Zu Beginn zeichnete sich eine signifikante Verringerung der Permeabilität für FITC markiertes Albumin ab. Ähnlich wie in den *in vitro*-Versuchen kam es im Verlauf der Versuchsreihe zu einem Anstieg der Permeabilität auf über das Doppelte gegenüber der Kontrolle. Um den Einfluss der Adenosin-Rezeptoren auf die Wirkung von ATP zu untersuchen, wurde 8-PT verwendet. 10 μM 8-PT alleine führte zu keiner signifikanten Veränderung der Permeabilität über die gesamte Versuchsdauer, verhinderte allerdings in Kombination mit ATP den sekundären Anstieg.

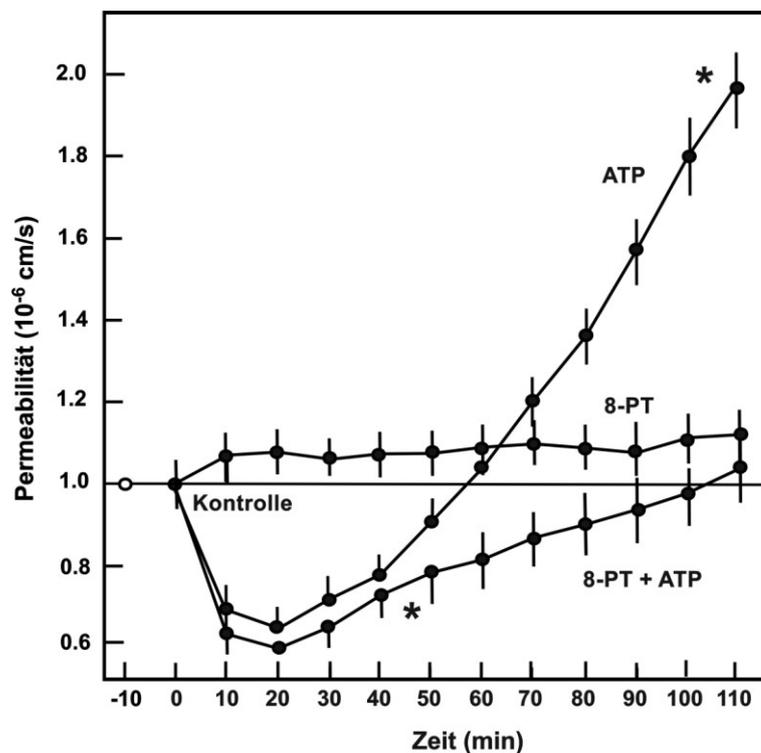


Abbildung 11: Wirkung von ATP, 8-PT und 8-PT + ATP auf die Permeabilität von FITC markiertem Albumin in Rattenmesenterialgefäßen. Konzentrationen: 50 μM ATP, 10 μM 8-PT. Mittelwerte \pm SEM, $n = 4$, Experimente unabhängiger Tierpräparationen. Werte mit $P < 0,05$ wurden als signifikant gewertet, für * gilt = signifikant gegenüber der Kontrolle.

4.2.2 Die Wirkung von Adenosin auf die Permeabilität unter Hemmung der Adenosin-Rezeptoren *in vivo*

Adenosin mit einer Konzentration von 10 μM allein bewirkte *in vivo* einen Permeabilitätsanstieg um über 100% im Vergleich zur Kontrolle. Die Zugabe von 8-PT supprimierte die Wirkung von Adenosin auf die Permeabilität in Rattenmesenterialgefäßen (siehe Abb. 12).

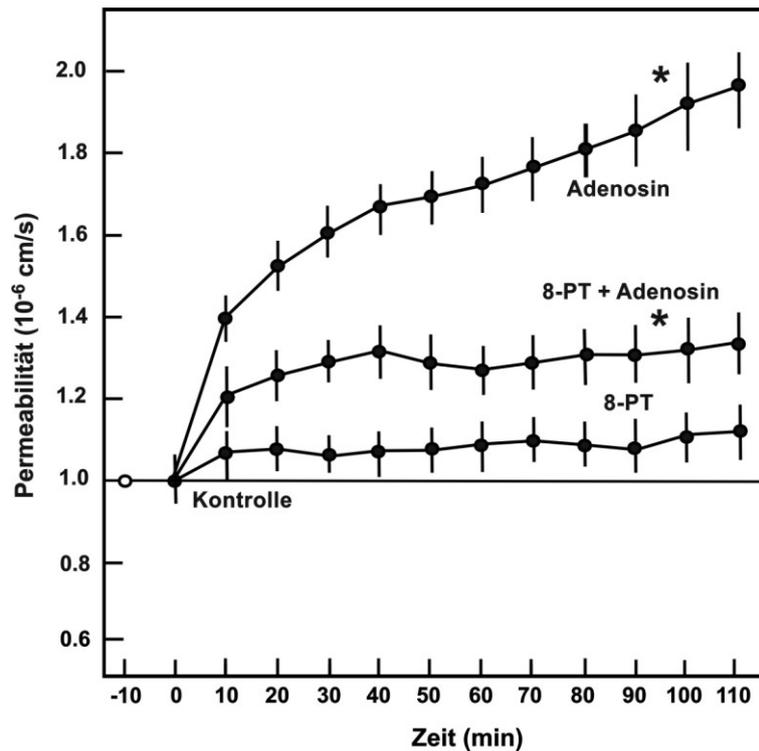


Abbildung 12: Wirkung von Adenosin, 8-PT und 8-PT + Adenosin auf die Permeabilität von FITC markiertem Albumin in Rattenmesenterialgefäßen. Konzentrationen: 10 μM Adenosin, 10 μM 8-PT. Mittelwerte \pm SEM, $n = 4$, Experimente unabhängiger Tierpräparationen. Werte mit $P < 0,05$ wurden als signifikant gewertet, für * gilt = signifikant gegenüber der Kontrolle.

