

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling

**Untersuchungen zum Einfluss der extrazellulären
Kalziumkonzentration und der Denervierung auf das
sauerstoffsensitive Cytochrom a_{592} im
superfundierten Karotiskörperchen der Ratte**



Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Eva von Langermann und Erlencamp
geb. am 18. Juli 1979 in Neubrandenburg
Rostock, 2015

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Rüdiger Köhling
Oscar Langendorff Institut für Physiologie, Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Wree
Institut für Anatomie, Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann
Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck

Datum der Einreichung: 02.10.2015

Tag der Verteidigung: 09.03.2016

Für die Männer meines Lebens
Jan, Benjamin, Niclas, Klaus und Hans
und den Rest meiner wundervollen Familie

Inhalt

Inhalt	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Verwendete Abkürzungen und Symbole	IX
1 Einleitung	1
1.1 Die Atmung	1
1.2 Sauerstoffmessung im Organismus	1
1.3 Das Glomus caroticum als peripherer Chemosensor	2
1.3.1 Lage und Charakteristika	2
1.3.2 Aufbau des Karotiskörperchens	3
1.3.3 Innervation und Durchblutung	6
1.3.4 Besonderheiten der Hypoxieantwort des Karotiskörperchens	8
1.4 Das Glomus caroticum als Sauerstoffsensor	9
1.4.1 Aktuelle Sauerstoffsensor-Modelle und Theorien der Signaltransduktion	9
1.4.2 Ein mitochondriales Hämprotein als Sauerstoffsensor	11
2 Ziel der Arbeit	15
3 Material und Methoden	17
3.1 Versuchsmaterial und Präparation	17
3.1.1 Versuchstiere	17
3.1.2 Versuchslösungen	17
3.1.3 Gasgemische	19
3.1.4 Behandlung der Tiere zur dauerhaften Denervierung des Karotiskörperchens	20
3.1.5 Narkose, Entnahme und Präparation des Karotiskörperchens	20
3.2 Versuchsaufbau und Messprinzipien	24
3.2.1 Aufbau der Messeinrichtung	24
3.2.2 Aufnahme und Aufbereitung der Messgrößen	27
3.2.2.1 Registrierung der Absorptionsspektren und Differenzabsorptionsspektren des Karotiskörperchen-Gewebes	27
3.2.2.2 Messung der Aktivität des Karotissinusnerven	28
3.2.3 Veränderungen der Eigenschaften der Versorgungslösung	30
3.2.3.1 Variation der Gaspartialdrücke in der Versorgungslösung	30
3.2.3.2 Veränderung der Elektrolytzusammensetzung der Versorgungslösung	31
3.3 Versuchsablauf	32
3.3.1 Äquilibration des Präparates an die Versuchsbedingungen	32
3.3.2 Hypoxieversuche	32
3.3.3 Kalzium-Magnesium-Austauschversuche mit Hypoxie	33
3.4 Auswertung der Messgrößen	34
3.4.1 Dekonvolution der Absorptionsspektren	34
3.4.2 Ermittlung der relativen spektralen Anteile der einzelnen Cytochrome	35
3.4.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse	35
3.4.4 Auswertung der Karotissinusnervaktivität	36

4 Ergebnisse	37
4.1 Angaben zu den Versuchstieren	37
4.2 Gas-Äquilibrierungscharakteristik der Superfusionslösung	39
4.3 Absorptionsspektren des Karotiskörperchengewebes	41
4.3.1 Spektrale Reaktion auf Hypoxie	41
4.3.2 Absorptionsverhalten bei Hypoxie in Kontrolllösung	44
4.3.3 Absorptionsverhalten bei Hypoxie nach Kationenaustausch	45
4.3.4 Absorptionsverhalten bei Hypoxie nach Denervierung des Karotiskörperchens	46
4.4 Statistische Absicherung	47
4.4.1 Allgemeine statistische Analyse	47
4.4.2 Statistische Analyse: Spektralgewichte in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie	54
4.4.3 Statistische Analyse: Spektralgewichte in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen	56
4.5 Afferente Reaktion des Karotissinusnerven	60
4.5.1 Das Antwortverhalten des Karotissinusnerven auf Hypoxie in Kontrolllösung	60
4.5.2 Das Antwortverhalten des Karotissinusnerven auf Hypoxie nach Kationenaustausch	61
4.5.3 Das Antwortverhalten des Karotissinusnerven auf Hypoxie nach Denervierung des Karotiskörperchens	61
5 Diskussion	63
5.1 Diskussion des experimentellen Verfahrens	63
5.1.1 Das Tiermodell	63
5.1.2 Behandlung der Tiere zur dauerhaften Denervierung des Karotiskörperchens	64
5.1.3 Narkose, Entnahme und Präparation des Karotiskörperchens	66
5.1.4 Aufbau der Messeinrichtung und Versuchsablauf	67
5.1.5 Sauerstoffversorgung des Karotiskörperchengewebes unter Superfusionsbedingungen	69
5.1.6 Bewertung der Aussagekraft der verwendeten Versuchsmethode	69
5.2 Diskussion der Bestimmung der Messgrößen	71
5.2.1 Registrierung der Absorptionsspektren und Differenz-Absorptionsspektren des Karotiskörperchengewebes	71
5.2.2 Dekonvolution der Absorptionsspektren und Ermittlung der relativen spektralen Anteile der einzelnen Cytochrome	71
5.2.3 Messung der Aktivität des Karotissinusnerven	73
5.3 Diskussion der Ergebnisse	74
5.3.1 Absorptionsverhalten und Spikerate bei Hypoxie in Kontrolllösung	74
5.3.2 Absorptionsverhalten und Spikerate bei Hypoxie in kalziumfreier Versuchslösung	74
5.3.3 Absorptionsverhalten und Spikerate bei Hypoxie nach vorausgegangener dauerhafter Denervierung	79
5.3.4 Vergleich von Absorptionsverhalten und Spikerate bei Hypoxie zwischen den drei Versuchsreihen	84

6 Zusammenfassung und Ausblick	89
6.1 Zusammenfassung	89
6.2 Einordnung in den aktuellen Kontext	90
7 Literaturverzeichnis	93
8 Anhang	
Thesen	
Danksagung	
Eidesstattliche Erklärung	
Lebenslauf	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Lage des Glomus caroticum (Mutschler et al. 2007).	1
Abbildung 1.2: Lage der Glomera aortica (Mutschler et al. 2007).	2
Abbildung 1.3: Das Karotiskörperchen als polymodaler Stresssensor. Die Stimulierung des Karotiskörperchens kann respiratorische, kardiovaskuläre, neuroendokrine und renale Antworten auslösen (Conde et al. 2014).	3
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Typ-I- und Typ-II-Zellen des Glomus caroticum mit zentralem Gefäß und Innervation (Nurse 2014).	4
Abbildung 1.5: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Glomus caroticum der Ratte mit Typ-I-Zellen (1), Typ-II-Zellen (2), Kapillaren (V), Nervenfasern (Pfeile) und Bindegeweben (C) (Pallot 1987).	5
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der zellulären Strukturen des Glomus caroticum einschließlich der afferenten Innervation über den Karotissinusnerven des N. glossopharyngeus (Hlastala und Berger 1996).	6
Abbildung 1.7: Das Karotiskörperchen mit seinen wichtigsten Chemoreflexen (Conde et al. 2014).	7
Abbildung 1.8: Theorie der Signaltransduktion der Hypoxieantwort in der Glomuszelle. Erklärung siehe Text (Carroll und Kim 2005).	10
Abbildung 1.9: Die mitochondriale Atmungskette mit ihren Cytochromen.	12
Abbildung 1.10: Der Elektronenfluss in der Cytochrom-c-Oxidase.	13
Abbildung 3.1: Foto der präparierten Karotisbifurkation einer Wistar-Kyoto-Laborratte bei 15facher Vergrößerung: ① A. carotis communis, ② A. carotis interna, ③ A. carotis externa, ④ A. occipitalis, ⑤ N. glossopharyngeus, ⑥ Glomus caroticum und ⑦ Ramus sinus carotici (Bildquelle: Arbeitsgruppe Huckstorf).	22
Abbildung 3.2: Das präparierte Karotiskörperchen mit dem Stumpf des Karotissinusnerven kurz vor dem Einsetzen in die Messkammer (Bildquelle: Arbeitsgruppe Huckstorf).	23
Abbildung 3.3: Aufbau des Superfusionskreislaufes (grau) (Streller 2000).	24
Abbildung 3.4: Schematischer Aufbau der Messkammer (Streller 2000).	25
Abbildung 3.5: Das Karotiskörperchen mit dem in der Glaselektrode eingesaugten Karotissinusnerv wurde in einem Loch mit passendem Durchmesser auf dem Platinblech in der Messkammer fixiert (Bildquelle: Arbeitsgruppe Huckstorf).	26

Abbildung 3.6: Saugelektrode mit eingesaugtem Karotissinusnerven (Streller 2000).	29
Abbildung 3.7: Bestimmung der Nervenaktivität als Spikerate. Bei der Fensterdiskrimination wird neben dem Spike-Impulssignal ein Multiplexsignal (MUX) erzeugt, in welchem das Ableitsignal (U_{ext}) und die untere bzw. obere Grenzspannung des Diskriminators ausgegeben werden (Streller 2000).	29
Abbildung 4.1: Darstellung einer typischen Spektralserie mit Aufnahmen der ersten bis sechsten Minute bei Stimulation mit einer Begasung der Superfusionslösung von 0% O ₂ .	42
Abbildung 4.2: Darstellung der Differenzabsorptionsspektren der Minute drei, vier und fünf mit Fit-Kurve (rote Linie) der oben gezeigten Spektralserie bei Stimulation mit einer Begasung der Superfusionslösung von 0% O ₂ .	43
Abbildung 4.3: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der Cytochrome c ₅₅₀ (schwarz), b ₅₅₈ (gelb), b ₅₆₃ (grün), a ₅₉₂ (blau) und a ₆₀₃ (rot) mit Standardabweichung in Kontrolllösung in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie (50 mmHg: N = 10; 70 mmHg: N = 10; 100 mmHg: N = 7).	44
Abbildung 4.4: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der Cytochrome c ₅₅₀ (schwarz), b ₅₅₈ (gelb), b ₅₆₃ (grün), a ₅₉₂ (blau) und a ₆₀₃ (rot) mit Standardabweichung in kalziumfreier magnesiumhaltiger Superfusionslösung (Versuchslösung) in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie (50 mmHg: N = 3; 70 mmHg: N = 3; 100 mmHg: N = 4). Die Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nur in eine Richtung eingetragen.	45
Abbildung 4.5: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der Cytochrome c ₅₅₀ (schwarz), b ₅₅₈ (gelb), b ₅₆₃ (grün), a ₅₉₂ (blau) und a ₆₀₃ (rot) mit Standardabweichung nach Denervierung des Glomus caroticum in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie (50 mmHg: N = 10; 70 mmHg: N = 9; 100 mmHg: N = 6). Die Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nur in eine Richtung eingetragen.	46
Abbildung 4.6: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte des Cytochroms c ₅₅₀ in Kontrolllösung (blau), kalziumfreier Versuchslösung (grün) und nach vorrausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven (ocker).	49
Abbildung 4.7: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte des Cytochroms b ₅₅₈ in Kontrolllösung (blau), kalziumfreier Versuchslösung (grün) und nach vorrausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven (ocker).	50
Abbildung 4.8: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte des Cytochroms b ₅₆₃ in Kontrolllösung (blau), kalziumfreier Versuchslösung (grün) und nach vorrausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven (ocker).	51
Abbildung 4.9: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte des Cytochroms a ₅₉₂ in Kontrolllösung (blau), kalziumfreier Versuchslösung (grün) und nach vorrausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven (ocker).	52

Abbildung 4.10: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte des Cytochroms a_{603} in Kontrolllösung (blau), kalziumfreier Versuchslösung (grün) und nach vorausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven (ocker).	53
Abbildung 4.11: Vergleich der Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der Cytochrome c_{550} (schwarz), b_{558} (gelb), b_{563} (grün), a_{592} (blau) und a_{603} (rot) in Kontrolllösung (durchgezogene Linie) und kalziumfreier Versuchslösung (gestrichelte Linie) in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Angabe der Standardabweichung verzichtet. Es handelt sich hierbei um eine Überlagerung der Abb. 4.3 und Abb. 4.4.	58
Abbildung 4.12: Vergleich der Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der Cytochrome c_{550} (schwarz), b_{558} (gelb), b_{563} (grün), a_{592} (blau) und a_{603} (rot) zwischen denervierten (gestrichelte Linien) und nicht denervierten (durchgezogene Linien) Karotiskörperchen-Präparaten in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Angabe der Standardabweichung verzichtet. Es handelt sich hierbei um eine Überlagerung der Abb. 4.3 und Abb. 4.5.	59
Abbildung 4.13: Grafische Darstellung der Spikerate des Karotissinusnerven pro Sekunde (blaue Linie) infolge einer Stimulation mit einer Hypoxie mit 0% zugesetztem Sauerstoff.	60
Abbildung 4.14: Fehlendes Antwortverhalten des Karotissinusnerven bei Hypoxie mit 5% zugesetztem Sauerstoff nach Kationenaustausch.	61
Abbildung 4.15: Fehlendes Antwortverhalten des Karotissinusnerven bei Hypoxie mit 5% zugesetztem Sauerstoff nach vorangegangener Durchtrennung des Nerven.	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Präparationslösung.	18
Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Kontrolllösung.	18
Tabelle 3.3: Zusammensetzung der kalziumfreien, magnesiumhaltigen Versuchslösung.	19
Tabelle 3.4: Verwendete Gase mit Herstellerangaben.	19
Tabelle 3.5: Versuchsablauf bei Hypoxieversuchen mit beispielhafter zeitlicher Reihenfolge und entsprechenden Gasgemischen der Superfusionslösung.	33
Tabelle 3.6: Versuchsablauf der Kalzium-Magnesium-Austauschversuche mit beispielhafter zeitlicher Reihenfolge und entsprechenden Gasgemischen der Superfusionslösung.	34
Tabelle 4.1: Daten aller ausgewählten Tiere.	37
Tabelle 4.2: Daten der ausgewählten Tiere getrennt nach Versuchsreihen.	37
Tabelle 4.3: Angaben zu den Versuchstieren, welche für die Kationenaustauschversuche mit kalziumhaltiger Kontrolllösung am Glomus caroticum verwendet wurden.	38
Tabelle 4.4: Angaben zu den Versuchstieren, welche für die Kationenaustauschversuche mit kalziumfreier Versuchslösung am Glomus caroticum verwendet wurden.	38
Tabelle 4.5: Angaben zu den Versuchstieren, welche für die Denervierungsversuche am Glomus caroticum verwendet wurden.	39
Tabelle 4.6: Der gemessene Sauerstoffpartialdruck (pO_2), Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) und pH als Mittelwert mit Angabe der Standardabweichung in der Superfusionslösung bei Normoxie, Hypoxie durch Zugabe von 10%, 5% und 0% Sauerstoff bei allen Versuchen mit Kontrolllösung.	40
Tabelle 4.7: Der gemessene Sauerstoffpartialdruck (pO_2), Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) und pH als Mittelwert mit Angabe der Standardabweichung in der Superfusionslösung bei Normoxie und Hypoxie durch Zugabe von 10%, 5% und 0% Sauerstoff bei allen Versuchen mit kalziumfreier Versuchslösung.	40
Tabelle 4.8: Der gemessene Sauerstoffpartialdruck (pO_2), Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) und pH als Mittelwert mit Angabe der Standardabweichung in der Superfusionslösung bei Normoxie und Hypoxie durch Zugabe von 10%, 5% und 0% Sauerstoff bei allen Denervierungsversuchen.	40

Tabelle 4.9: Die gemessenen Elektrolytkonzentrationen für Natrium (Na), Kalium (K) und Kalzium (Ca) sowie die Osmolarität als Mittelwert mit Angabe der Standardabweichung im Vergleich zwischen Kontrolllösung und kalziumfreier Versuchslösung.	41
Tabelle 4.10: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der fünf Cytochrome mit Standardabweichung in Kontrolllösung in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie.	44
Tabelle 4.11: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der fünf Cytochrome mit Standardabweichung in kalziumfreier magnesiumhaltiger Superfusionslösung (Versuchslösung) in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie.	45
Tabelle 4.12: Darstellung der Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der fünf Cytochrome mit Standardabweichung nach vorausgegangener dauerhafter Denervierung des Glomus caroticum in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie.	46
Tabelle 4.13: Darstellung der Verteilung der durchgeführten Versuche.	47
Tabelle 4.14: Darstellung der Häufigkeit der verwendeten Versuchsreihen.	47
Tabelle 4.15: Darstellung der Häufigkeit der verwendeten Karotiskörperchenpräparate nach Seitenlokalisation und Versuchsreihe.	47
Tabelle 4.16: Darstellung der Zwischenssubjekteffekte für die abhängige Variable Cytochrom c_{550} .	49
Tabelle 4.17: Darstellung der Zwischenssubjekteffekte für die abhängige Variable Cytochrom b_{558} .	50
Tabelle 4.18: Darstellung der Zwischenssubjekteffekte für die abhängige Variable Cytochrom b_{563} .	51
Tabelle 4.19: Darstellung der Zwischenssubjekteffekte für die abhängige Variable Cytochrom a_{592} .	52
Tabelle 4.20: Darstellung der Zwischenssubjekteffekte für die abhängige Variable Cytochrom a_{603} .	53
Tabelle 4.21: Post-Hoc-Test für die drei Hypoxiestufen mit Angabe der Signifikanz.	55
Tabelle 4.22: Post-Hoc-Test für die drei Versuchsreihen mit Angabe der Signifikanz.	57