Zur Bestätigung der Annahme, dass extrazelluläres ATP für die initial protektive Wirkung auf die endotheliale Schranke *in vivo* verantwortlich ist, wurde untersucht, ob der protektive Effekt reduziert wird, wenn der ATP-Abbau beschleunigt wird. Hierzu wurde Apyrase eingesetzt. Unter alleiniger Verwendung von 2 IE/ml Apyrase *in vivo* wurde die Permeabilität nicht signifikant gegenüber der Kontrolle verändert (siehe Abb. 13). Es zeigte sich aber, dass die kombinierte Gabe von Apyrase mit ATP zu einer sofortigen Zunahme der Permeabilität führt.

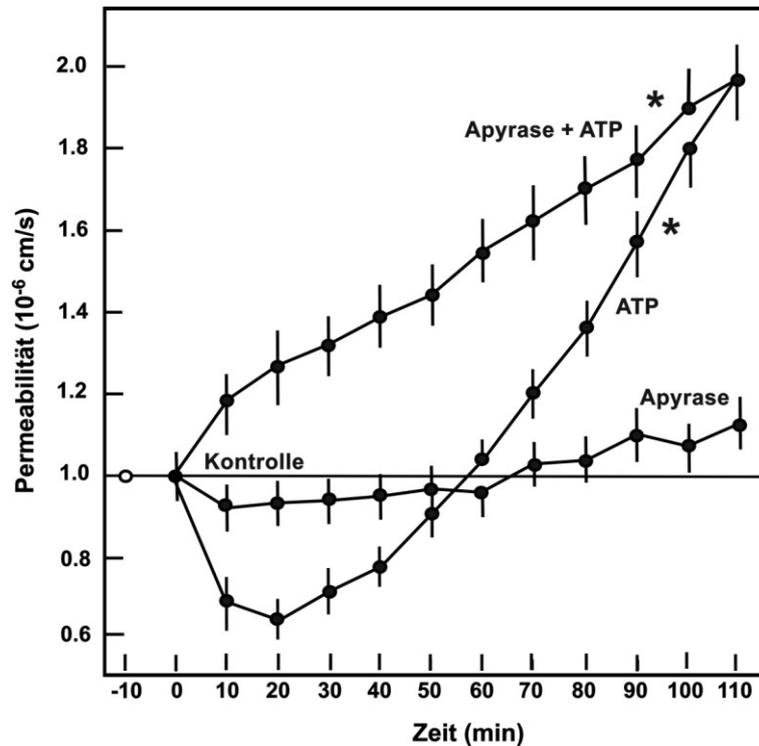


Abbildung 13: Wirkung von ATP, Apyrase und Apyrase + ATP auf die Permeabilität von FITC markiertem Albumin in Rattenmesenterialgefäßen. Konzentrationen: 50 μ M ATP, 2 IE/ml Apyrase. Mittelwerte \pm SEM, n = 4, Experimente unabhängiger Tierpräparationen. Werte mit $P < 0,05$ wurden als signifikant gewertet, für * gilt = signifikant gegenüber der Kontrolle.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Permeabilitätsanstieg in Mesenterialgefäßen von Ratten *in vivo* nicht durch ATP, sondern durch seine Metabolite über Aktivierung der Adenosin-Rezeptoren verursacht wird. Die Permeabilität verläuft sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in ähnlicher Weise.

4.2.3 Veränderung des myokardialen Wassergehaltes *in vivo*

Im Anschluss an die Intravitalmikroskopie wurde bestimmt, ob Adenosin die Permeabilität am intakten Stromgebiet des Koronarsystems beeinflusst. Hierfür wurde der myokardiale Wassergehalt der Rattenherzen am Ende eines jeden Experiments bestimmt.

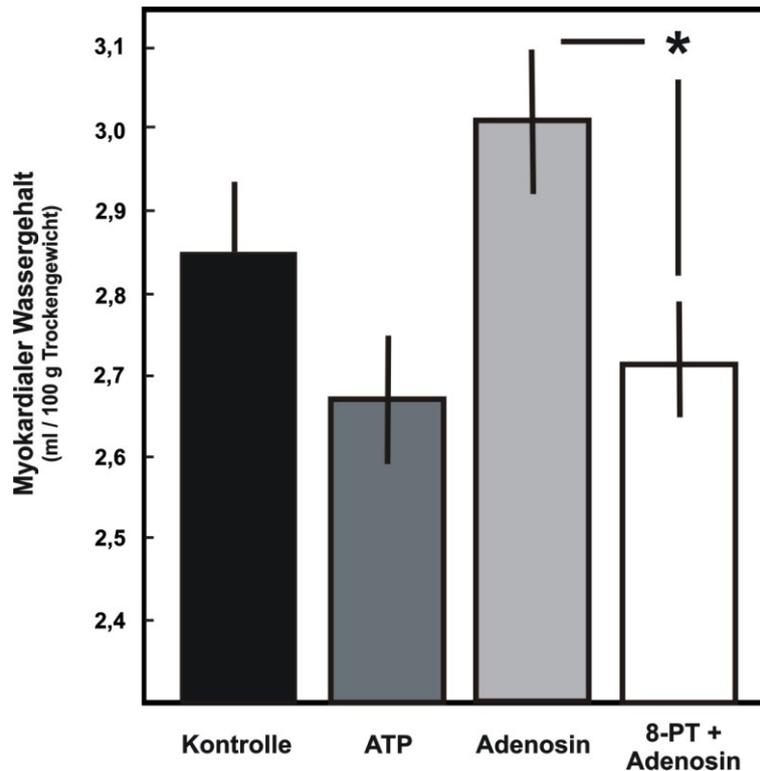


Abbildung 14: Die Wirkung von ATP, Adenosin- und Adenosin + 8-PT auf den Wassergehalt von Rattenherzen, gemessen in ml/100 g Trockengewicht 48 h nach Entnahme des Rattenherzens. Konzentrationen: 50 μ M ATP, 10 μ M Adenosin und 10 μ M 8-PT. Mittelwerte \pm SEM, n = 4, Experimente unabhängiger Tierpräparationen. Werte mit P < 0,05 wurden als signifikant gewertet. Für * gilt = signifikant zueinander.

Nach einer Vorbehandlung der Versuchstiere mit ATP zeigte sich eine tendenzielle Verringerung und mit Adenosin ein tendenzieller Anstieg des myokardialen Wassergehaltes gegenüber der Kontrolle. Durch Hemmung der Adenosin-Rezeptoren mit 8-PT konnte der Anstieg des Wassergehaltes im Vergleich zu Adenosin signifikant vermindert werden.

Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass Adenosin alleine zu einer Zunahme des myokardialen Wassergehaltes führt und zum anderen, dass eine Blockierung von Adenosin-Rezeptoren eine Abnahme des Wassergehaltes bewirkt.

5. DISKUSSION

Diese Arbeit thematisiert die Wechselwirkungen von ATP und seinen Metaboliten (ADP, AMP und Adenosin) auf die endotheliale Barrierenfunktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die Hauptbefunde der Untersuchungen sind: [1] ATP ist in der Lage, die endotheliale Permeabilität zu verringern und die Barrierenfunktion der Endothelzellen zu stabilisieren. [2] Die Metabolite ADP, AMP und Adenosin destabilisieren die Permeabilität. [3] Ein beschleunigter Abbau von ATP unter Zugabe von Apyrase stört ebenfalls die endotheliale Schranke. [4] Eine Blockierung von Adenosin-Rezeptoren durch 8-PT verhindert einen Permeabilitätsanstieg und [5] verringert den Wassergehalt in Rattenherzen.

In vitro wurde die endotheliale Permeabilität mit einer etablierten Methode in einem Zweikammersystem untersucht (Noll et al., 1995). Zur Erhebung der *in vivo* Daten wurde ein Permeabilitätsmodell an Mikrogefäßen des Rattenmesenteriums verwendet (Lendemanns et al., 2000). Die Intravitalmikroskopie ist dazu geeignet, *in vitro* Beobachtungen auf eine *in vivo* Relevanz zu übertragen (Menger et al., 1993). Die Ergebnisse waren für beide Methoden statistisch signifikant und reproduzierbar.

Bereits in früheren Studien konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der Purinrezeptor-Agonist ATP eine Verringerung der Permeabilität an Endothelzellschichten verschiedener Herkunft bewirkt (Noll et al., 1999). Dieser Effekt wird über eine Inaktivierung der endothelialen kontraktile Elemente durch Dephosphorylierung der Myosinleichtketten durch sowohl Ca^{2+} - als auch Rho-unabhängige Mechanismen vermittelt (Gündüz et al., 2003). Damals erschien ATP noch aufgrund des raschen Abbaus durch die ubiquitär vorhandenen Ektonukleotidasen ungeeignet, ein „capillary leakage syndrome“ länger andauernd zu verhindern. Erstmals konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ATP sowohl *in vitro* und als auch *in vivo* die Permeabilität verringert, wenn Adenosin-Rezeptoren blockiert werden.

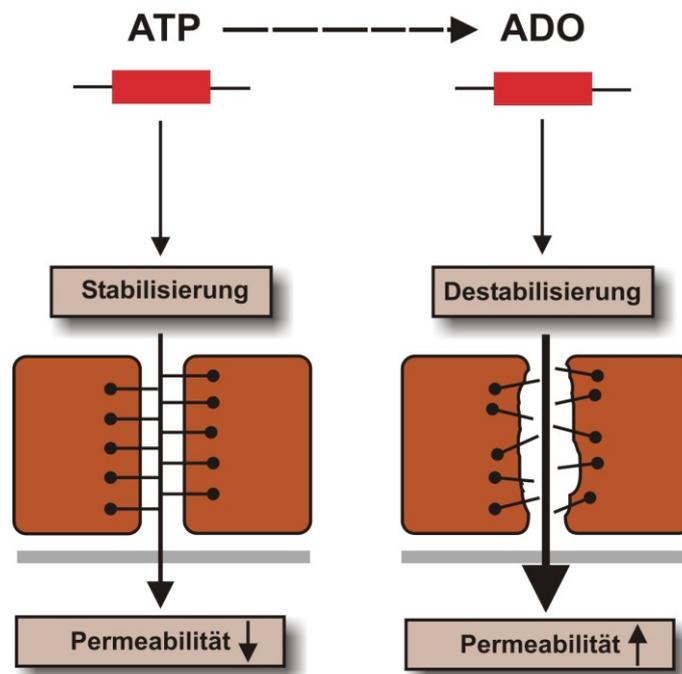


Abbildung 15: Schema der Wirkung von ATP und Adenosin auf die endotheliale Barrierefunktion. ATP induziert eine Stabilisierung der Permeabilität, während Adenosin (ADO) die endotheliale Schranke stört und die Permeabilität erhöht.

In vitro sowie *in vivo* konnte ein biphasischer Verlauf der Makromolekülpermeabilität nach Gabe von ATP beobachtet werden. Initial zeigte sich eine kurzfristige Stabilisierung der endothelialen Schranke, im weiteren Verlauf stieg die Permeabilität allerdings weiter an. In geringen Konzentrationen ($< 1\mu\text{M}$) erhöhte ATP *in vitro* die Permeabilität von koronaren Endothelzellen. Je höher die ATP Konzentrationen gewählt wurden, desto länger dauerte die protektive Wirkung auf die Schrankenfunktion an. Unter physiologischen Bedingungen zeigt sich eine extrazelluläre Nukleotidkonzentration von unter $0,1\mu\text{M}$ (Coade und Pearson, 1989; Zimmermann, 1992), kann aber unter verschiedenen (patho)physiologischen Bedingungen auf bis zu 20 mM ansteigen (Born et al., 1984). ATP wird extrazellulär rasch durch Ektonukleotidasen abgebaut (Zimmermann, 2000). Um die endotheliale Barriere zu stabilisieren, ist eine längerfristige Blockade der Adenosinrezeptoren oder des ATP-Metabolismus notwendig. Eine Studie mit kulturierten humanen Nabelschnurvenenendothelzellen und an isoliert perfundierten Rattenherzen zeigte, dass eine Blockierung des ATP Abbaus die Schrankenfunktion dieser Endothelzellen stabilisiert (Gündüz et al., 2006). Hierbei wurde ATP sowohl aus Zellen freigesetzt, als auch exogen appliziert. ATP schützte in dieser Studie auch gegen den Reperfusionsschaden (Gündüz et al., 2006). Extrazelluläres ATP und seine