Verwendete Abkürzungen und Symbole

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
ANP	Atriales natriuretrisches Peptid
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
art.	arteriell
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalziumion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CB	Karotiskörperchen (carotid body)
CCO	Cytochrom-c-Oxidase
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
d	Tag/Tage
df	Freiheitsgrade
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
F	Anzahl der Freiheitsgrade
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
Hb	Hämoglobin
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIF-1	hypoxia inducible factor
HO-2	Hämoxygenase-2
Hz	Herz
I(λ)	Extinktion des Transmissionsspektrums
I ₀ (λ)	Extinktion des Referenzspektrums
I _{off} (λ)	Dunkelströme
I.E.	Internationale Einheiten
i.v.	intravenös
K ⁺	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
KSN	Karotissinusnerv
KHz	Kiloherz
L	links
Mg ²⁺	Magnesiumion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min./min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mMol	Millimol
Mol	Mol

N	Anzahl
Ni ²⁺	Nickelion
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaCN	Natriumcyanid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat, Natriumbicarbonat
N ₂	Stickstoff
N.	Nervus
NO	Stickstoffmonoxid
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OH ⁻	Hydroxylradikal
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
P _{aCO₂}	Kohlendioxidpartialdruck im arteriellen Blut
P _{CO₂} , pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
P _{O₂} , pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
P _{aO₂}	Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut
R	rechts
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S(λ)	Differenzabsorptionsspektrum
Sig.	Signifikanz
Substanz P	ein Neuropeptid aus 11 Aminosäuren
T	Temperatur
T(λ)	Transmissionsspektrum
T ₀ (λ)	Referenzspektrum
TASK	(twin-pore acid-sensitive K ⁺) ähnlichen K ⁺ -Kanäle
u.a.	unter anderem
V.	Vena
V	Volt
W	Watt
WKY	Wistar-Kyoto-Laborratten
zw.	zwischen
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Die Atmung

Tierische Zellen sind zur Energiegewinnung auf Sauerstoff angewiesen. Die Atmung stellt deshalb einen lebenswichtigen Vorgang dar, mit dem der Sauerstoff (O_2) der Luft oder des Wassers dem Blut zugeführt und das im Blut angehäuften Kohlendioxid (CO_2) aus dem Körper entfernt werden kann.

Sauerstoff ist ein lebenswichtiges Substrat für jede Säugetierzelle. Als terminaler Elektronenakzeptor in der Atmungskette dient er zur Energiegewinnung in Form von ATP durch die oxidative Phosphorylierung (Heinrich et al. 2014, Horton et al. 2008). Zur Versorgung von Zellen und Organen ist eine kontinuierliche Sauerstoffzufuhr erforderlich. Bei Sauerstoffmangel (Hypoxie) können sie nur kurze Zeit überleben. Deshalb ist es von allergrößter Bedeutung, dass es im Organismus Sensoren gibt, die laufend den aktuellen Gehalt von Sauerstoff im arteriellen Blut bestimmen und die Atemtätigkeit daran anpassen.

1.2 Sauerstoffmessung im Organismus

Geeignete Sauerstoffsensoren müssen in der Lage sein, einen potentiellen Sauerstoffmangel schnell zu bestimmen und in ein neuronales Signal zu übersetzen, welches gegebenenfalls die Atmung stimuliert. Im menschlichen Körper geschieht die Sauerstoffperzeption hauptsächlich in peripheren Organen und in der Lunge selbst.

Das Glomus caroticum ist der wichtigste periphere Chemosensor für Sauerstoff beim Menschen und bei Säugetieren (Prabhakar 2000). Es wird auch als Glomusorgan oder Karotiskörperchen bezeichnet (Abbildung 1.1). Weitere wichtige periphere Sauerstoffsensoren sind in der Wand des Aortenbogens und dessen proximalen Abgängen (Glomera aortica, Abbildung 1.2) sowie in den neuroepithelialen Körperchen der Lunge (Glomera pulmonalia) zu finden (Schmidt et al. 2011, Sommer 2011).

Trotz der umfangreichen Erkenntnisse über die Mechanismen der Sauerstoffmessung in einzelnen Zellen und Organsystemen konnte bis jetzt noch

kein spezieller Sauerstoffsensor beschrieben werden (Carroll und Kim 2005). Aktuell werden verschiedene Sauerstoffsensormodelle diskutiert, die durchaus nebeneinander oder als funktionelle Einheit vorkommen könnten (Kemp und Telezhkin 2014, Lahiri et al. 2006, Prabhakar 2006, Prabhakar und Peers 2014). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Sauerstoffsensing im wichtigsten peripheren arteriellen Chemorezeptor: dem Glomus caroticum.



Abbildung 1.1:

Lage des Glomus caroticum (Mutschler et al. 2007).

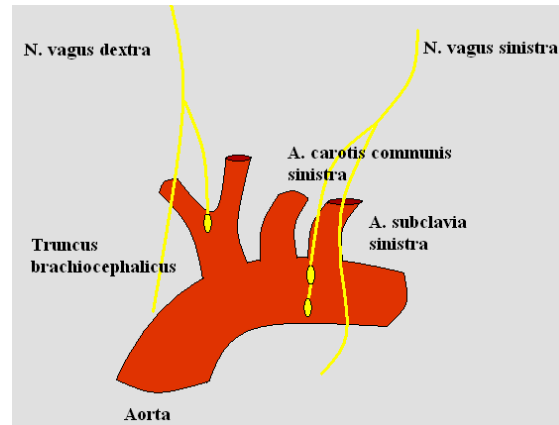


Abbildung 1.2:

Lage der Glomera aortica (Mutschler et al. 2007).

1.3 Das Glomus caroticum als peripherer Chemosensor

1.3.1 Lage und Charakteristika

Das Karotiskörperchen (Glomus caroticum) ist ein kleines ($< 100 \mu\text{g}$ Nassgewicht bei der Ratte (Kumar 2007)), knötchenförmiges Organ an der Gabelung der Arteria carotis communis in die Arteria carotis interna und externa. Anatomisch auffallend ist seine ausgesprochen starke Durchblutung und Innervation. Aufgrund seiner winzigen Größe wurde es bei seiner ersten Entdeckung in menschlichen Körper im Jahre 1743 als *Ganglion minutum* bezeichnet (Pick 1959). In Wirklichkeit handelt es sich um ein Paraganglion, also um eine Ansammlung von Nervenzellen außerhalb des zentralen Nervensystems (Ganglion) mit teilweiser endokriner Funktion. Das auch als Paraganglion caroticum bezeichnete Karotiskörperchen zählt zu den parasymphathischen, nicht chromaffinen Paraganglien. Funktionell steht es zwischen dem vegetativen und dem endokrinen Nervensystem. Die Zellen des Paraganglions

sind ektodermaler Herkunft, da sie in der Embryonalentwicklung aus der Neuralleiste ausgewandert sind. Das Karotiskörperchen ist ein Paraganglion mit Chemorezeptoren, die den Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck sowie den pH-Wert des Blutes messen. Außerdem wird aktuell diskutiert, dass ebenso eine Vielzahl anderer Stimuli gemessen werden, wie beispielsweise die Temperatur, Osmolarität, Hyperkaliämie, Hypotension und die Glukosekonzentration im Blut (Conde et al. 2007, Pardal und López-Barneo 2002, Prabhakar und Joyner 2015, Ribeiro et al. 2013). Aus diesem Grund wird das Karotiskörperchen gelegentlich auch als polymodaler Stresssensor (Abbildung 1.3) bezeichnet (Kumar und Phil 2007).

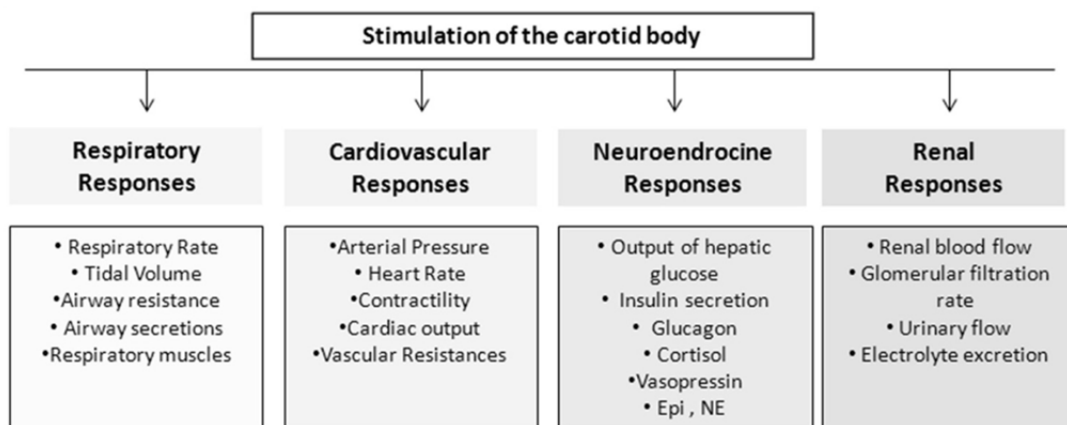


Abbildung 1.3: Das Karotiskörperchen als polymodaler Stresssensor. Die Stimulierung des Karotiskörperchens kann respiratorische, kardiovaskuläre, neuroendokrine und renale Antworten auslösen (Conde et al. 2014).

1.3.2 Aufbau des Karotiskörperchens

Histologisch betrachtet ist das Karotiskörperchen von einer Bindegewebskapsel umgeben. Von der Kapsel aus strahlen Septen in das Glomusinnere ein und teilen es so in Läppchen. Die Läppchen enthalten Inseln eng gepackter Parenchymzellen. Licht- und elektronenmikroskopisch kann man zwei Zellarten unterscheiden: die Typ-I-Zellen, die auch Haupt- oder Glomuszellen genannt werden, und die gliaähnlichen Typ-II-Zellen (Abbildung 1.4). Diese werden auch als Nebenzellen bezeichnet und sind den Typ-I-Zellen zahlenmäßig um den Faktor drei bis fünf unterlegen (McDonald und Mitchell 1975). Die Typ-II-Zellen besitzen selbst keine chemosensorische Aktivität und fungieren als gliaähnliche Stützzellen. Sie

umsäumen die im Durchmesser ca. 10 μm großen und in dichten Haufen liegenden Typ-I-Zellen (Kumar und Phil 2007). Dadurch trennen sie die Glomuszellen von einem Geflecht sinusoider, gefensterter Kapillaren. Parenchymzellen und Gefäße werden von einem Netz von feinen Retikulinfasern gestützt (Abbildung 1.5). In der Peripherie des Karotiskörperchens konnten einzelne oder in kleinen Gruppen vorkommende Ganglienzellen nachgewiesen werden. Diese sind im Durchmesser 15-30 μm groß und liegen dem Karotissinusnerv oder sympathischen Nerven an. Die meisten Ganglienzellen der Ratte sind parasympathischen Ursprungs und werden über Axone, welche im Karotissinusnerven verlaufen, innerviert (Kondo 1977).

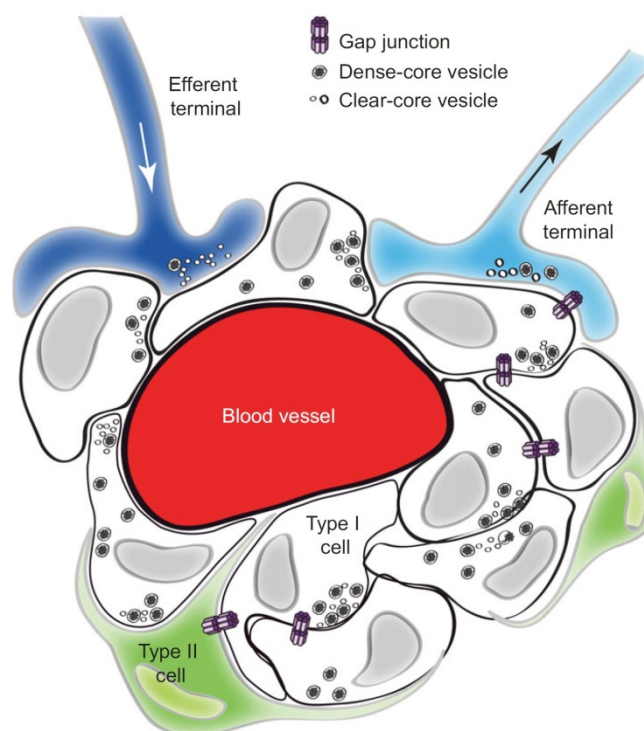


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Typ-I- und Typ-II-Zellen des Glomus caroticum mit zentralem Gefäß und Innervation (Nurse 2014).

Die Typ-I-Zellen kennzeichnet ein zahlreich vorhandenes Zytoplasma, welches von elektronendichten Vesikeln durchsetzt ist. Diese speichern wahrscheinlich Dopamin und andere Transmitter. Die Glomuszelle enthält eine Vielzahl von erregenden und hemmenden Neurotransmittern. Dazu gehören verschiedene Amine wie Katecholamine und Acetylcholin, Neuropeptide wie Substanz P, die Purine ATP und Adenosin, Aminosäuren wie GABA sowie die gasförmigen Signalmoleküle NO und CO (Kumar 2007).

Die Transmitter, die vom Karotiskörperchen gebildet werden, können in konventionelle und unkonventionelle Transmitter eingeteilt werden. Die konventionellen Neurotransmitter werden in synaptischen Vesikeln gespeichert und agieren über spezifische, membrangebundene, oft mit G-Proteinen gekoppelte Rezeptoren. Die unkonventionellen Neurotransmitter werden nicht in synaptischen Vesikeln gespeichert, sondern spontan durch enzymatische Reaktionen synthetisiert. Sie interagieren mit zytosolischen Enzymen oder modifizieren Proteine direkt. Zu den konventionellen Transmittern zählen Acetylcholin, die Katecholamine Dopamin und Norepinephrin, Histamin (Körner 2005), Serotonin, die Neuropeptide Substanz P, Endothelin 1 und Enkephalin, andere Peptide wie ANP (atriales natriuretisches Peptid), Galanin und Neuropeptid Y sowie ATP und Adenosin (Nurse 2014). Zu den unkonventionellen Neurotransmittern gehören die Gasmoleküle NO und CO (Lahiri et al. 2006). Das Karotiskörperchen bildet so viele verschiedene Transmitter wie das Gehirn.

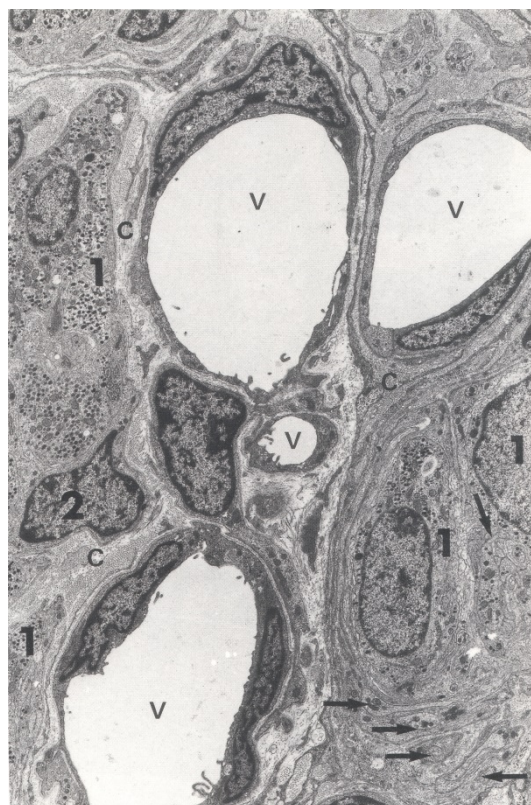


Abbildung 1.5: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Glomus caroticum der Ratte mit Typ-I-Zellen (1), Typ-II-Zellen (2), Kapillaren (V), Nervenfasern (Pfeile) und Bindegewebe (C) (Pallot 1987).