Metabolite entfalten ihre vielfältigen Wirkungen über Adenosin- und Purin-Rezeptoren (Abbraccio und Burnstock, 1998). Zur Inhibierung des Rezeptorsystems wurde in der vorliegenden Arbeit der nichtselektive Adenosin-Rezeptor-Antagonist 8-PT gewählt. Der Antagonist 8-PT wurde bereits in früheren Studien verwendet (Watanabe et al., 1992; Noll et al., 1999). Ein ähnlicher Effekt kann durch andere chemisch unterschiedliche Adenosin-Rezeptor-Hemmstoffe erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe von 8-PT konnte gezeigt werden, dass ATP mit einer Konzentration ab 1 μM sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die endotheliale Schranke stabilisieren kann. Der konzentrationsabhängige Effekt konnte *in vitro* über eine Stunde konstant aufrechterhalten werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ATP in niedrigen Konzentrationen rasch abgebaut wird und über seine Metabolite die Adenosinrezeptoren aktiviert.

Andere Studien der letzten Jahrzehnte konnten zeigen, dass Adenin-Nukleotide und Adenosin Einfluss auf die endotheliale Schrankenfunktion haben (Sovelli und Fredholm, 1981; Watanabe et al., 1992; Hempel et al., 1996). Diese Befunde gaben Anlass für die Untersuchung der Wirkung der ATP-Abbauprodukte. Befunde der vorliegenden Arbeit sind, dass eine Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren und ein beschleunigter ATP-Metabolismus *in vitro* und *in vivo* einen Permeabilitätsanstieg bewirken. Auf zellulärer Ebene erhöhten die ATP-Abbauprodukte ADP, AMP und Adenosin konzentrationsabhängig die Permeabilität für Albumin. Um zu zeigen, dass die Adenosin-Rezeptoren für den permeabilitätssteigernden Effekt verantwortlich sind, wurde das Adenosinanalagon NECA zur Aktivierung der Adenosin-Rezeptoren eingesetzt. Auch NECA führte zu einer Permeabilitätssteigerung bei mikrovaskulären Endothelzellmonolayern des Rattenmyokards. Nur ADP in einer Dosis von 100 μM zeigte einen biphasischen Permeabilitätsverlauf, wobei der initiale permeabilitätssenkende Effekt im Vergleich zu ATP geringer ausfiel. Als Grund hierfür könnte eine geringe Aktivierung der Purin-Rezeptoren verantwortlich sein. Betrachtet man den Effekt von ATP Abbauprodukt Adenosin, zeigte sich, dass die Permeabilität von Rattenmesenterialgefäßen *in vivo* ebenfalls deutlich anstieg. Somit konnten die *in vitro* Daten auf eine *in vivo* Situation übertragen werden. Um heraus zu finden, ob Adenosin als natürliches Substrat für Adenosin-Rezeptoren über eine Aktivierung der Adenosin-Rezeptoren eine Permeabilitätssteigerung bewirkt, wurden diese mit 8-PT, einem panspezifischen Adenosin-Rezeptor-Blocker, gehemmt. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte die

Permeabilität durch eine Vorinkubation mit 8-PT signifikant verringert werden. Durch Beschleunigung des ATP-Abbaus konnte hingegen ein permeabilitätssteigernder Effekt beobachtet werden. Hierfür wurde Apyrase verwendet. Dieser Effekte zeigte sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* und ist ein weiterer Hinweis dafür, dass nicht ATP selbst, sondern dessen Abbauprodukte für die Permeabilitätssteigerung verantwortlich sind.

Die endotheliale Permeabilität wird durch zwei Mechanismen gesteuert, einerseits über eine Aktivierung des kontraktiven Apparates, andererseits über eine Desintegration der interzellulären Adhäsionsstrukturen. Bindewald et al. konnten 2004 bereits zeigen, dass der kontraktile Apparat hierfür nicht verantwortlich gemacht werden kann. Hierbei wurde mit gelelektrophoretischen Methoden der Phosphorylierungszustand der Myosinleichtketten als Aktivierungszustand für den kontraktiven Apparat untersucht. Sowohl ATP als auch dessen Abbauprodukte führten gleichermaßen zu einer Inaktivierung des kontraktiven Apparates (Bindewald et al., 2004). Um zu untersuchen, ob die interzellulären Adhäsionsstrukturen für den protektiven Prozess von ATP eine Rolle spielen, wurde mittels immun-histochemischer Methoden VE-Cadherin als wichtiger Bestandteil der interzellulären Adhäsionsstrukturen bestimmt. Es zeigte sich, dass ATP die Translokation an die Zellgrenzen steigerte, dessen Abbauprodukte allerdings zu einer Abnahme von VE-Cadherin an den Zellgrenzen führten. Dies weist darauf hin, dass ATP initial die interendotheliale Adhäsionsstruktur stabilisiert. Wird es abgebaut, führen seine Abbauprodukte zu einer Störung.

Die präsentierten Ergebnisse sind nicht nur wegen des oben erwähnten Antagonismus von ATP und Adenosin in mikrovaskulären Endothelzellen und Rattenmesenterialgefäßen von Interesse. Zum Beispiel besteht bei hohen Konzentrationen von ADP die Gefahr einer möglichen Thrombusbildung durch Thrombozytenaktivierung (Meyers et al., 1982). Es ist bekannt, dass Adenosin protektiv wirkt, indem es unter anderem vaskuläre Schäden durch die verminderte Freisetzung reaktiven Sauerstoffs und die Hemmung der Plättchenaggregation verringert (Ely und Berne, 1992; Obata, 2002). Zudem hat es über die vermehrte Freisetzung von NO Einfluss auf wichtige Bestandteile der endothelialen Schrankenfunktion, wie z.B. Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenadhäsion, –aggregation und Leukozytenadhäsion (Cronstein, 1994; Ohta et al., 2001). Die vorliegende Studie zeigt, dass eine Hemmung der Adenosin-Rezeptoren den

myokardialen Wassergehalt in Rattenherzen signifikant vermindert, was bei dem Entstehungsmechanismus von kardialen Ödemen eine bedeutende Rolle spielen könnte. Können die ATP-Metabolite ihre Wirkung nicht über Adenosin-Rezeptoren entfalten, so scheint es Wege zu geben, die Entstehung eines „capillary leakage syndrome“ effektiv zu verhindern oder zu vermindern. Ein näheres Verständnis kann zu einer Steigerung der protektiven Wirkung von ATP und Adenosin führen. Ziel ist es, Strategien zu entwickeln, die endotheliale Schranke zu stabilisieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

ATP ist nicht nur eine wichtige Energiequelle für Zellen, sondern extrazellulär auch ein wichtiger Mediator von unterschiedlichen Effekten. Es wird unter verschiedenen (patho)physiologischen Bedingungen freigesetzt und rasch durch Ektonukleotidasen in seine Metabolite abgebaut. Adeninnukleotide besitzen häufig antagonistische Wirkungsweisen, beispielsweise auf die Regulation des Gefäßtonus oder der Thrombozytenaggregation. Sie beeinflussen auch die endotheliale Schrankenfunktion und spielen somit bei der Entstehung von lokalen Ödemen oder einem systemischen „capillary leakage syndrome“ eine Rolle. Die Wirkung der extrazellulären Adeninnukleotide wird über Purin- und Adenosinrezeptoren vermittelt. ATP bewirkt eine Stabilisierung der endothelialen Barriere. Eine Dephosphorylierung von MLC konnte als Ursache identifiziert werden. Doch schien ATP noch nicht in der Lage zu sein, die endotheliale Schranke dauerhaft zu stabilisieren. In dieser Studie wurde *in vitro* und *in vivo* untersucht, ob ATP die Barrierefunktion von Endothelzellen langfristig stabilisieren kann und die Erhöhung der Permeabilität durch ATP-Metabolite hervorgerufen wird.

Die endotheliale Permeabilität wurde *in vitro* mit kultivierten koronaren mikrovaskulären Rattenendothelzellen in einem Zweikammersystem untersucht und mit immunhistochemischen Methoden VE-Cadherin bestimmt. *In vivo* wurden Permeabilitätsveränderungen für FITC-markiertes Albumin in Rattenmesenterialgefäßen bestimmt. Zudem wurde die Veränderung des Wassergehaltes von Rattenherzen gemessen. ATP führte alleine *in vitro* und *in vivo* zu einer biphasischen Veränderung mit einer Verringerung der Permeabilität zu Beginn und mit einer Erhöhung dieser am Ende der Versuchsdauer. Wurden die Adenosin-Rezeptoren mit dem nicht selektiven Adenosin-Rezeptor-Antagonisten 8-PT blockiert, konnte ATP die endotheliale Schranke längerfristig stabilisieren. Die ATP-Metabolite ADP, AMP und Adenosin sowie das Adenosin-Analogon NECA bewirkten in den Endothelzellmonolayern einen Permeabilitätsanstieg. Dieser wurde mit 8-PT signifikant in Versuchsreihen mit Adenosin und NECA supprimiert. Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass ATP initial die interendotheliale Adhäsionsstruktur stabilisiert und seine Abbauprodukte diese stören. *In vivo* kam es unter Adenosin ebenfalls zu einer Destabilisierung der endothelialen Schranke. 8-PT verringerte hier ebenfalls den Permeabilitätsanstieg. Ein beschleunigter Metabolismus von ATP *in vitro* und *in*

vivo durch die lösliche Ektonukleotidase Apyrase induzierte einen Anstieg der Permeabilität. ATP verringerte tendenziell den Wassergehalt in Rattenherzen. Eine Zunahme des Wassergehaltes durch Adenosin konnte mit 8-PT signifikant verhindert werden.

Eine Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren durch ATP-Metabolite destabilisiert die endotheliale Barriere. Werden diese erfolgreich blockiert, so kann ATP langfristig die Schrankenfunktion schützen. Das Verständnis dieser antagonistischen Wirkungsweise könnte in Zukunft dazu beitragen, vor einem „capillary leakage syndrome“ zu schützen.

7. SUMMARY

Beside as an important source for energy for cells, ATP is extracellularly also an important mediator for various effects. Under different (patho)physiological conditions, ATP is released and immediately metabolized by ecto-nucleotidases. Adenine-nucleotides often contain antagonistic effects, for example on the vascular tone or the aggregation of platelets. They also influence the endothelial barrier function and therefore, they contribute to the cause of local oedema or the capillary leakage syndrome. The effect of extracellular adenine-nucleotides is mediated by purine- and adenosine-receptors. ATP stabilizes the endothelial barrier. A dephosphorylation of MLC could be identified as the reason for its stabilisation. However, ATP seemed not to be able to permanently stabilize the endothelial barrier. This study reveals *in vitro* and *in vivo* if ATP can stabilize the endothelial barrier function of endothelial cells long-term and if the ATP-metabolites increase the permeability.

In vitro, the endothelial permeability was measured with cultured coronary microvascular endothelial cells of the rat in a two-compartment-system and VE-cadherin was analysed by immunohistochemical methods. *In vivo*, changes of permeability in rat mesenteric vascular tones were measured with FITC-marked albumin. Furthermore, differences in the myocardial water content of the rat heart were measured. *In vitro* and *in vivo*, ATP alone showed a biphasic change of the permeability with a decrease at the beginning and an increase at the end of the study. If the non-selective adenosine-receptors-antagonist 8-PT blocked the adenosine-receptors, ATP was able to stabilize the endothelial barrier function long-term. The ATP-metabolites ADP, AMP and adenosine as well as the adenosine-analagon NECA led to an increase of the permeability in endothelial cell monolayers. In studies with NECA and adenosine, this increase was suppressed significantly by 8-PT. Immunohistochemically, ATP stabilized the endothelial adhesion-structure in the beginning. The ATP-metabolites led to a dysfunction of the endothelial adhesion-structure. *In vivo*, adenosine destabilized the endothelial barrier function and 8-PT also reduced the increase of the permeability. *In vitro* and *in vivo*, a faster metabolism of ATP caused by the soluble ecto-nucleotidase Apyrase induced an increase of the permeability. By trend, ATP reduced the water content in rat hearts. 8-PT prevented significantly an increase of the water content in rat hearts caused by adenosine.