Zahlreiche Nervenfasern enden in der Nähe der Glomuszellen. Die Glomuszellen selbst sind sekundäre Sinneszellen. Sie besitzen kein eigenes Axon, weisen aber einen synaptischen Kontakt mit den afferenten Endigungen des Karotissinusnerven auf. Miteinander sind die Typ-I-Zellen über Gap junctions zu einem funktionellen Synzytium verbunden (Geneser 1990, Klinke und Silbernagel 2000).

1.3.3 Innervation und Durchblutung

Die Innervation des Glomus caroticum erfolgt afferent über den Ramus sinus carotici des N. glossopharyngeus (IX. Hirnnerv) und efferent über Äste des N. vagus (X. Hirnnerv). Zusätzlich verlaufen sympathische Fasern aus dem Ganglion cervicale superior des Grenzstranges und parasympathische Fasern des Ganglion caroticum zum Glomusorgan (Verna 1979). Insgesamt stammen 95% der Nervenendigungen vom N. glossopharyngeus und sind somit afferent. Nur 5% der Nervenendigungen sollen efferent und hauptsächlich sympathischen Ursprungs sein (McDonald und Mitchell 1975).

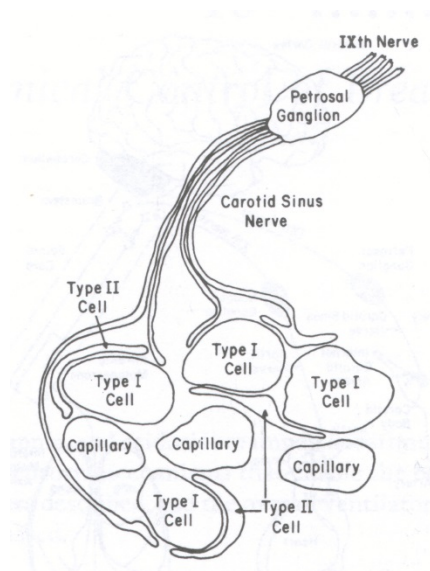


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der zellulären Strukturen des Glomus caroticum einschließlich der afferenten Innervation über den Karotissinusnerven des N. glossopharyngeus (Hlastala und Berger 1996).

Die Glomuszellen werden als sekundäre Sinneszellen durch Nervenendigungen sensorischer Neurone des Ganglion petrosum innerviert. Die afferenten Fasern

verlaufen im Ramus sinus carotici (Abbildung 1.6), einem Ast des N. glossopharyngeus (IX. Hirnnerv). Die Perikaria der Afferenzen liegen im Ganglion petrosum (Ganglion inferius n. glossopharyngei) direkt unterhalb des Foramen jugulare. Die Afferenzen projizieren in den Nucleus tractus solitarius in der Medulla oblongata, wo sie mit den kardiorespiratorischen und autonomen Reflexbögen gekoppelt sind (Abbildung 1.7).

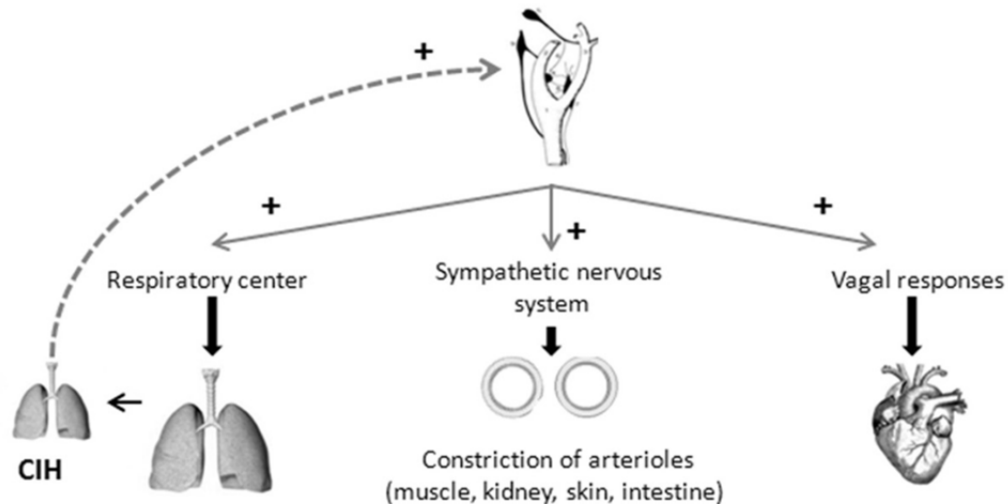


Abbildung 1.7: Das Karotiskörperchen mit seinen wichtigsten Chemoreflexen (Conde et al. 2014).

Das Karotiskörperchen ist ein stark vaskularisiertes Gebilde. Es wird von großen arteriellen Gefäßen durchblutet und weist dadurch eine der höchsten spezifischen Durchblutungen ($> 20 \text{ ml/g} \cdot \text{min}$) des Organismus auf (Schmidt et al. 2011). Meistens erfolgt die Versorgung des Glomus caroticum durch die A. carotis interna (seltener durch die A. carotis externa oder A. occipitalis) über eine kleine Arterie, die sich vielfach aufteilt und ein dichtes kapilläres Netzwerk bildet.

Bezogen auf seine Größe erhält das Karotiskörperchen eine 10 bis 15 Mal höhere Durchblutung als das Gehirn (Kumar 2007). Die Gefäße, die das Karotiskörperchen enthält, werden unterteilt in typische Kapillaren (Gefäßdurchmesser $7\text{--}8 \text{ }\mu\text{m}$) und erweiterte Sinusoide (maximaler Durchmesser $18 \text{ }\mu\text{m}$), welche in engem Kontakt zu den Glomuszellen stehen. Außerdem wird das Vorhandensein von arteriovenösen Shunts im Karotiskörperchen angenommen (Kumar 2007). Der oberflächliche venöse Abfluss erfolgt über die V. jugularis interna und ihre Äste.

1.3.4 Besonderheiten der Hypoxieantwort des Karotiskörperchens

Das Karotiskörperchen zeichnet sich durch eine extrem hohe Sauerstoffsensitivität aus. Es reagiert bereits auf Sauerstoffpartialdrücke von 100-80 mmHg mit einer ansteigenden Nervaktivität (andere Gewebe erst unterhalb von 40 mmHg pO_2) (Prabhakar 2006). Die Schwelle der Sauerstoffrezeption ist schon bei einem arteriellen pO_2 von ca. 110 mmHg erreicht. Dies bedeutet, dass die Glomuszelle schon bei einem normalen arteriellen Sauerstoffpartialdruck von 95-100 mmHg aktiviert ist. Diese extrem hohe Sauerstoffempfindlichkeit scheint durch ein besonderes mitochondriales Cytochrom mit einer sehr niedrigen Sauerstoffbindungsaffinität verursacht zu sein (Streller et al. 2002).

Des Weiteren ist die Geschwindigkeit (in Sekunden), mit der das Karotiskörperchen auf fallende Sauerstoffpartialdrücke reagiert, bemerkenswert. Andere Gewebe benötigen Minuten bis Stunden. Und schließlich tritt keine oder nur eine geringe Adaptation der Nervaktivität während der gesamten Hypoxiezeit auf (Prabhakar 2006).

Diese Besonderheiten machen das Karotiskörperchen zu einem einzigartigen Sauerstoffsensor. Seine Lage an der Aufteilungsstelle der Karotiden, womit es dem sauerstoffempfindlichsten Organ des Körpers, dem Gehirn, direkt vorgeschaltet ist, unterstreicht diese Funktion noch.

1.4 Das Glomus caroticum als Sauerstoffsensor

1.4.1 Aktuelle Sauerstoffsensormodelle und Theorien der Signaltransduktion

Der genaue Mechanismus der Sauerstoffmessung in der Glomuszelle ist noch nicht vollständig aufgeklärt und momentan Gegenstand intensiver Forschung (Acker et al. 2006, Kemp und Telezhkin 2014, López-Barneo et al. 2004, Peers et al. 2010, Prabhakar und Joyner 2015).

Als Kandidaten für den Sauerstoffsensor kommen verschiedene **sauerstoffsensitive Kaliumkanäle**, wie der MaxiK, Kv-Kanäle oder der K_{2P} -Kanal, in Betracht (Buckler 2012, Lahiri et al. 2006, López-Barneo et al. 2004). Unter den zahlreichen Kaliumkanälen, die in der Glomuszelle gefunden wurden, sind auch einige, die bei Hypoxie gehemmt werden (López-Barneo et al. 1988). Bis heute konnte nicht genau geklärt werden, welcher dieser O_2 -sensitiven K^+ -Kanäle in vivo am meisten zur Hypoxieantwort beiträgt und wie genau das komplexe Zusammenspiel der Signaltransduktion zwischen O_2 -Messung und Abnahme der Kaliumleitfähigkeit funktioniert. Außerdem sind Unterschiede in der Funktion der Kaliumkanäle zwischen verschiedenen Spezies (Ratte, Kaninchen, Maus) festgestellt worden (Evans 2006, Kemp 2006).

Als andere Sauerstoffsensorthorien werden diskutiert: Regulationen über den **Transkriptionsfaktor HIF-1** (hypoxia inducible factor) (Acker et al. 2006, Lahiri et al. 2006), Beeinflussungen über den gasförmigen Transmitter **Wasserstoffdisulfid** (Buckler 2012, Kemp und Telezhkin 2014, Prabhakar und Joyner 2015) oder **Stickstoffmonoxid** (Prabhakar und Peers 2014, Yamamoto et al. 2006) und die **AMP-aktivierte Proteinkinase-Hypothese** (Evans 2006, Peers et al. 2010).

Der primäre Sauerstoffsensor könnte auch ein Protein sein, das reaktive Metalle enthält, wie ein **Hämprotein** (Acker und Acker 2004, Lahiri et al. 1999). Ein Hämprotein ist in der Lage, den Sauerstoff direkt zu binden und eine O_2 -abhängige Konformationsänderung durchzuführen. In Anwesenheit von O_2 (oxidierte Zustand) ist das Hämprotein inaktiv. Bei Hypoxie (desoxygenierter Zustand) ist das Hämprotein aktiv und gibt das Hypoxiesignal weiter. Unter den Hämproteinen gibt es mehrere Kandidaten, die als primärer Sauerstoffsensor in Frage kommen: **K^+ -Kanal-assoziierte Proteine** wie die Hämoxigenase-2 (HO-2) (Lahiri et al. 2006, Prabhakar und Peers 2014), nicht-mitochondriale Proteine wie die neutrophile **NADPH-Oxidase**

(Cross et al. 1990, Porwol et al. 2001), welche aber nach neueren Erkenntnissen beim Sauerstoffsensing eine eher untergeordnete Rolle spielt (Kemp 2006, Lahiri et al. 2006), und die **mitochondrialen Proteine der Atmungskette** (Busch 2008, López-Barneo et al. 2004, Mills und Jöbsis 1972, Steller et al. 2002, Wilson et al. 1994).

Die allgemein akzeptierte Vorstellung der Signaltransduktion in der Glomuszelle ist in Abbildung 1.8 dargestellt: ein (möglicherweise intrazellulär in den Mitochondrien lokalisierter) Sauerstoffsensor verursacht eine Abnahme der Kaliumleitfähigkeit (1a und 1b in Abb. 1.8). Dies bewirkt eine Depolarisation der Zellmembran (2 in Abb. 1.8) mit einem nachfolgenden Kalziumeinstrom durch spannungsabhängige Kalziumkanäle (3 in Abb. 1.8). Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (4 in Abb. 1.8) führt zu einer Freisetzung von Neurotransmittern (5 in Abb. 1.8), welche die afferenten Nervenfasern des Karotissinusnerven erregen (6a in Abb. 1.8) und ein Aktionspotential (7 in Abb. 1.8) auslösen können (Carroll und Kim 2005, Schmidt et al. 2011).

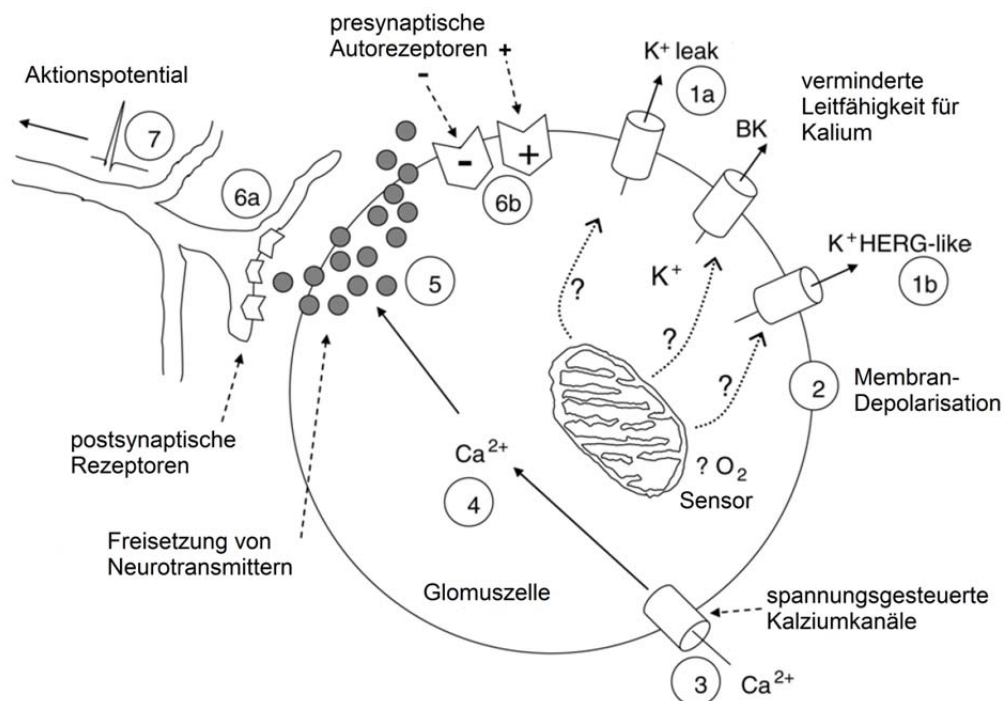


Abbildung 1.8: Theorie der Signaltransduktion der Hypoxieantwort in der Glomuszelle. Erklärung siehe Text (Carroll und Kim 2005).

Hypoxie soll die Freisetzung von einem oder mehreren Transmittern aus der Glomuszelle fördern, welche die nahe afferente Nervendingung depolarisieren und so zu einem Anstieg des afferenten sensorischen Signals führen. Das Karotiskörperchen verfügt über eine Vielzahl von erregenden und hemmenden Transmittern. Die meisten Neurotransmitter des Karotiskörperchens sind kolokalisiert und es gibt Beweise für eine gemeinsame Freisetzung der Transmitter bei Hypoxie, beispielsweise von Acetylcholin und ATP (Zhang et al. 2000), genauso wie für eine Interaktion zwischen hemmenden und erregenden Transmittern (Lahiri et al. 2006). Momentan wird angenommen, dass die gleichzeitige Freisetzung von Dopamin und ATP für die Erregungsweiterleitung auf die afferente Nervendingung verantwortlich ist. ATP erregt die afferenten Nervenfasern des Karotissinusnerven (6a in Abb. 1.8) durch Stimulierung unspezifischer Kationenkanäle (ionotope P2X-Rezeptoren). Dopamin wirkt als Kotransmitter neuromodulatorisch (Schmidt et al. 2011). Allerdings führt Hypoxie zur Freisetzung sowohl von erregenden als auch von hemmenden Transmittern. Dies führte zu der Hypothese, dass erregende und hemmende Transmitter im Sinne eines „push-pull“-Mechanismus zusammenarbeiten, was die geringe Adaptation der Nervaktivität während der Hypoxie erklären könnte (Prabhakar 2006). Die Komplexität der Signalübertragung wird durch das Vorhandensein von präsynaptischen Autorezeptoren der Typ-I-Zelle (6b in Abb. 1.8) zusätzlich zu den postsynaptischen Rezeptoren noch verstärkt (Kumar 2007).

1.4.2 Ein mitochondriales Hämprotein als Sauerstoffsensor

Mitochondrien sind für den Verbrauch eines Großteils des Sauerstoffes in der Zelle verantwortlich. Deshalb wurde ihre Funktion als potentieller Sauerstoffsensor schon oft diskutiert (Buckler und Turner 2013, Donnelly et al. 2014, Kummer und Yamamoto 2002, Lahiri et al. 2006, Peers et al. 2010) und unter dem Begriff metabolische Hypothese zusammengefasst. Hauptsächlich dient der von den Mitochondrien genutzte Sauerstoff der Energiegewinnung der Zelle durch Reduktion des molekularen Sauerstoffs zu Wasser über die Enzymkomplexe der Atmungskette (Heinrich et al. 2014, Horton et al. 2008). Die metabolische Hypothese geht davon aus, dass die zur Verfügung stehende Energie der Zelle bei Sauerstoffmangel abnimmt und dadurch die Depolarisation mit nachfolgender kalziumvermittelter

Transmitterfreisetzung ausgelöst wird. Für die Mitochondrien des Karotiskörperchens konnte in verschiedenen Untersuchungen (Duchen und Biscoe 1992, Mills und Jöbsis 1972, Nair et al. 1986) eine außergewöhnlich hohe Sensitivität auf den Reiz Hypoxie nachgewiesen werden. Zusammen mit dem indirekten Nachweis, dass der ATP-Spiegel in Glomuszellen bei Hypoxie abnimmt und ATP die Kaliumkanalaktivität steigern kann (Varas et al. 2007) spricht das für einen mitochondrialen Sauerstoffsensor.

Als Kandidaten für den potentiellen Sauerstoffsensor in den Mitochondrien des Karotiskörperchens werden alle vier Komplexe der mitochondrialen Atmungskette (Abbildung 1.9) diskutiert (Chandel 2010, López-Barneo et al. 2004, Steller et al. 2002). Dem terminalen Enzymkomplex (Cytochrom-c-Oxidase) scheint eine besondere Bedeutung bezüglich der extremen Sauerstoffempfindlichkeit des Karotiskörperchens zuzukommen. Bereits Mills und Jöbsis (Mills und Jöbsis 1972) vermuteten, dass die Zellen des Karotiskörperchens eine Cytochrom-c-Oxidase mit einer geringen Sauerstoffaffinität enthalten. Auch Buckler und Turner (Buckler und Turner 2013) konnten jüngst bestätigen, dass Hypoxie den Elektronentransport und die Aktivität der Cytochromoxidase bereits bei einem relativ hohen pO_2 hemmen kann. Somit wäre diese als möglicher Sauerstoffsensor besonders geeignet.

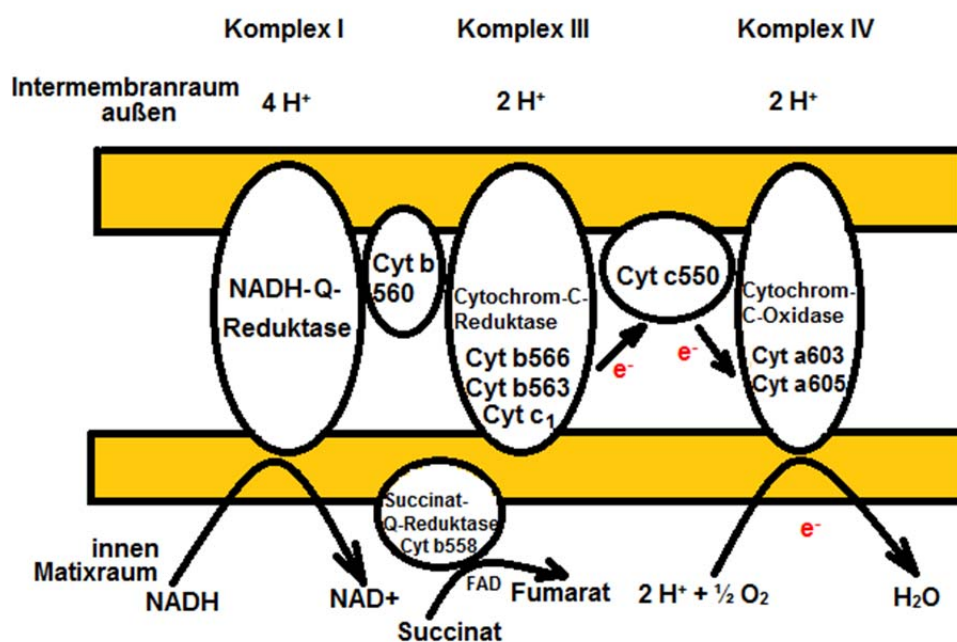


Abbildung 1.9: Die mitochondriale Atmungskette mit ihren Cytochromen.

Die **Cytochrom-c-Oxidase** enthält vier Metallzentren: zwei Kupferzentren (Kupfer a und b) und zwei Häm a Gruppen (Cytochrom a und a₃). Das Cytochrom a des Karotiskörperchens scheint ein außergewöhnliches Cytochrom zu sein. Aufgrund seines Absorptionsverhaltens wird es Cytochrom a₅₉₂ genannt. Es hat eine ausgesprochen niedrige O₂-Bindungsaffinität und ist damit extrem sauerstoffsensibel (Streller et al. 2002, Warncke 2011). Dies führte zu der Annahme, dass das Cytochrom a₅₉₂ als einzigartige Komponente der Cytochrom-c-Oxidase des Karotiskörperchens der Ratte den Elektronenfluss zwischen dem Cu_A und Cytochrom a₃-Cu_B kurz schließen kann und somit als primärer O₂-Sensor fungieren kann (Acker und Acker 2004). Somit wäre die Cytochrom-c-Oxidase des Karotiskörperchens in Bezug auf den Elektronenfluss in Komplex IV sehr spezialisiert: Elektronen könnten direkt vom Cu_A zum Cytochrom a₃-Cu_B fließen, anstatt vom Cu_A-Cytochrom a zum Cytochrom a₃-Cu_B (Abbildung 1.10).

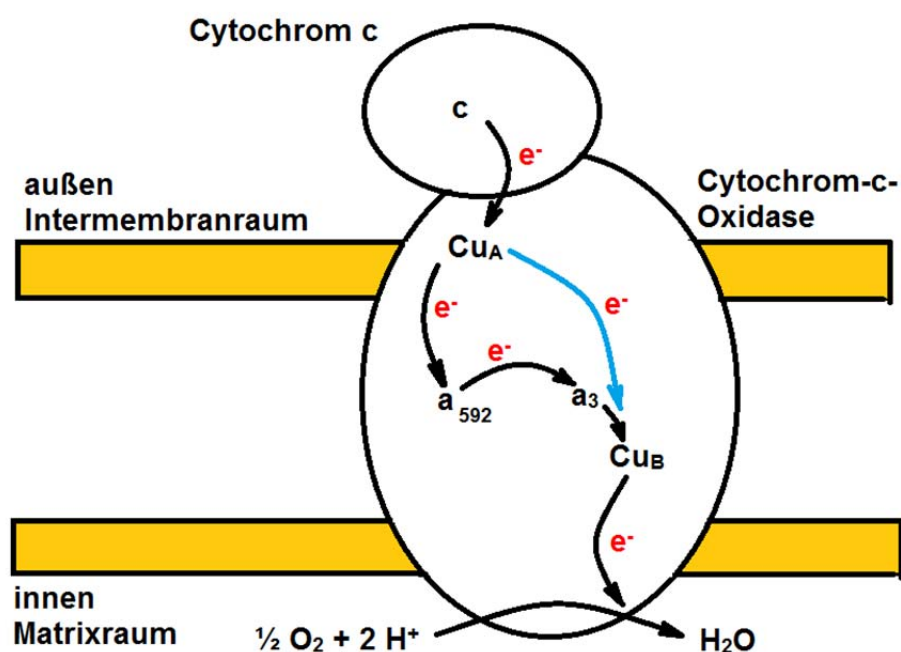


Abbildung 1.10: Der Elektronenfluss in der Cytochrom-c-Oxidase.

Es ist denkbar, dass durch die redoxabhängige Konformationsänderung des Cytochroms a₅₉₂ bei Hypoxie der Protonenfluss über die mitochondriale Membran beeinflusst wird. Das mitochondriale transmembranäre Potential verändert sich und es kommt zur Kalziumfreisetzung aus dem Mitochondrium. Dies könnte der erste

Schritt hin zur Transmitterfreisetzung und Erregung der afferenten Nervendigung sein (Streller et al. 2002, Warncke 2011).

Der eigentliche Sauerstoffsensor im Glomus caroticum der Ratte sowie auch des Menschen ist bis heute nicht bekannt. Somit ist auch seine genaue Lokalisation, die möglicherweise in der Typ-I-Zelle oder auch in der Nervendigung (McDonald und Mitchell 1975) sein könnte, unbekannt. Das besondere Interesse dieser Arbeit gilt der Untersuchung der Cytochrome als Ort des Sauerstoffsensors im Karotiskörperchen der Ratte und zeitgleich der Spikerate des Karotissinusnerven als Ausdruck der Signalweiterleitung durch kalziumabhängige Transmitterfreisetzung.

2 Ziel der Arbeit

Obwohl die Aufrechterhaltung der O₂-Homöostase von fundamentaler Bedeutung für den menschlichen Organismus ist, bleibt die genaue Funktion des wichtigsten Chemosensors für Sauerstoff des Karotiskörperchens bis heute unklar. Weder der Sauerstoffsensor selbst noch seine genaue Lokalisation sind vollständig geklärt.

Zentrales Thema der vorliegenden Dissertation ist es, die Mechanismen des O₂-Sensing weiter zu entschlüsseln und detaillierter zu verstehen, wobei die Suche nach dem Ort des Sauerstoffsensors im Mittelpunkt steht. Ausgehend von dem Mitochondrienmodell der metabolischen Hypothese sind zwei Orte denkbar, an denen Mitochondrien vorkommen: die Typ-I-Zelle und die Endigung des Karotissinusnerven, welche die Synapse bildet.

Auf der Basis der Hämprotein-Hypothese mit Fokussierung auf die Untersuchung der Cytochrome mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie wurden drei Versuchsreihen mit unterschiedlichem Ansatz gewählt: Versuche in Kontrolllösung, Kationenaustauschversuche (Kalzium-Magnesium-Austauschversuche) und Versuche nach vorrausgegangener, dauerhafter Denervierung des Glomus caroticum (Denervierungsversuche).

Alle Hypothesen über den möglichen Sauerstoffsensor und die Signaltransduktion haben trotz ihrer Verschiedenheit eine Gemeinsamkeit: die kalziumvermittelte Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt und infolgedessen die Weiterleitung des Hypoxiesignals auf die Nervendigung. Bei den Kationenaustauschversuchen wurde das Kalzium aus der Superfusionslösung entfernt, um zu zeigen, dass ohne extrazelluläres Kalzium eine Transmitterfreisetzung aus der Glomuszelle nicht möglich und infolgedessen eine hypoxiebedingte Zunahme der Karotissinusnervaktivität nicht messbar ist. Dies wäre ein entscheidender Hinweis dafür, dass der Sauerstoffsensor in der Glomuszelle lokalisiert ist und eine Signalweiterleitung zwischen Glomuszelle und Nervendigung durch kalziumabhängige Transmitterausschüttung über die Synapse stattfindet. Unabhängig vom Ort der Sauerstoffmessung sollten die relativen spektralen Anteile

der Cytochrome bei Hypoxie unbeeinflusst von der Höhe des extrazellulären Kalziumspiegels sein.

Mit Hilfe der Denervierungsversuche sollte die Frage beantwortet werden, ob es einen Unterschied zwischen den relativen spektralen Anteilen einzelner Cytochrome bei den verwendeten Hypoxiestufen bei nicht denervierten (Versuche in Kontrolllösung) und bei zuvor dauerhaft denervierten Karotiskörperchenpräparaten gibt. Wenn sich der Sauerstoffsensor in den Typ-I-Zellen befindet, sind bei hypoxischer Stimulation unveränderte Cytochrommuster unabhängig von der Intaktheit des Karotissinusnerven zu erwarten, da es nach der Denervierung zu einer Degeneration des Nerven und seiner Mitochondrien kommt. Sollten allerdings bei den denervierten Karotiskörperchen keine hypoxietypischen Veränderungen der relativen spektralen Anteile der Cytochrome zu finden sein, wäre dies ein Hinweis dafür, dass der Sauerstoffsensor in der Nervendingung lokalisiert ist.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsmaterial und Präparation

3.1.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Kyoto-Laborratten (WKY) aus der Zucht des Zentralen Tierhauses der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock verwendet. Die Haltung erfolgte im Tierhaus des Institutes für Physiologie in Rostock. Die Tiere wurden in Gruppen bei konstantem 12-stündigen Hell-Dunkel-Regime und ca. 20 °C Raumtemperatur gehalten. Das Futter bestand aus Spezialpellets (ssniff® Futtermittel für Ratten und Mäuse, Soest, Deutschland) und Wasser.

Für die Untersuchungen des Glomus caroticum wurden insgesamt 23 männliche Tiere mit einem Körpergewicht von $292,6 \pm 59,0$ g untersucht. Die Tiere hielten sich schon einige Tage vor der geplanten Operation im Tierhaus des Institutes für Physiologie auf, um sich zu akklimatisieren und vom Transportstress zu erholen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche wurden durch die zuständige Tierversuchskommission beim Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern in Rostock genehmigt und entsprechend dem Tierschutzgesetz durchgeführt.

3.1.2 Versuchslösungen

Zur Versorgung der Karotiskörperchen außerhalb des Tieres wurden drei verschiedene Lösungen verwendet: die Präparationslösung, die Kontrolllösung und die kalziumfreie Versuchslösung.

Zum Spülen der Karotisbifurkation im Tier, zur Präparation und zur schonenden Aufbewahrung der Körperchen wurde eine Locke-Lösung mit einem pH-Wert von 7,28 verwendet (Präparationslösung, Tabelle 3.1). Zur weiteren Schonung der Körperchen wurde nur gekühlte Lösung verwendet. Die Temperatur der Lösung

während der Präparation des Karotiskörperchens betrug 0 °C. Zur Aufbewahrung der Karotiskörperchenpräparate für den Folgeversuch am darauffolgenden Tag wurde diese Lösung mit einer Temperatur von 7 °C verwendet.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Präparationslösung.

NaCl	128 mM
KCl	5,6 mM
Glucose	27,5 mM
Hepes	17 mM
CaCl ₂	2,1 mM
pH	7,28

Zur Versorgung des Glomus caroticum in der Versuchsanordnung wurde ebenfalls eine Locke-Lösung verwendet (Kontrolllösung, Tabelle 3.2). Der pH-Wert der Kontrolllösung wurde durch die Begasung der Lösung mit CO₂ vom pH-Wert 8,4 auf den physiologischen Wert von 7,28 eingestellt.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Kontrolllösung.

NaCl	128 mM
KCl	5,6 mM
Glucose	27,5 mM
Hepes	7 mM
NaHCO ₃	10 mM
CaCl ₂	2,1 mM
pH	8,4

Diese Kontrolllösung wurde bei den Austauschversuchen durch eine kalziumfreie, magnesiumhaltige Versorgungslösung ersetzt (Versuchslösung, Tabelle 3.3). Durch den Austausch von 2,11 mM Kalziumchlorid (CaCl₂) der Kontrolllösung gegen 2,11 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂) in der Versuchslösung, blieb die Molarität der beiden Superfusionslösungen unverändert. Die pH-Werteinstellung auf 7,28 erfolgte genau wie bei der Kontrolllösung durch die Begasung der Versuchslösung mit CO₂.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der kalziumfreien, magnesiumhaltigen Versuchslösung.

NaCl	128 mM
KCl	5,6 mM
Glucose	27,5 mM
Hepes	7 mM
NaHCO ₃	10 mM
MgCl ₂	2,1 mM
pH	8,4

Die benötigten Lösungen wurden aus einer Stammlösung hergestellt (NaCl 75,00 g/l, Glucose 50,00 g/l, bezogen von Fa. Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland; KCl 4,20 g/l, Hepes 16,68 g/l, NaHCO₃ 8,40 g/l, Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

Die Zusammensetzung der Lösungen wurde mit Hilfe eines Blutgasanalysators (AVL 990 von Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Deutschland), eines Gefrierpunktsmometers (Osmomat 030-D von Fa. Gonotec, Berlin, Deutschland) und eines Elektrolytanalysators (AVL ISE Analysator 988-4, AVL LIST GmbH, Graz, Österreich) kontrolliert.

3.1.3 Gasgemische

Der Versorgungslösung des Glomus caroticum in der Versuchsanordnung konnten verschiedene Gase zugesetzt werden. Die Einstellung der Begasung erfolgte über zwei Gasmischpumpen (M301/a-F und M101 von Fa. Wösthoff Messtechnik GmbH, Bochum, Deutschland). Es wurden die Gase Sauerstoff (O₂), Kohlendioxid (CO₂) und Stickstoff (N₂) in verschiedenen Mischungsverhältnissen verwendet.

Tabelle 3.4: Verwendete Gase mit Herstellerangaben.