An activation of the adenosine-receptors by ATP-metabolites destabilized the endothelial barrier function. ATP is able to induce a long-term protection of the barrier function. In future, the understanding of this antagonistic effect may prevent against a capillary leakage syndrome.

8. LITERATUR

- [1] **Abbracchio MP and Burnstock G.** Purinergic signaling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 1998; 78: 113–145
- [2] **Abraham EH, Salikhova AY and Rapaport E.** ATP in the treatment of advanced cancer. *Curr. Top. Membr.* 2003; 54: 415–452
- [3] **Agteresch HJ, Dagnelie PC, van den Berg JW, Wilson JH.** Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs* 1999; 58(2): 211-32
- [4] **Airas L, Hellman J, Salmi M, Bono P, Puurunen T, Smith DJ, Jalkanen S.** CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein-2 identifies it as CD73. *J Exp Med.* 1995; 182: 1603-1608
- [5] **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
- [6] **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–C1255
- [7] **Bodin P, Burnstock G.** Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2001; 38: 900 – 908
- [8] **Bodin P, Burnstock G.** In Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation. *Inflamm. Res.* 1998; 47: 351–354
- [9] **Born GV and Kratzer MA.** Source and concentration of extracellular adenosine triphosphate during haemostasis in rats, rabbits and man. *J. Physiol.* 1984; 354: 419–429
- [10] **Bullough DA, Zhang C, Montag A, Mullane KM, Young MA.** Adenosine-mediated inhibition of platelet aggregation by adenosine: a novel antithrombotic mechanism in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1994; 94: 1524-1532
- [13] **Burnstock G.** Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 47–52

- [11] **Burnstock G.** P2X receptors in sensory neurons. *Br J Anaesth* 2000; 84: 476–488
- [14] **Burnstock G.** Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 1972; 24: 509–581
- [12] **Burnstock G.** Purinergic signalling. *British Journal of Pharmacology* 2006; 147: 172–181
- [15] **Burnstock G.** Sympathetic purinergic transmission in small blood vessels. *Trends Pharmacol. Sci.* 1988; 9: 116–117
- [16] **Busse R.** *Physiologie des Menschen.* Springer Verlag 1995; 26. Auflage: 518–520
- [17] **Chambers R, Zweifach BW.** Topography and function of the mesenteric capillary circulation. *Am J Anat* 1944; 75: 173-205
- [18] **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: 428–431
- [19] **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: 143-58
- [20] **Coade SB, Pearson JD.** Metabolism of adenine nucleotides in human blood. *Circ Res.* 1989; 65(3): 531-7
- [21] **Cronstein BN.** Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J. Appl. Physiol.* 1994; 76: 5-13
- [22] **Di Virgilio F, Baricordi OR, Romagnoli R, Baraldi PG.** Leukocyte P2 receptors: a novel target for anti-inflammatory and anti-tumor therapy. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005; 5: 85–99
- [23] **Drury AN and Szent-Györgyia A.** The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* 1929; 68: 213–237
- [24] **El-Moatassim C, Dornand J and Mani J.** Extracellular ATP and cell signalling. *Biochim. Biophys. Acta* 1993; 1134: 31–45
- [25] **Ely SW, Berne RM.** Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation* 1992; 85: 893–904
- [26] **Erlinge D.** *Vascular Effects of Extracellular Nucleotides,* *Kidney Blood Press Res* 2001; 24: 384

- [27] **Filippini A, Taffs RE and Sitkovsky MV.** Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990; 87: 8267–8271
- [28] **Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M.** Nomenclature and classification of purinoreceptors. *Pharmacol Rev* 1994; 46: 143–156
- [29] **Garcia JGN, Birnboim AS, Bizios R, Del Vecchio PJ, Fenton JW, and Malik AB.** Thrombin-induced increases in albumin clearance across cultured endothelial monolayers. *J Cell Physiol* 1986; 128: 96–104
- [30] **Ghildyal P and Manchanda R.** Neurotransmission by ATP: new insights, novel mechanisms. *Ind J Biochem Biophys* 2002; 39: 137–147
- [31] **Golenhofen K.** *Physiologie heute.* Urban & Fischer Verlag 2000; 2. Auflage: 293–242
- [32] **Gordon EL, Pearson PD and Slakey LL.** The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by arterial smooth muscle cells. Regulation of adenosine production at the cell surface. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 15496–15504
- [33] **Green HN, Stoner HB, Whiteley HJ and Eglin D.** A case of traumatic uraemia. *Clin. Sci.* 1949; 8: 65–68
- [34] **Greten H.** *Innere Medizin.* Georg Thieme Verlag 2002; 11. ergänzte Auflage: 260–270
- [35] **Gündüz D, Hirche F, Härtel FV, Rodewald CW, Pfitzer G, Schäfer M, Piper HM, Noll T.** ATP antagonism of thrombin-induced endothelial barrier permeability. *Cardiovasc Research* 2003; 1; 59(2): 470-8
- [36] **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; *Cardiovascular Research* 2006; 71: 764 – 773
- [37] **Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC and Kater SB.** ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves; *J. Neurosci.* 1999; 19: 520-528
- [38] **Haraldsson B, Zackrisson U, Rippe B.** Calcium dependence of histamine-induced increases in capillary permeability in isolated perfused rat hindquarters. *Acta Physiol Scand* 1986; 128: 247-258