Gas	Hersteller
Sauerstoff	Sauerstoff medicAL, Fa. Air Liquide Medical GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Stickstoff	Stickstoff, Fa. Air Liquide Medical GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Kohlendioxid	Kohlendioxid medicAL, Fa. Air Liquide Medical GmbH (Düsseldorf, Deutschland)

3.1.4 Behandlung der Tiere zur dauerhaften Denervierung des Karotiskörperchens

Die Narkose der Tiere erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion (Einmal-Kanüle von 21 G, 2 ml-Fertigspritze) von 50 mg Pentobarbital-Natrium pro kg Körpergewicht (Eutha[®] 77: Essex Tierarznei, München, Deutschland). Nach Rasur und Desinfektion des Operationsgebietes wurden die narkotisierten Tiere in Rückenlage mit Hilfe von Klammern und Nahtmaterial auf einem beheizten Kleintieroperationstisch (Fa. Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) gelagert. Der operative Zugang erfolgte über einen medianen Schnitt zwischen Sternum und Kehlkopf der Tiere. Es wurden ausschließlich Karotiskörperchen der rechten Seite denerviert. Mit Hilfe stumpfer Präparationstechniken wurde der rechte N. glossopharyngeus (IX. Hirnnerv) und der sich ihm anlegende Karotissinusnerv (Ramus sinus carotici dex.) dargestellt. Die Präparation der filigranen Strukturen gelang mit Hilfe eines Auflichtmikroskops (60-G121 von Fa. Carl Zeiss Jena, Jena, Deutschland). Nach Durchtrennung des rechten Karotissinusnerven, welche durch eine gute Präparation des Nerven, durch seine Durchtrennung unter Sicht sowie durch ein Nachlassen des durch den sich anlegenden Karotissinusnerv gespannten N. glossopharyngeus sicher gestellt werden konnte, wurde die Wunde mittels einer Intrakutan- und einer Hautnaht verschlossen. Anschließend wurden die Tiere bis zu ihrem Erwachen überwacht und warm gehalten. Nach dem vollständigen Erwachen aus der Narkose, wurden die Tiere zur weiteren Pflege in das Tierhaus des Institutes für Physiologie übergeben.

3.1.5 Narkose, Entnahme und Präparation des Karotiskörperchens

Die Wistar-Kyoto-Ratten wurden mit einem Chloralose-Urethan-Gemisch narkotisiert. Pro Kilogramm Körpergewicht wurden 0,225 g Chloralose und 1,125 g Urethan (Fa. Omikron GmbH, Neckarwestheim, Deutschland) intraperitoneal injiziert (Einmal-Kanüle von 21 G, 2 ml-Fertigspritze). Präoperativ wurde die gewünschte Analgesie des Tieres kontrolliert.

Nach Eintritt der Narkose und Vorbereitung des Operationsgebietes (Rasur und Desinfektion mit 70 %iger Ethanollösung) wurden die Tiere in Rückenlage auf einem geregelt beheizbaren Kleintieroperationstisch (Hugo Sachs Elektronik, March-

Hugstetten, Deutschland) reizarm mit Hilfe von Klammern und Nahtmaterial gelagert. Die Versuchstiere wurden mit einer rektalen Temperaturmesssonde (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) ausgestattet. Über diese wurde der Operationstisch in Abhängigkeit von der Körpertemperatur des Tieres geregelt beheizt. Während der Operation wurde die Körpertemperatur des Tieres bei 37 °C gehalten. Außerdem erfolgte während des Eingriffs eine Dokumentation der Atemfrequenz der Ratte. Neben der Reaktion des Tieres auf Manipulationen diente die Atemfrequenz (Zielbereich 70-100/min) vor allem der Kontrolle der Narkosetiefe. Als erster Operationsschritt erfolgte die Präparation und Katheterisierung der V. jugularis sinistra zur intravenösen Applikation von 1000 I.E. Heparin/kg Körpergewicht (Liquemin® N 25000, Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) über einen Polyethylen-Gefäßkatheter mit einem Innendurchmesser von 1,5 mm.

Der operationstechnische Zugang erfolgte über einen sagittalen Schnitt vom Sternum bis zum Larynx des Tieres. Die Präparation der filigranen Strukturen gelang mit Hilfe eines Auflichtmikroskops (60-G121 von Fa. Carl Zeiss Jena, Jena, Deutschland). Nach der durch die Heparinisierung des narkotisierten Tiers erfolgten systemischen Antikoagulation wurden beide Karotisbifurkationen unter Anwendung von stumpfen und möglichst blutarmen Operationstechniken freipräpariert und dargestellt.

Nach der Euthanasie des nicht beatmeten Tieres mittels einer Überdosis der Urethan-Chloralose-Narkose über den liegenden Jugulariskatheter erfolgte die Katheterisierung der A. carotis communis dexter nach distal und eine großzügige Inzision der A. carotis communis sinistra. Über den durch Nahtmaterial eingebundenen arteriellen Katheter wurden anschließend mit Hilfe von zwei Perfusoren (Perfusor® F, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) ca. 100 ml Präparationslösung infundiert (siehe Kapitel 3.1.2). Die Lösung verließ das Tier größtenteils wieder über die großzügige Inzisionsstelle der A. carotis communis sinistra und wurde dort mit Watteträgern aufgenommen. Dabei war eine deutliche Verarmung der aufgefangenen Flüssigkeit an rotem Blutfarbstoff über die Zeit zu verzeichnen. Die kontinuierliche Spülung der intrakraniellen Gefäße und die vorausgegangene Antikoagulation dienten der Erreichung von Blutfreiheit im Präparat.

Nach Beendigung der Spülung und Durchtrennung des N. glossopharyngeus (IX. Hirnnerv) beiderseits der Einmündung des Karotissinusnervs wurde die gesamte Karotisbifurkation einschließlich des Karotissinusnervs und des Stumpfes des N. glossopharyngeus entnommen und in einer Glasschale mit gekühlter Präparationslösung ($T = 0\text{ °C}$) aufbewahrt. Dort konnte das Präparat mit Hilfe mehrerer Kanülen auf einer angebrachten Gummiunterlage optimal fixiert werden. Nach nochmaliger Spülung des Präparates über den mit entnommenen Karotiskatheter (ca. 250 ml), welche der Elimination von eventuell noch in dem Gefäßnetz des Glomus caroticum vorhandenem Blut diente, wurden dasselbe und der Karotissinusnerv möglichst schonend präpariert (Abbildung 3.1).

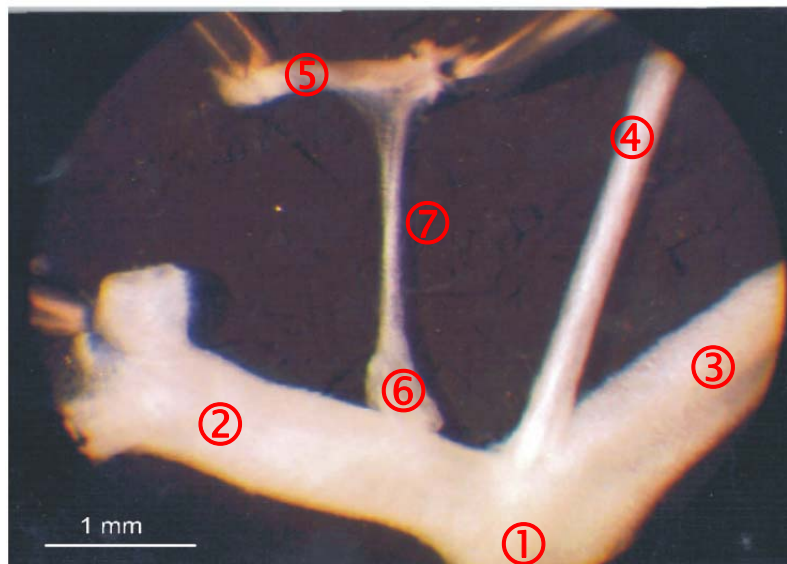


Abbildung 3.1: Foto der präparierten Karotisbifurkation einer Wistar-Kyoto-Laborratte bei 15facher Vergrößerung: ① A. carotis communis, ② A. carotis interna, ③ A. carotis externa, ④ A. occipitalis, ⑤ N. glossopharyngeus, ⑥ Glomus caroticum und ⑦ Ramus sinus carotici (Bildquelle: Arbeitsgruppe Huckstorf).

Diese Feinpräparation erfolgte in gekühlter Präparationslösung ($T = 0\text{ °C}$) mit Hilfe eines Auflichtmikroskops (Stereomikroskop Technival 2, Fa. Carl Zeiss Jena, Jena, Deutschland) und einer Kaltlichtquelle (KL 1500 electronic, Fa. Schott, Deutschland), die das gekühlte Präparat ohne wärmewirksame Infrarotanteile gleichmäßig und lichtstark ausleuchtete. Als Leitstruktur diente die Bifurkation der A. carotis communis. Nach schrittweiser Entfernung der umgebenden bindegewebigen Strukturen gelang eine Darstellung des Glomus caroticum und des

Karotissinusnerven. Anschließend wurde der Nerv kurz vor der Einmündung ins Glomus caroticum durchtrennt (Abbildung 3.2).



Abbildung 3.2: Das präparierte Karotiskörperchen mit dem Stumpf des Karotissinusnerven kurz vor dem Einsetzen in die Messkammer (Bildquelle: Arbeitsgruppe Huckstorf).

Auf diese Weise wurden pro Versuchstier nacheinander beide Karotisbifurkationen entnommen und präpariert.

3.2 Versuchsaufbau und Messprinzipien

3.2.1 Aufbau der Messeinrichtung

Die Messkammer (Abbildung 3.3 und 3.4) funktionierte nach dem Prinzip einer Durchflussskammer. Sie war mit einem Zulauf, dem ein Reservoir vorgeschaltet war, und einem Ablauf versehen. Die Messkammer wurde von Locke-Lösung (Superfusionslösung) durchflossen (pH = 7,2; T = 37 °C, Fließgeschwindigkeit 60 ml/min).

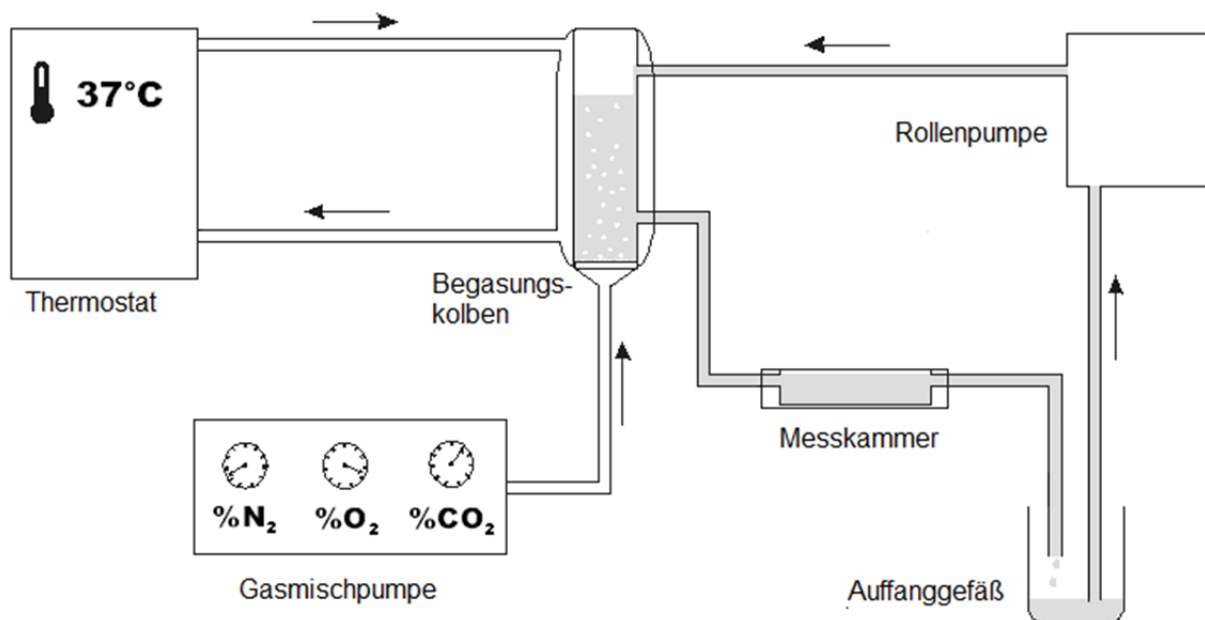


Abbildung 3.3: Aufbau des Superfusionskreislaufes (grau) (Streller 2000).

Die Superfusionslösung stammte aus dem Begasungskolben. Dieser war ein doppelwandiger Zylinder und diente als Reservoir für die Superfusionslösung. Neben der Begasung der Lösung erfolgte dort über einen Thermostaten auch deren konstante Temperierung von 37 °C.

Die Begasung der Superfusionslösung mit O_2 , CO_2 und N_2 war über zwei Gasgemischpumpen (M301/1a-F und M101 der Fa. Wösthoff Messtechnik GmbH, Bochum, Deutschland) frei einstellbar. Die erste Gasgemischpumpe stellte das nach Protokoll geforderte Gasgemisch von O_2 und N_2 sicher. Die zweite Pumpe fügte dem Gasgemisch konstant 4% CO_2 zu. Das eingestellte Gasgemisch durchperlte die

Flüssigkeit des Begasungskolbens von unten durch einen Filter. Der pH-Wert der Superfusionslösung wurde durch die Begasung mit 4% CO₂ auf einen Wert von 7,2 eingestellt.

Ausgehend von dem Begasungskolben wurde die begaste und erwärmte Superfusionslösung in die Messkammer geleitet. Von der Messkammer floss die Lösung in ein Auffanggefäß, von welchem sie über PVC-Schläuche und eine Rollpumpe in den beheizten Begasungskolben zurückgeführt wurde. Diese Rollpumpe stellte die kontinuierliche Förderung der Superfusionslösung sicher. Um eine möglichst kontinuierliche Flussrate zu erreichen, wurde zusätzlich ein Niveauunterschied zwischen Begasungskolben und Messkammer sowie eine zwischengeschaltete Drossel verwendet.

Neben dem Zu- und Ablauf für die Superfusionslösung war darüber hinaus ein Überlaufbehälter an der Messkammer installiert, welcher den Übertritt von Superfusionslösung auf den Kondensator des Durchlichtmikroskops (Olympus, Hamburg, Deutschland) verhinderte.

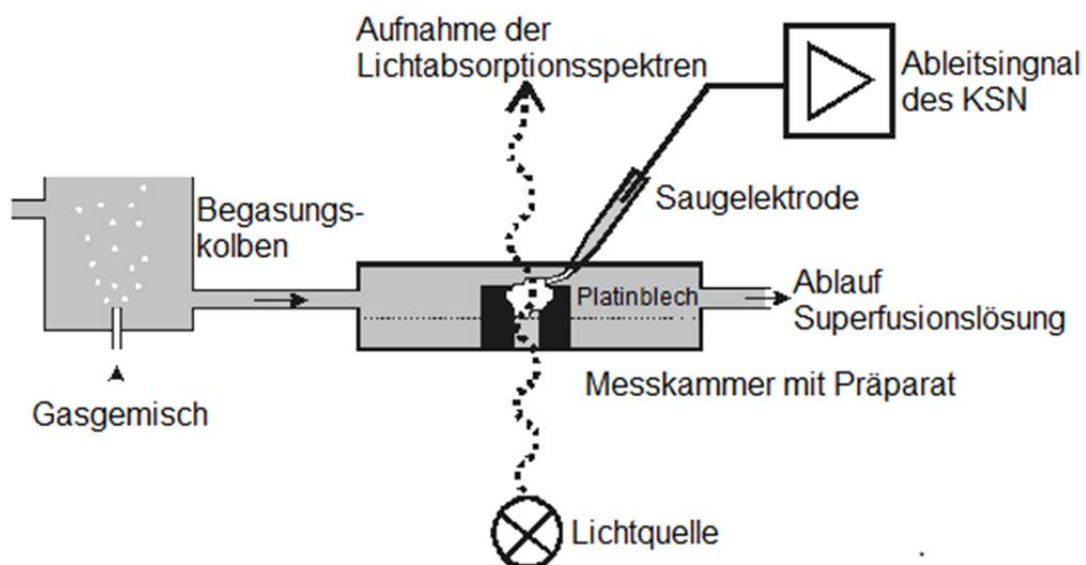


Abbildung 3.4: Schematischer Aufbau der Messkammer (Streller 2000).

Zum Schutz vor äußeren Störsignalen wurde die Messkammer samt des Durchlichtmikroskops (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit einem Faraday-Käfig (33 x 28 x 50 cm, Selbstbau der Arbeitsgruppe Prof. Acker, Darmstadt, Deutschland) umgeben.

Das präparierte Glomus caroticum (Präparatgröße ca. 0,5 - 0,8 mm) und der kurz vor der Einmündung ins Körperchen durchtrennte Karotissinusnerv wurden in der Messkammer zur Aufnahme der Absorptionsspektren und Ableitung des Summenaktionspotentials platziert. Dazu wurde der Karotissinusnerv mittels Unterdruck in eine Glaselektrode (Glaskapillaren GB150T-8P, mittels Pipetten-Puller konisch geformt von Fa. Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland; Pipetten-Puller 700C von Fa. David Kopf Instruments, Tujunga, USA) eingesaugt und so das Karotiskörperchen mit dem Nerven in der Messkammer fixiert. Am Boden der lichtdurchlässigen Messkammer befand sich ein Platinblech mit kreisrunden Löchern unterschiedlicher Größe. Das präparierte Karotiskörperchen wurde zu Fixierzwecken in ein Loch passender Größe abgelegt (Abbildung 3.5). Gleichzeitig diente das Loch als Lichtblende für die Durchlichtmikroskop-Spektrometer-Konfiguration.

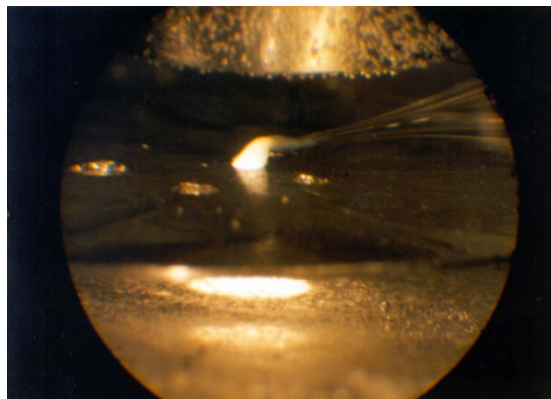


Abbildung 3.5: Das Karotiskörperchen mit dem in der Glaselektrode eingesaugten Karotissinusnerv wurde in einem Loch mit passendem Durchmesser auf dem Platinblech in der Messkammer fixiert (Bildquelle: Arbeitsgruppe Huckstorf).

Durch diesen Versuchsaufbau konnten am isolierten superfundierten Karotiskörperchen gleichzeitig die Karotissinusnervaktivität und die Lichtabsorptionsspektren unter Normal- und Versuchsbedingungen bestimmt werden.

3.2.2 Aufnahme und Aufbereitung der Messgrößen

3.2.2.1 Registrierung der Absorptionsspektren und Differenz-Absorptionsspektren des Karotiskörperchen-Gewebes

Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einer Durchlichtmikroskop-Photospektrometer-Konfiguration.

Weißes Licht einer Halogenlampe (OSRAM, 12 V, 100W), welches das Karotiskörperchen jede Minute 10 Sekunden lang durchstrahlte, wurde über Spiegel und Kollimator in ein Durchlichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) fokussiert. Der Lichtstrahl passierte zuerst die Platinblende mit dem Karotiskörperchen, bevor er ins Objektiv (40 fache Vergrößerung) des Mikroskops einfiel. Anschließend gelangte das Licht über einen Lichtleiter zu einem Gitterspektrometer (MCS 210 von Fa. Zeiss, Jena, Deutschland).

Zur Aufnahme eines Spektrums wurden innerhalb einer einstellbaren Integrationszeit im Spektrometer an 512 lichtempfindlichen Dioden-Kondensator-Elementen Ladungsdifferenzen erzeugt. Jedes Element reagiert auf Licht einer bestimmten Wellenlänge im Bereich von 300 bis 800 nm. Die Entladungsdifferenz ist dabei proportional zur Lichtstärke des zugehörigen Wellenlängenintervalls. Die gemessenen Ladungsdifferenzen wurden über eine Schnittstelle an einen Rechner weitergegeben und als Extinktion $I(\lambda)$ gespeichert.

Da bereits ohne Lichteinfall kleinere Ladungsdifferenzen auftraten, die sogenannten Dunkelströme $I_{off}(\lambda)$, mussten diese von den Extinktionsströmen subtrahiert werden. Vor Aufnahme einer Spektralserie wurden demzufolge zunächst die Dunkelströme $I_{off}(\lambda)$ gemessen. Das korrigierte Extinktionsspektrum ergab sich durch die Differenz aus Extinktions- und Dunkelströmen. Anschließendes Logarithmieren führte zum Transmissionsspektrum $T(\lambda)$.

Die Beurteilung eines einzelnen Transmissionsspektrums $T(\lambda)$ war allerdings wenig aussagekräftig, denn die durch Redoxvorgänge bewirkten charakteristischen Absorptionsdifferenzen der Zellkomponenten des Glomus caroticum waren nur sehr gering ausgeprägt. Der größte Teil der so gemessenen Absorptionsdifferenzen war redoxunabhängig und wurde von den normalen Absorptionseigenschaften des Zellgewebes bestimmt. Um die redoxabhängigen Veränderungen im Absorptionsverhalten des Glomus caroticum zu registrieren, musste vor jeder

Stimulation ein Ausgangs- oder Referenzspektrum $T_0(\lambda)$ aufgenommen und gespeichert werden. Dieses Referenzspektrum $T_0(\lambda)$ wurde von den folgenden Messspektren subtrahiert.

Die Aufnahme des Referenzspektrums $T_0(\lambda)$ erfolgte stets unter aeroben Bedingungen (28,8% O₂, 4% CO₂ und 67,2% N₂). Das redoxabhängige Spektrum ergab sich also aus der Formel:

$$S(\lambda) = T(\lambda) - T_0(\lambda) = \log \frac{I(\lambda) - I_{\text{off}}(\lambda)}{I_0(\lambda) - I_{\text{off}}(\lambda)}$$

$S(\lambda)$	Differenzabsorptionsspektrum
$T(\lambda)$	Transmissionsspektrum
$T_0(\lambda)$	Referenzspektrum
$I(\lambda)$	Extinktion des Transmissionsspektrums
$I_0(\lambda)$	Extinktion des Referenzspektrums
$I_{\text{off}}(\lambda)$	Extinktion des Dunkelstroms

Die so ermittelten Differenzabsorptionsspektren $S(\lambda)$ enthielten somit nur noch die Information über den gegenüber dem Referenzzeitpunkt veränderten Redoxzustand der Cytochrome.

3.2.2.2 Messung der Aktivität des Karotissinusnerven

Die Erfassung der Karotissinusnervaktivität erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde die Spikerate an einer Elektrode abgeleitet. Anschließend wurde das elektrische Ableitsignal in ein geeignetes Aktivitätsmaß umgewandelt.

Die afferenten Chemorezeptor-Entladungen des gesamten Karotissinusnerven wurden mit Hilfe einer Saugelektrode abgeleitet. Die Saugelektrode, welche eine dünn ausgezogene, ca. 40 mm lange Glaspipette mit einem Öffnungsinwendurchmesser von ca. 100 µm war, wurde vor Versuchsbeginn mit Locke-Lösung gefüllt. Mit Hilfe eines Mikromanipulators (3D von Fa. Narishige, Tokio, Japan) wurde die Öffnung der Glaskapillare so in der Messkammer platziert, dass sie Kontakt zum Stumpf des Karotissinusnerven hatte. Mit einer Vakuumpumpe (MP 601 E von Fa. Saskia Hochvakuum GmbH, Dresden, Deutschland) wurde in der Glaspipette ein Unterdruck erzeugt und der Stumpf des Karotissinusnerven so eingesaugt, dass er die Saugelektrode abdichtete (Abbildung 3.6). Der erzeugte Unterdruck wurde über ein Dreiwegesystem fixiert und konnte durch eine Hamilton-

Spritze geringfügig verändert werden. Bei dieser Ableittechnik handelte es sich um eine Massenableitung der Aktionspotentiale aller eingesaugten Axone des Karotissinusnerven.

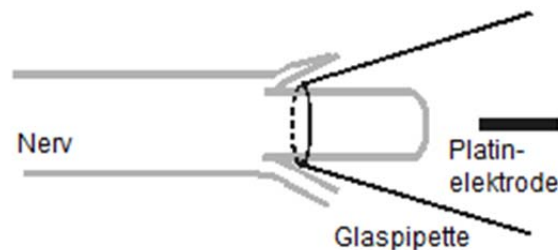


Abbildung 3.6: Saugelektrode mit eingesaugtem Karotissinusnerven (Streller 2000).

Das aufgenommene Ableitsignal wurde in ein Spikerate-Aktivitätsmaß transformiert (Abbildung 3.7). Dazu wurde das Nervensignal verstärkt (Faktor 700, Differenzverstärker DAM-5A von Fa. World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) und gefiltert (Band Filter 10 Hz - 1,3 kHz, BP-Filter 3750 von Fa. Krohn-Hite, Brockton, USA). Entladungsspitzen wurden durch einen Fensterdiskriminator (Typ 121 Window Discriminator von Fa. World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) extrahiert und die Spikes pro Sekunde gezählt. Die untere Grenzspannung des Fensterdiskriminators wurde oberhalb des Rauschpegels des Ableitsignals festgelegt, während die obere Grenzspannung das Doppelte der maximalen Amplitude des Ableitsignals betrug.

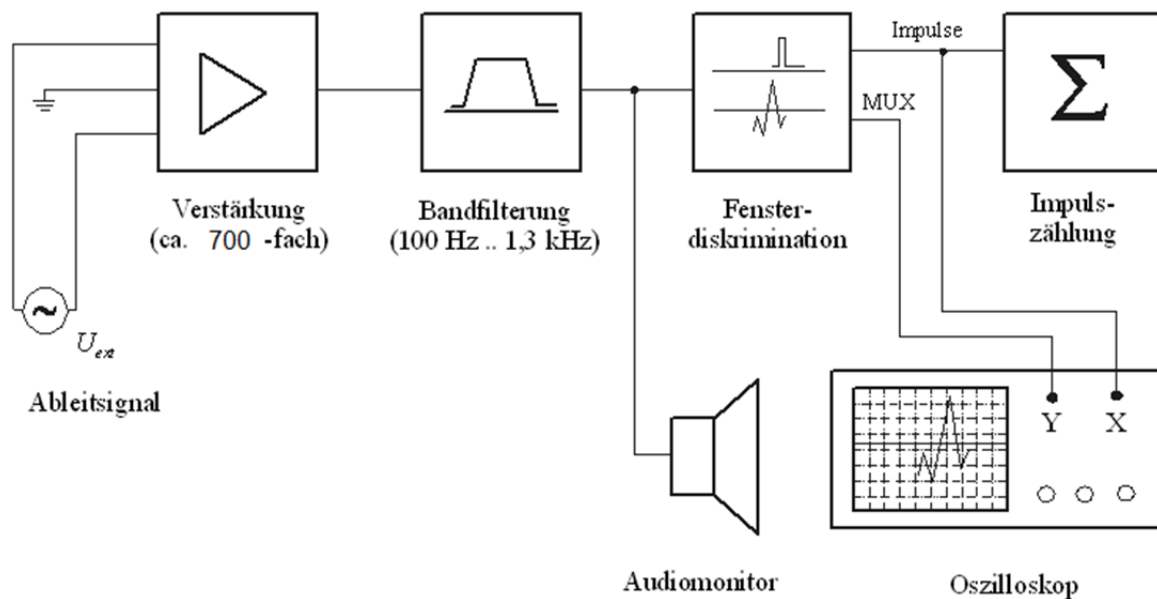


Abbildung 3.7: Bestimmung der Nervenaktivität als Spikerate. Bei der Fensterdiskrimination wird neben dem Spike-Impulssignal ein Multiplexsignal (MUX) erzeugt, in welchem das Ableitsignal (U_{ext}) und die untere bzw. obere Grenzspannung des Diskriminators ausgegeben werden (Streller 2000).

Die sekundenweise Impulszählung (Spikerate) war während der Versuche auf einem Audiomonitor (Hitachi Stereo Amplifier HA-3900 von Fa. Hitachi Consulting Germany GmbH, Dreieich, Deutschland) und einem Oszilloskop (TDS 210 von Fa. Tektronik GmbH, Köln, Deutschland) beobachtbar. Sie wurde erfasst, visualisiert und als Zeitreihe in einer Textdatei gespeichert. Die Spikerate pro Sekunde wurde als afferentes Chemorezeptorsignal gewertet.

3.2.3 Veränderungen der Eigenschaften der Versorgungslösung

3.2.3.1 Variation der Gaspartialdrücke in der Versorgungslösung

Die Begasung der Versorgungslösung des Karotiskörperchens in der Versuchsanordnung mit O_2 , CO_2 , und N_2 war mit Hilfe von zwei Gasmischpumpen (M301/1a-F und M101 von Fa. Wösthoff Messtechnik GmbH, Bochum, Deutschland) frei einstellbar. Unter aeroben Versuchsbedingungen wurde die Superfusionslösung mit 28,8% O_2 , 4% CO_2 und 67,2% N_2 begast. Das entsprach einem Sauerstoffpartialdruck von 220 mmHg.

Die zugesetzte Sauerstoffkonzentration bei den Hypoxieversuchen variierte zwischen 0%, 5% und 10% O_2 und sollte so zu einer Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes in

der Superfusionslösung auf ungefähr 50, 70 beziehungsweise 100 mmHg führen. Simultan zur herabgesetzten Sauerstoffzufuhr erfolgte eine Erhöhung der Stickstoffbegasung der Lösung. Die Zusammensetzung des hypoxischen Gasgemisches wurde für jeweils fünf Minuten konstant gehalten. Anschließend erfolgte eine Änderung der Begasung zurück zu den aeroben Versuchsbedingungen. Die CO₂-Konzentration blieb während der Versuche stets unverändert bei 4%.

Durch regelmäßige Analysen der Superfusionslösung der Messkammer mit einem Blutgasanalysator (AVL 990 von Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Deutschland) wurde die korrekte Einstellung des Gasgemisches überwacht. Mit diesem Gerät wurden pH, pCO₂ und pO₂ bestimmt. Diese Analysen wurden routinemäßig vor dem Einsetzen des Glomus caroticum in die Messkammer, vor Beginn eines Versuches und nach einer Änderung des Gasgemisches durchgeführt.

3.2.3.2 Veränderung der Elektrolytzusammensetzung der Versorgungslösung

Zur Versorgung des Karotiskörperchens in der Versuchsanordnung wurden zwei Superfusionslösungen unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet (siehe Kapitel 3.1.2). Der Lösungswechsel zwischen der kalziumhaltigen (Kontrolllösung) und der kalziumfreien Locke-Lösung (Versuchslösung) erfolgte durch mehrfaches Aussaugen und Wiederbefüllen des Vorratsgefäßes unter Konstanthaltung physiologisch wichtiger Größen der Superfusionslösung (z.B. pH oder Osmolarität).

Die Kontrolle der Elektrolytzusammensetzung der Superfusionslösung erfolgte durch regelmäßige Probenentnahmen aus der Messkammer mit Hilfe eines Elektrolytanalysators (AVL ISE Analysator 988-4, AVL LIST GmbH, Graz, Österreich). Mit diesem Gerät wurden Na⁺, K⁺, Ca²⁺ und Ca²⁺ bei pH 7,4 bestimmt. Die Osmolarität der Superfusionslösung wurde mit einem Gefrierpunktosmometer (Osmomat 030-D von Fa. Gonotec, Berlin, Deutschland) kontrolliert.

3.3 Versuchsablauf

3.3.1 Äquilibration des Präparates an die Versuchsbedingungen

Bevor das präparierte Karotiskörperchen in die Messkammer eingesetzt werden konnte, musste sich die Superfusionslösung auf für die Ratte physiologische Werte eingestellt haben. Direkt vor dem Einsetzen des Karotiskörperchens wurden die Anfangsbedingungen (aerobischer steady state: Begasung mit 28,8% O₂, 4% CO₂ und 67,2% N₂) mit Hilfe des Gasanalysators (AVL 990, AVL LIST GmbH, Graz, Österreich) kontrolliert und dokumentiert.

Der erste Versuch war frühestens eine halbe Stunde nach dem Einsetzen des Karotiskörperchens möglich. Diese Zeitspanne war nötig, damit sich das Körperchen an die neuen Umgebungsbedingungen adaptieren konnte. Durchschnittlich hatten die Präparate eine Akklimatisationszeit von 45 bis 60 Minuten. Danach und direkt von dem Beginn der ersten Versuchsreihe wurden erneut Kontrollen der Elektrolytzusammensetzung und des pH-Wertes der Versorgungslösung durchgeführt.

3.3.2 Hypoxieversuche

Die Hypoxieversuche wurden über einen Zeitraum von fünf Minuten mit einer zugeführten Sauerstoffkonzentration von 0%, 5% oder 10% durchgeführt. Simultan zur herabgesetzten Sauerstoffzufuhr erfolgte eine Erhöhung der Stickstoffbegasung der Lösung. Während des Versuches wurden im Minutenabstand Absorptionsspektren aufgenommen. Die Spikerate wurde kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet.