- [39] **Harden, TK, Nicholas RA, Schlater JB, Lazarowski ER, Boyer JL.** Pharmacological selectivities of molecularly defined subtypes of P2Y receptors. In: Turner, J.T., Weisman, G.A., Fedan, J.S. Eds., *The P2 Nucleotide Receptors*. Human Press 1998; pp. 109–134
- [40] **Harrington LS, Mitchell JA.** Novel role for P2X receptor activation in endothelium-dependent vasodilation. *Br J Pharm* 2004; 143: 611-617
- [41] **Haskó G, Pacher P.** A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *J Leukoc Biol.* 2008; 83(3): 447-55
- [42] **Hempel A, Noll T, Muhs A, Piper HM.** Functional antagonism between cAMP and cGMP on permeability of coronary endothelial monolayers. *AM. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 1996; 270: H1264-H1271
- [43] **Iwamoto T, Umemura S, Toya Y, Uchibori T, Kogi K, Takagi N, Ishii M.** Identification of adenosine A2 receptor-cAMP system in human aortic endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 199(2): 905 – 910
- [44] **Kansas GS, Wood GS and Tedder TF.** Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J. Immunol.* 1991 146: 2235–2244
- [45] **Karnovsky MJ.** The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J Cell Biol* 1967; 35: 213-236
- [46] **Kuhnle, GEH, Leipfinger FH and Goetz AE.** Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy; *Appl. Physiol.* 1993; 74: 1462-1471
- [47] **Kumaria A, Tolia C, Burnstock G.** ATP signalling in epilepsy. *Purinergic Signal.* 2008; Jun: 18568425
- [48] **Laux V, Seiffge D.** Mediator-induced changes in macromolecular permeability in the rat mesenteric microcirculation; *Microvasc Res.* 1995; 49(1): 117-33
- [49] **Le Moine O, Stordeur P, Schandene L, Marchant A, de Groote D, Goldman M, Deviere J.** Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. *J Immunol* 1996; 156: 4408–4414
- [50] **Lendemans S, Leithäuser B, Schumacher J, Tillmanns H, Matthias FR.** C1 esterase inhibitor (C1-INH) improves impaired microcirculation of rat mesentery in response to Endotoxin (LPS)-challenge. *Annals of Hematology* 2000; 79: P121

- [51] **Li J-M, Fenton RA, Cutler BS, Dobson JG Jr.** Adenosine enhances nitric oxide production by vascular endothelial cells. *Am J Physiol.* 1995; 269: C519–523
- [52] **Lofton CE, Newman WH, Currie MG.** Atrial natriuretic peptide regulation of endothelial permeability is mediated by cGMP. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 793-799
- [53] **Macfarlane DE, Mills DC.** The effects of ATP on platelets: evidence against the central role of released ADP in primary aggregation. *Blood* 1975; 46: 309-320
- [54] **Majno G.** Ultrastructure of the vascular membrane. In: *Handbook of Physiology. Sect. 2 Vol. II* (W. F. Hamilton, P. Dow, Hrg.), American Physiological Society, Washington 1963: 1035-1073
- [55] **Marak Jr GE, de Kozak Y, Faure JP, Rao NA, Romero JL, Ward PA, Till GO.** Pharmacological modulation of acute ocular inflammation. I. Adenosine. *Ophthalmic Res* 1988; 20: 220 –226
- [56] **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: 1351–1360
- [57] **Menger MD, Laschke MW, Vollmar B.** Viewing the Microcirculation through the Window: Some Twenty Years Experience with the Hamster Dorsal Skinfold Chamber; *Eur Surg Res* 2002; 34: 83–91
- [58] **Menger MD, Lehr HA.** Scope and perspectives of intravital microscopy - bridge over from in vitro to in vivo. *Immunology Today* 1993; Vol. No 14: 519-522
- [59] **Meyers KM, Holmsen H, Seachord CL.** Comparative study of platelet dense granule constituents. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 1982; 243: R454-R461,
- [60] **Misumi Y, Ogata S, Ohkubo K, Hirose S, Ikehara Y.** Primary structure of human placental 59-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. *Eur J Biochem.* 1990; 191: 563-569
- [61] **Neely CF, Keith IM.** A1 adenosine receptor antagonists block ischemia–reperfusion injury of the lung. *Am J Physiol* 1995; 268: L1036–46

- [62] **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(6Pt2): H1892-901
- [63] **Noll T, Muhs A, Besselmann M, Watanabe H, and Piper HM.** Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers. *Am J Physiol* 268 (Heart Circ Physiol 37) 1995; H1462–H1470.
- [64] **Noll T, Schäfer M, Schavier-Schmitz U, and Piper HM.** ATP induces dephosphorylation of myosin light chain in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C717–C723.
- [65] **North RA and Barnard EA.** Nucleotide receptors. *Current Opinion in Neurobiology* 1997; 7: 346–357
- [66] **Obata T.** Adenosine production and its interaction with protection of ischemic and reperfusion injury of myocardium. *Life Sci* 2002; 71: 2083–2103
- [67] **Ohta A, Sitkovsky M.** Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; 414: 916-920
- [68] **Olah ME, Stiles G.** Adenosine receptor subtypes: Characterisation and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 582-583.
- [69] **Pearson JD, Carter TD.** Effects of extracellular ATP on the release of vasoactive mediators from endothelium. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990; 44: 578-581
- [70] **Pintor J, Peral A, Pelaez T, Carracedo G, Bautista A and Hoyle CH.** Nucleotides and dinucleotides in ocular physiology: new possibilities of nucleotides as therapeutic agents in the eye. *Drug Dev Res* 2003; 59: 136–145
- [71] **Piper HM, Spahr R, Mertens S, Krützenfeld A and Watanabe H.** Microvascular endothelial cells from heart. In: *Cell Culture Technique in Heart and Vessel Research*, edited by Piper HM. Heidelberg, Germany: Springer, 1990; p. 158–177
- [72] **Plesner L.** Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol.* 1995; 158: 141-214