Die Reihenfolge der verwendeten Sauerstoffkonzentrationen wurde von Versuchsablauf zu Versuchsablauf variiert.

Tabelle 3.5: Versuchsablauf bei Hypoxieversuchen mit beispielhafter zeitlicher Reihenfolge und entsprechenden Gasgemischen der Superfusionslösung.

Versuchsablauf	Zeit (min)	Begasung der Superfusionslösung
Initiale Äquilibration der Kontrolllösung unter aerober Begasung	30 - 40	28,8% O ₂ , 67,2% N ₂ , 4% CO ₂
Einsetzen des Glomus caroticum in die Messkammer	5 - 10	28,8% O ₂ , 67,2% N ₂ , 4% CO ₂
Adaptation des Glomus caroticum	30 - 45	28,8% O ₂ , 67,2% N ₂ , 4% CO ₂
Erste hypoxische Stimulation mit 0% O ₂	5	0% O ₂ , 96,0% N ₂ , 4% CO ₂
Erneute Äquilibration unter aerober Begasung	30	28,8% O ₂ , 67,2% N ₂ , 4% CO ₂
Zweite hypoxische Stimulation mit 10% O ₂	5	10% O ₂ , 86,0% N ₂ , 4% CO ₂
Erneute Äquilibration unter aerober Begasung	30	28,8% O ₂ , 67,2% N ₂ , 4% CO ₂
Dritte hypoxische Stimulation mit x% O ₂	5	x% O ₂ , x% N ₂ , 4% CO ₂

3.3.3 Kalzium-Magnesium-Austauschversuche mit Hypoxie

Der Lösungswechsel zwischen der kalziumhaltigen, magnesiumfreien Locke-Lösung (Kontrolllösung) und der kalziumfreien, magnesiumhaltigen Versuchslösung der Austauschversuche erfolgte durch mehrfaches Aussaugen und erneutes Befüllen des Vorratsgefäßes. Dabei wurden durchschnittlich 600 ml Lösung gewechselt. Gleichzeitig erfolgte eine temporäre Erhöhung der Begasung mit CO₂. Während des Lösungswechsels wurden regelmäßig Probeentnahmen aus der Messkammer durchgeführt, um u.a. die Konzentration der Kalziumionen (AVL ISE Analysator 988-4, AVL LIST GmbH, Graz, Österreich) und die Osmolarität (Osmomat 030-D von Fa. Gonotec, Berlin, Deutschland) zu kontrollieren.

Auch hier wurde die Reihenfolge der verwendeten Sauerstoffkonzentrationen von Versuchsablauf zu Versuchsablauf variiert.

Tabelle 3.6: Versuchsablauf der Kalzium-Magnesium-Austauschversuche mit beispielhafter zeitlicher Reihenfolge und entsprechenden Gasgemischen der Superfusionslösung.

Versuchsablauf	Zeit (min)	Begasung der Superfusionslösung
Initiale Äquilibration der Kontrolllösung unter aerober Begasung	30 - 40	28,8% O ₂ , 67,2% N ₂ , 4% CO ₂
Einsetzen des Glomus caroticum in die Messkammer	5 - 10	28,8% O ₂ , 67,2% N ₂ , 4% CO ₂
Adaptation des Glomus caroticum	30 - 45	28,8% O ₂ , 67,2% N ₂ , 4% CO ₂
Erste hypoxische Stimulation mit 0% Sauerstoff in Kontrolllösung	5	0% O ₂ , 96,0% N ₂ , 4% CO ₂
Wechsel der Lösung und erneute Äquilibration unter aerober Begasung	30	28,8% O ₂ , 67,2% N ₂ , 4% CO ₂
Zweite hypoxische Stimulation mit 0% Sauerstoff in kalziumfreier Versuchslösung	5	0% O ₂ , 96,0% N ₂ , 4% CO ₂
Wechsel der Lösung und erneute Äquilibration unter aerober Begasung	30	28,8% O ₂ , 67,2% N ₂ , 4% CO ₂
Dritte hypoxische Stimulation mit 0% Sauerstoff in Kontrolllösung	5	0% O ₂ , 96,0% N ₂ , 4% CO ₂

3.4 Auswertung der Messgrößen

3.4.1 Dekonvolution der Absorptionsspektren

Die aufgezeichneten Differenzabsorptionsspektren wurden mit Hilfe des Softwareprogramms TechPlot 3.0 (Fa. Dr. Dittrich, Braunschweig, Deutschland) ausgewertet. TechPlot ist ein Grafikprogramm, mit dem Datensätze in einem Koordinatensystem dargestellt werden können. Nach Dekonvolution (Spektrenentfaltung) und Curvefitting (Bandenseparation) in dem von uns untersuchten Wellenlängenbereich von 510 bis 630 nm, erfolgte die Ausgabe der Analysedaten in einer Listingdatei. Alle Listingdateien eines Versuches wurden zusammen in einem Textdokument gespeichert, von welchem sie in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel Tabellenkalkulation) transferiert werden konnten.

Auf diese Weise wurden die aufgezeichneten Differenzabsorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 510 bis 630 nm mathematisch in die Redoxspektren der fünf folgenden Cytochrome zerlegt: die mitochondrialen Cytochrome c_{550} , b_{563} , die Cytochrom-c-Oxidase (CCO) mit Cytochrom a_{3603} und Cytochrom a_{592} (Streller et al. 2002) sowie das nichtmitochondriale Cytochrom b_{558} der NADPH-Oxidase. Diese fünf Differenzspektren wurden auf 1,0 normalisiert und anschließend in ihrer Größe so verändert, dass ihre Summe bei jeder Wellenlänge so stark wie möglich mit dem Gesamtspektrum korrespondierte. So konnte ein absoluter Wichtungsfaktor für jedes Cytochrom ermittelt werden, welcher den Beitrag jedes Cytochroms zum Gesamtspektrum beschrieb (spektrale Dekonvolution oder Entfaltung).

3.4.2 Ermittlung der relativen spektralen Anteile einzelner Cytochrome

Die absoluten Gewichte der fünf Cytochrome eines Versuches sowie deren Chi-Quadrat-Verteilung wurden in einem Textdokument gespeichert, von welchem aus sie anschließend zur Berechnung und grafischen Darstellung der relativen Spektralgewichte mit Hilfe von Microsoft Excel genutzt werden konnten.

Dazu wurde zuerst die Summe der absoluten Spektralgewichte aller fünf Cytochrome einer Messung gebildet. Dann wurde der relative Anteil der einzelnen Cytochrome von dieser Summe berechnet (relative Spektralgewichte). Die relativen Spektralgewichte eines Cytochroms einer aufgenommenen Spektralserie wurden anschließend gemittelt und zusammen mit der Standardabweichung in Prozent angegeben.

Die Ermittlung der relativen Spektralgewichte in Prozent, welche unabhängig von der Gesamtgröße des Spektrums sind, war die Voraussetzung dafür, verschiedene Spektren unterschiedlicher Versuche miteinander vergleichen zu können.

3.4.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Zur statistischen Auswertung der spektralen Reaktion der Karotiskörperchen-Präparate wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse ($P < 0,05$, IBM SPSS Statistics Version 20) verwendet.

Als abhängige Variablen wurden die relativen Spektralgewichte der fünf Cytochrome definiert. Für diese sollte der Einfluss der beiden Faktoren Hypoxiestufe und Versuchsreihe untersucht werden. Der Faktor Hypoxiestufe kann drei verschiedene Faktorstufen annehmen: 50 mmHg, 70 mmHg und 100 mmHg Sauerstoffpartialdruck in der Superfusionslösung. Der Faktor Versuchsreihe kann ebenfalls drei verschiedene Faktorstufen annehmen: Präparate in Kontrolllösung, Präparate in kalziumfreier Versuchslösung und denervierte Präparate in Kontrolllösung. Zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen den Faktorenstufen wurde der Post-hoc-Test Tukey (IBM SPSS Statistics Version 20) verwendet.

3.4.4 Auswertung der Karotissinusnerv-Aktivität

Die Erfassung, Visualisierung und Datenspeicherung der Spikerate (sekundenweise Impulzzählung) des Karotissinusnerven erfolgte in einer Textdatei, so dass eine Darstellung der Rate an Aktionspotentialen über die Zeit (Stimulationsdauer) möglich war. Die Spikerate pro Sekunde wurde als afferentes Chemorezeptorsignal gewertet. Die Aufnahme der afferenten Reaktion des Karotissinusnerven erfolgte bei allen Versuchen. Bei Versuchsreihen, bei denen von keiner nervalen Reaktion ausgegangen werden konnte (z.B. den Denervierungsversuchen), erfolgte die Aufnahme der Nervaktivität zu Kontrollzwecken.

4 Ergebnisse

4.1 Angaben zu den Versuchstieren

Die für die Untersuchungen am Glomus caroticum verwendeten Versuchstiere wiesen folgende Daten auf:

Tabelle 4.1: Daten aller ausgewählten Tiere.

Tierdaten aller Versuchsreihen	
Anzahl untersuchter Tiere	23
Rasse	Wistar-Kyoto-Laborratten
Geschlecht	Männlich
Gewicht (g)	292,6 ± 59,0

Insgesamt wurde 23 Tiere der Rasse Wistar-Kyoto-Ratte (WKY) untersucht. Alle untersuchten Tiere waren männlich. Sie wiesen ein mittleres Gewicht von 292,6 ± 59,0 g auf.

Die Tabelle 4.2 zeigt die Verteilung der verwendeten Tiere auf die drei Versuchsreihen. Die fünf Versuchstiere aus der Versuchsreihe mit kalziumfreier Versuchslösung sind identisch mit fünf Tieren der Versuchsreihe mit Kontrolllösung.

Tabelle 4.2: Daten der ausgewählten Tiere getrennt nach Versuchsreihen.

	Versuche mit Kontrolllösung	Versuche mit kalziumfreier Versuchslösung	Versuche nach vorausgegangener Denervierung des CB
Anzahl untersuchter Tiere	11	5	12
Rasse	Wistar-Kyoto- Laborratten	Wistar-Kyoto- Laborratten	Wistar-Kyoto- Laborratten
Geschlecht	Männlich	Männlich	Männlich
Gewicht (g)	282,7 ± 65,1	280,0 ± 94,3	301,7 ± 54,1

Tabelle 4.3: Angaben zu den Versuchstieren, welche für die Kationenaustauschversuche mit kalziumhaltiger Kontrolllösung am Glomus caroticum verwendet wurden.

Nr.	Tierstamm	Geschlecht	Körpergewicht (g)	CB-Seite
1	WKY	Männlich	270	R und L
2	WKY	Männlich	210	R und L
3	WKY	Männlich	210	L
4	WKY	Männlich	270	R
5	WKY	Männlich	250	R
6	WKY	Männlich	280	L
7	WKY	Männlich	440	R
8	WKY	Männlich	260	R
9	WKY	Männlich	320	R
10	WKY	Männlich	340	L
11	WKY	Männlich	260	L

Die Versuchstiere für die Untersuchungen am Glomus caroticum in kalziumhaltiger Kontrolllösung waren im Mittel $282,7 \pm 65,1$ g schwer. Es wurden Karotiskörperchenpräparate der rechten und linken Seite verwendet. Diese verteilten sich auf sieben Präparate der rechten und sechs Präparate der linken Seite. Von zwei Versuchstieren konnte sowohl das rechte als auch das linke Karotiskörperchenpräparat verwendet werden.

Tabelle 4.4: Angaben zu den Versuchstieren, welche für die Kationenaustauschversuche mit kalziumfreier Versuchslösung am Glomus caroticum verwendet wurden.

Nr.	Tierstamm	Geschlecht	Körpergewicht (g)	CB-Seite
1	WKY	Männlich	270	R und L
2	WKY	Männlich	440	R
3	WKY	Männlich	270	R
4	WKY	Männlich	210	L
5	WKY	Männlich	210	L

Die Versuchstiere, an deren Karotiskörperchenpräparaten Untersuchungen mit kalziumfreier Versuchslösung durchgeführt wurden, waren im Mittel $280,0 \pm 94,3$ g schwer. Es wurden Karotiskörperchenpräparate beider Seiten verwendet, wobei die Anzahl mit drei zu drei Präparaten pro Seite ausgeglichen war. Bei einem Versuchstier war die Verwendung beider Karotiskörperchenpräparate möglich.

Tabelle 4.5: Angaben zu den Versuchstieren, welche für die Denervierungsversuche am Glomus caroticum verwendet wurden.

Nr.	Tierstamm	Geschlecht	Körpergewicht (g)	CB-Seite	Zeit zw. Denervierung und Versuch (d)
1	WKY	Männlich	230	R	26
2	WKY	Männlich	300	R	19
3	WKY	Männlich	350	R	11
4	WKY	Männlich	300	R	17
5	WKY	Männlich	270	R	13
6	WKY	Männlich	230	R	11
7	WKY	Männlich	340	R	7
8	WKY	Männlich	400	R	6
9	WKY	Männlich	340	R	5
10	WKY	Männlich	230	R	15
11	WKY	Männlich	300	R	19
12	WKY	Männlich	330	R	12

Zwischen der operativen Durchtrennung des Karotiskörperchennerven und dem Versuch verging im Mittel ein Zeitraum von $13,4 \pm 6,2$ Tagen. Die Tiere wiesen ein mittleres Körpergewicht von $301,7 \pm 54,1$ g auf. Es wurden ausschließlich Karotiskörperchennerven der rechten Seite denerviert und somit nur Präparate dieser Seite verwendet.

4.2 Gas-Äquibrierungscharakteristik der Superfusionslösung

Die zugesetzte Sauerstoffkonzentration bei den Hypoxieversuchen variierte zwischen 0%, 5% und 10% O₂ und führte so zu einer Abnahme des Sauerstoffpartialdruckes in der Superfusionslösung. In der Tabelle 4.6 werden die gemessenen Werte in der Superfusionslösung für den pO₂, den pCO₂ und den pH für alle Versuchsreihen in Kontrolllösung als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die Gas-Äquibrierungscharakteristika der Superfusionslösung der Versuche mit kalziumfreier Versuchslösung und der Versuche nach vorausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven sind in den Tabellen 4.7 und 4.8 angegeben.

Tabelle 4.6: Der gemessene Sauerstoffpartialdruck (pO_2), Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) und pH als Mittelwert mit Angabe der Standardabweichung in der Superfusionslösung bei Normoxie, Hypoxie durch Zugabe von 10%, 5% und 0% Sauerstoff bei allen Versuchen mit Kontrolllösung.

Stimulation	Anzahl der Messungen	Gemessene Werte der Superfusionslösung (Kontrolllösung)		
		pO_2 (mmHg)	pCO_2 (mmHg)	pH (-)
Normoxie	20	$222,2 \pm 15,0$	$20,5 \pm 0,9$	$7,2 \pm 0,1$
Hypoxie bei 10% O_2	5	$101,9 \pm 4,8$	$20,3 \pm 0,6$	$7,3 \pm 0,0$
Hypoxie bei 5% O_2	8	$71,5 \pm 2,6$	$19,9 \pm 0,8$	$7,3 \pm 0,1$
Hypoxie bei 0% O_2	7	$51,8 \pm 3,1$	$20,0 \pm 0,8$	$7,2 \pm 0,1$

Tabelle 4.7: Der gemessene Sauerstoffpartialdruck (pO_2), Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) und pH als Mittelwert mit Angabe der Standardabweichung in der Superfusionslösung bei Normoxie und Hypoxie durch Zugabe von 10%, 5% und 0% Sauerstoff bei allen Versuchen mit kalziumfreier Versuchslösung.

Stimulation	Anzahl der Messungen	Gemessene Werte in kalziumfreier Versuchslösung		
		pO_2 (mmHg)	pCO_2 (mmHg)	pH (-)
Normoxie	5	$217,4 \pm 4,5$	$20,0 \pm 2,2$	$7,3 \pm 0,0$
Hypoxie 10% O_2	1	$98,2 \pm 1,3$	$21,0 \pm 0,6$	$7,3 \pm 0,0$
Hypoxie 5% O_2	3	$72,4 \pm 0,0$	$20,5 \pm 0,0$	$7,0 \pm 0,0$
Hypoxie 0% O_2	3	$48,5 \pm 2,8$	$20,8 \pm 0,8$	$7,3 \pm 0,0$

Tabelle 4.8: Der gemessene Sauerstoffpartialdruck (pO_2), Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) und pH als Mittelwert mit Angabe der Standardabweichung in der Superfusionslösung bei Normoxie und Hypoxie durch Zugabe von 10%, 5% und 0% Sauerstoff bei allen Denervierungsversuchen.