- [73] **Poelstra K, Heynen ER, Baller JF, Hardonk MJ, Bakker WW.** Modulation of anti-Thy1 nephritis in the rat by adenine nucleotides: evidence for an anti-inflammatory role for nucleotidase. *Lab Invest* 1988; 66: 555–563
- [74] **Predescu D, Palade GE.** Plasmalemmal vesicles represent the large pore system of continuous microvascular endothelium; *Am. J. Physiol.* 1993; 265: H725–H733
- [75] **Prentice DJ, Hourani SMO.** Activation of multiple sites by adenosine analogues in the rat isolated aorta. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 118: 1509–1517
- [76] **Priebe T, Platsoucas CD, Nelson JA.** Adenosine receptors and modulation of natural killer cell activity by purine nucleosides. *Cancer Res* 1990; 51: 2775–2785
- [78] **Pulte ED, Broekman MJ, Olson KE, Drosopoulos JHF, Kizer JR, Islam N, Marcus AJ.** CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. *Thromb Res.* 2007; 5: 17555802
- [77] **Ralevic V, Burnstock G.** Actions mediated by P2- purinoceptor subtypes in the isolated perfused mesenteric bed of the rat. *Br J Pharmacol* 1998; 95: 637-645.
- [79] **Ralevic V, Burnstock G.** Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 413–492
- [80] **Rapaport E, Fontaine J.** Generation of extracellular ATP in blood and its mediated inhibition of host weight loss in tumor-bearing mice. *Biochem Pharmacol* 1989; 38(23): 4261-6
- [81] **Redegeld FA, Caldwell CC, Sitkovsky MV.** Ecto-protein kinases: ecto-domain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation? *Trends Pharmacol Sci.* 1999; 20(11): 453-9
- [82] **Reis MJ.** Über die Aktivität der 5-Nukleotidase in den Herz- und Muskelzellen; *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1934; 16: 385-399
- [83] **Resta R, Hooker SW, Hansen KR, Laurent AB, Park JL, Blackburn MR, Knudsen TB, Thompson LF.** Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73): cDNA cloning and tissue distribution. *Gene.* 1993; 133: 171-177
- [84] **Salmon JE, Brogle N, Brownlie C, Edberg JC, Kimberly RP, Chen BN, Erlanger BF.** Human mononuclear phagocytes express adenosine A1 receptors. *J Immunol* 1993; 151: 2775–2785

- [85] **Schlosser SF, Burgstahler AD and Nathanson MH.** Isolated rat hepatocytes can signal to other hepatocytes and bile duct cells by release of nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 9948-9953
- [86] **Simionescu M, Gafencu A, Antohe F.** Transcytosis of Plasma Macromolecules in Endothelial Cells: A Cell Biological Survey, *Microscopy research and technique* 2002; 57: 269–288
- [88] **Simionescu M, Simionescu N.** Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol Rev* 1991; 1-78
- [87] **Simionescu M, Simionescu N.** (Editors) *Endothelial cell biology*. New York: Plenum, 1988
- [89] **Simionescu M, Simionescu N.** Ultrastructure of the microvascular wall: functional correlations. *Handbook of Physiology, The Cardiovascular System, Microcirculation*. Am Physiol Soc Bethesda 1988; 41-101
- [90] **Sollevi A, Fredholm BB.** Role of adenosine in adipose tissue circulation. *Acta Physiol. Scand.* 1981; 112: 293-298
- [91] **Szabo C, Scott GS, Virag L, Egnaczyk G, Salzman AL, Shanley TP, Hasko G.** Suppression of inflammatory protein (MIP)-1 alpha production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 379–387
- [92] **Taylor AL, Kudlow BA, Marrs KL, Gruenert DC, Guggino WB and Schwiebert EM.** Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: C1391–1406
- [93] **Tillmanns H, Ikeda S, Hansen H et al.** Microcirculation in the hypertrophic and ischemic heart. *Circ. Res.* 1974; 34: 361-569
- [94] **van Hinsbergh VW, Scheffer MA and Langelier EG.** Macro- and microvascular endothelial cells from human tissue. In: *cell culture techniques in heart and vessel research*, edited by Piper HM. Heidelberg, Germany: Springer, 1997: 178–204
- [95] **van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP.** Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function, *J. Anat.* 2002; 200: 549–560
- [96] **Waller A.** *Philos. Mag. J. Sci.* 1846; 29: 397-405

- [97] **Watanabe H, Kuhne W, Schwartz P, Piper HM.** A₂-adenosine receptor stimulation increases macromolecule permeability of coronary endothelial cells. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 1992; 262: H1174-H1181,
- [98] **Weidinger F, Frick M.** Mechanismen und Bedeutung der Endothelfunktion bei koronarer Herzkrankheit. *Journal für Kardiologie* 2000; 7(1)
- [99] **Wolinsky H.** A proposal linking clearing of circulation lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. *Circ Res* 1980; 47: 301-311
- [100] **Wu MH.** Endothelial focal adhesions and barrier function; *J Physiol* 2005; 569.2: 359–366
- [101] **Zhao Z-Q, Sato H, Williams MW, Fernandez AZ, Vinten-Johansen J.** Adenosine A₂-receptor activation inhibits neutrophil-2 mediated injury to coronary endothelium. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: 1456–1464
- [102] **Zimmermann H.** 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 1992; 285: 345-365
- [103] **Zimmermann H.** Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000; 362: 299–309

9. ANHANG

9.1 Veröffentlichungen

Kongresspräsentationen / Abstracts

- 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 Hämostasieforschung, 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

9.2 Erklärung

„Ich erkläre: 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.“

(Uwe Krieger)

9.3 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Voss für die Bereitstellung der Thematik und des Arbeitsplatzes, für die unterstützende fachliche Beratung und dem stetigen Interesse am erfolgreichen Werdegang dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. D. Gündüz für seine äußerst gute Betreuung, Diskussionsbereitschaft und freundschaftliche Unterstützung. Er stand mir jederzeit mit Ratschlägen und Antworten zur Seite und hat viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Desweiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Angiologischen Funktionslabors für Ihre Offenheit, Hilfsbereitschaft und Unterstützung danken. Insbesondere danke ich an dieser Stelle Daniela Reitz, Henrike Thomas und Sabine Schäfer, die mir in vielen Situationen mit Rat und Tat weiter geholfen haben. Weiterer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Thomas Noll und Herrn Hermann Holzträger vom Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen für ihre fachliche und labortechnische Kompetenz.

Meiner Familie möchte ich für Ihre die immer vorhandene Unterstützung, Aufmunterung und Liebe danken.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Lutz Becker für viele gemeinsame und unvergessliche Stunden.