Stimulation	Anzahl der Messungen	Gemessene Werte in Kontrolllösung nach vorausgegangener Denervierung		
		pO_2 (mmHg)	pCO_2 (mmHg)	pH (-)
Normoxie	12	$201,2 \pm 30,3$	$20,0 \pm 0,6$	$7,2 \pm 0,0$
Hypoxie 10% O_2	6	$100,5 \pm 2,8$	$19,6 \pm 0,8$	$7,3 \pm 0,0$
Hypoxie 5% O_2	8	$75,2 \pm 5,0$	$19,3 \pm 1,0$	$7,2 \pm 0,0$
Hypoxie 0% O_2	9	$53,4 \pm 4,3$	$19,1 \pm 0,9$	$7,2 \pm 0,0$

Bei den Austauschversuchen wurden zusätzlich die Elektrolytkonzentrationen für Natrium, Kalium und Kalzium sowie die Osmolarität bestimmt. Tabelle 4.9 zeigt die eben genannten Charakteristika der kalziumhaltigen Kontrolllösung und der kalziumfreien Versuchslösung im Vergleich.

Tabelle 4.9: Die gemessenen Elektrolytkonzentrationen für Natrium (Na), Kalium (K) und Kalzium (Ca) sowie die Osmolarität als Mittelwert mit Angabe der Standardabweichung im Vergleich zwischen Kontrolllösung und kalziumfreier Versuchslösung.

	Kontrolllösung		Kalziumfreie Versuchslösung	
	N	Gemessene Werte	N	Gemessenen Werte
Na (mmol/l)	17	138,3 ± 1,6	7	140,8 ± 2,2
K ⁺ (mmol/l)	17	5,5 ± 0,1	7	5,5 ± 0,1
Ca ²⁺ (mmol/l)	17	2,0 ± 0,1	7	0,3 ± 0,3
Osmolarität (osmol/l)	6	309,5 ± 13,2	3	309,0 ± 9,2

4.3 Absorptionsspektren des Karotiskörperchengewebes

4.3.1 Spektrale Reaktion auf Hypoxie

Das Absorptionsverhalten des Karotiskörperchengewebes bei Hypoxie zeigte typische Veränderungen. Nach Beginn der fünf Minuten verabreichten Hypoxie entwickelten sich ab der zweiten Versuchsminute die spektralen Veränderungen. In der dritten bis fünften Minute der Hypoxie bildeten sich die Absorptionsspektren vollständig aus. Ab der sechsten Minute verschwanden die spektralen Veränderungen zunehmend, um dann im späteren Verlauf nicht mehr messbar zu werden (Abbildungen 4.1).

Die aufgezeichneten Differenzabsorptionsspektren der dritten bis fünften Minute wurden im Wellenlängenbereich von 510 bis 630 nm mathematisch in die Redoxspektren der fünf Cytochrome zerlegt. Diese Bandenseparation konnte grafisch als Fit-Kurve sichtbar gemacht werden (Abbildung 4.2).

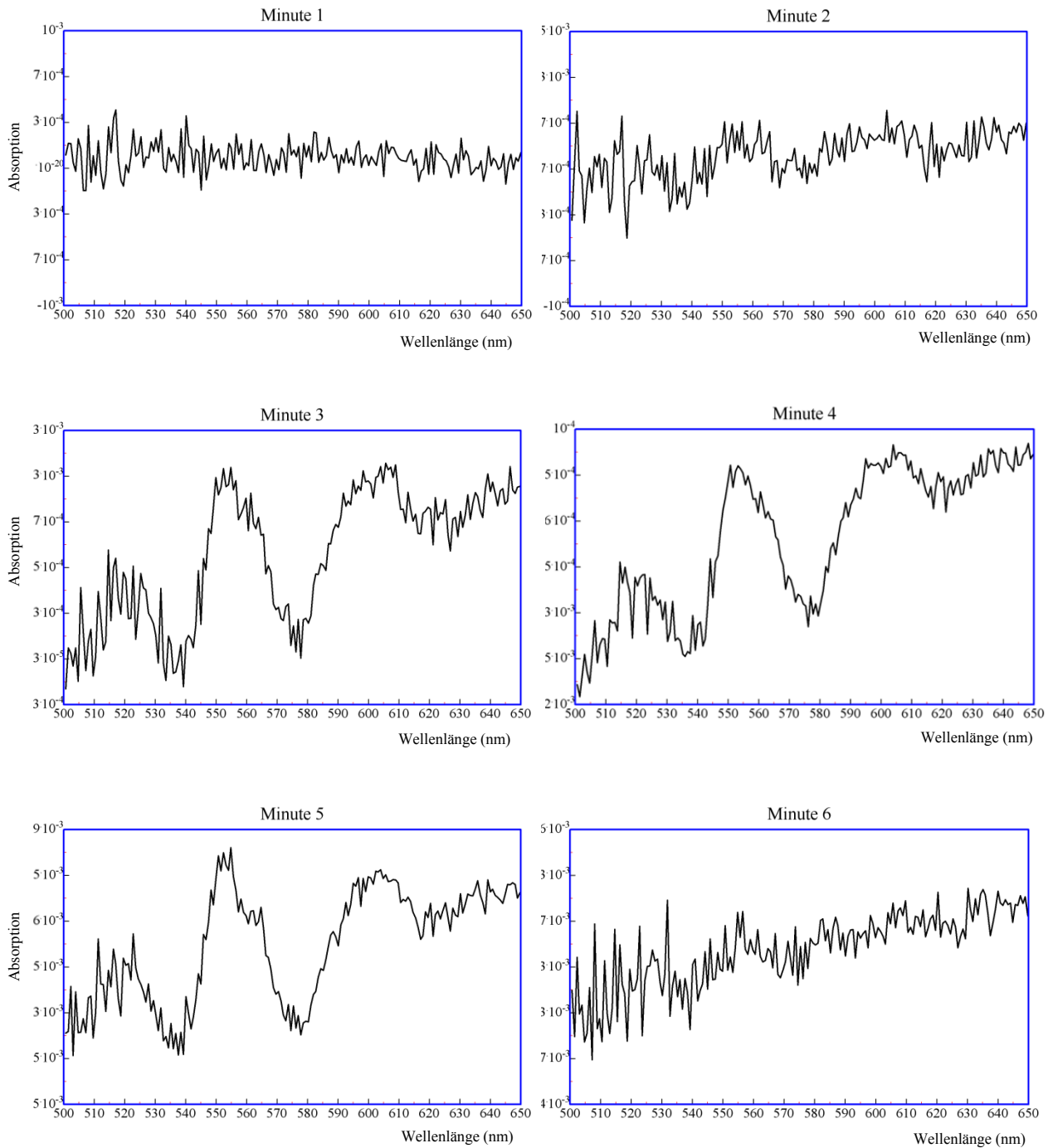


Abbildung 4.1: Darstellung einer typischen Spektralserie mit Aufnahmen der ersten bis sechsten Minute bei Stimulation mit einer Begasung der Superfusionslösung von 0% O₂.

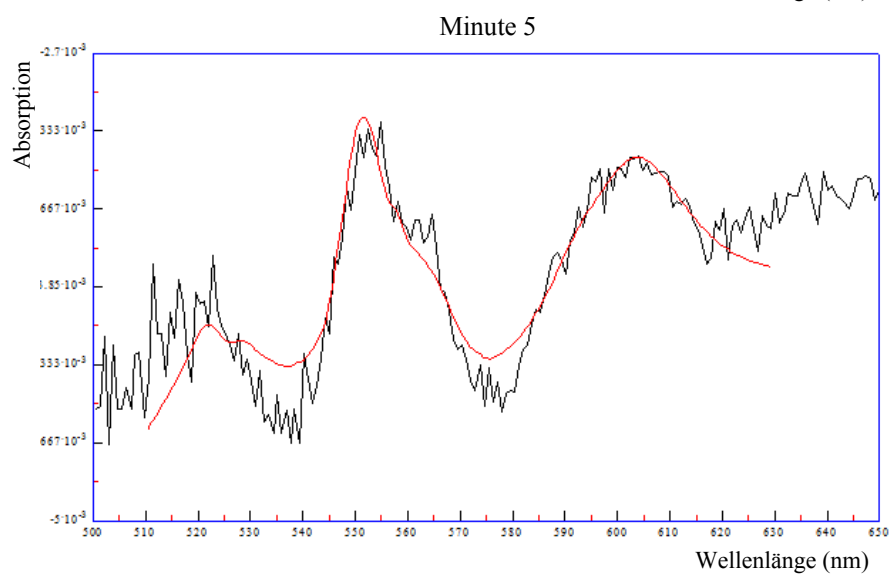
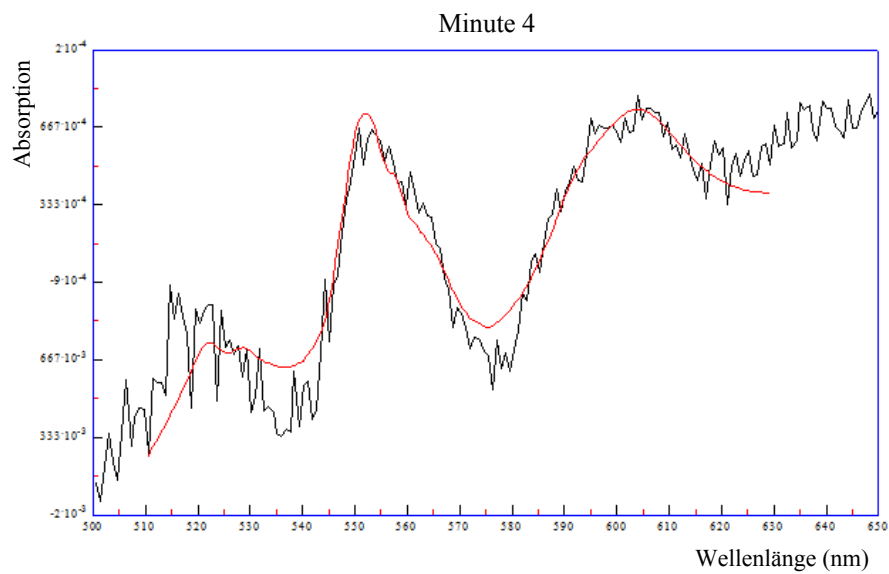
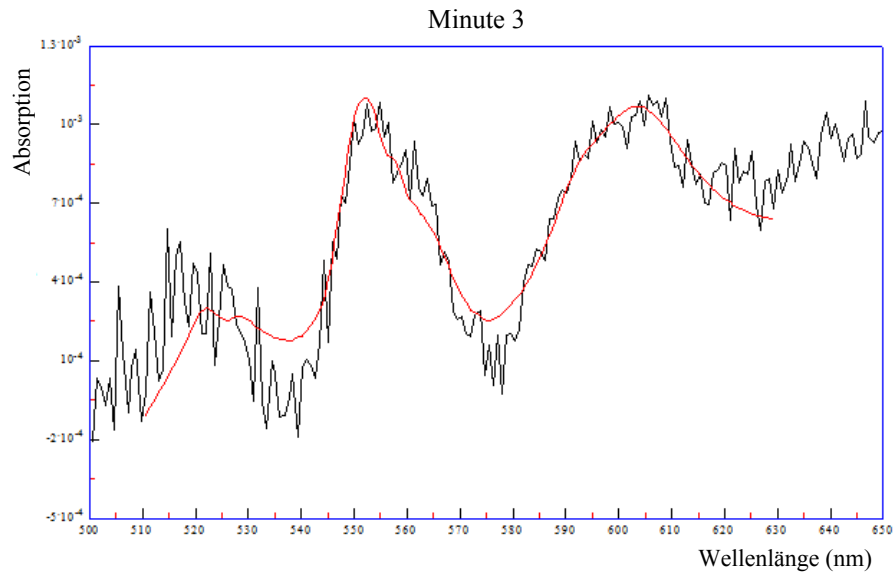


Abbildung 4.2: Darstellung der Differenzabsorptionsspektren der Minute drei, vier und fünf mit Fit-Kurve (rote Linie) der oben gezeigten Spektralserie bei Stimulation mit einer Begasung der Superfusionslösung von 0% O₂.

4.3.2 Absorptionsverhalten bei Hypoxie in Kontrolllösung

Die relativen Spektralgewichte der fünf Cytochrome in Kontrolllösung wurden, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, ermittelt (Tabelle 4.10) und grafisch in einer Abbildung (4.3) bei den drei verwendeten Hypoxiestufen (50 mmHg, 70 mmHg und 100 mmHg pO₂) dargestellt. Zu jedem Messpunkt ist zusätzlich die Standardabweichung in der Grafik dargestellt.

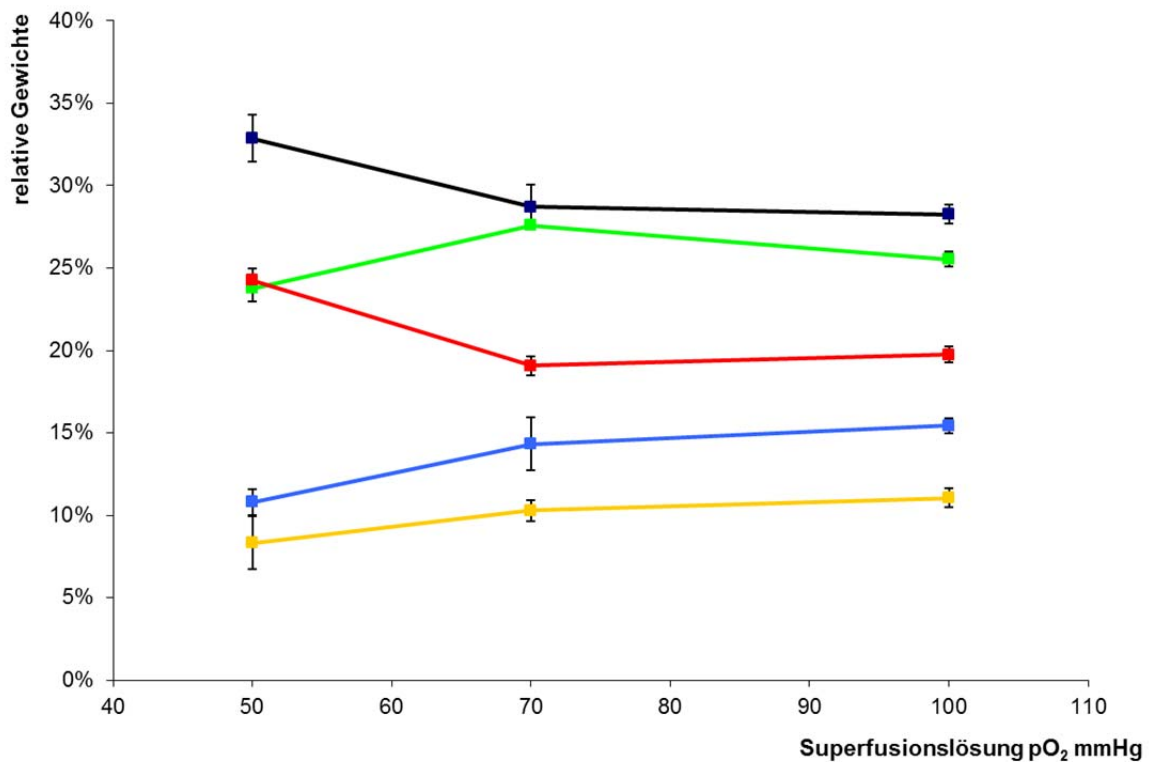


Abbildung 4.3: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der Cytochrome C₅₅₀ (schwarz), b₅₅₈ (gelb), b₅₆₃ (grün), a₅₉₂ (blau) und a₆₀₃ (rot) mit Standardabweichung in Kontrolllösung in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie (50 mmHg: N = 10; 70 mmHg: N = 10; 100 mmHg: N = 7).

Tabelle 4.10: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der fünf Cytochrome mit Standardabweichung in Kontrolllösung in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie.

Hypoxie- stufen	Anzahl der Versuche	Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Spektralgewichte der fünf Cytochrome in Kontrolllösung				
pO ₂ (mmHg)	N	C ₅₅₀ (%)	b ₅₅₈ (%)	b ₅₆₃ (%)	a ₅₉₂ (%)	a ₆₀₃ (%)
50	10	32,9 ± 1,5	8,3 ± 1,7	23,8 ± 0,7	10,8 ± 0,8	24,2 ± 0,7
70	10	28,7 ± 1,4	10,3 ± 0,6	27,6 ± 0,3	14,3 ± 1,6	19,1 ± 0,6
100	7	28,3 ± 0,6	11,1 ± 0,6	25,5 ± 0,5	15,4 ± 0,5	19,7 ± 0,5

4.3.3 Absorptionsverhalten bei Hypoxie nach Kationenaustausch

Das Absorptionsverhalten des Karotiskörperchengewebes bei Hypoxie nach Kationenaustausch zeigte die unten grafisch und tabellarisch zusammengefassten Werte (Abbildung 4.4; Tabelle 4.11).

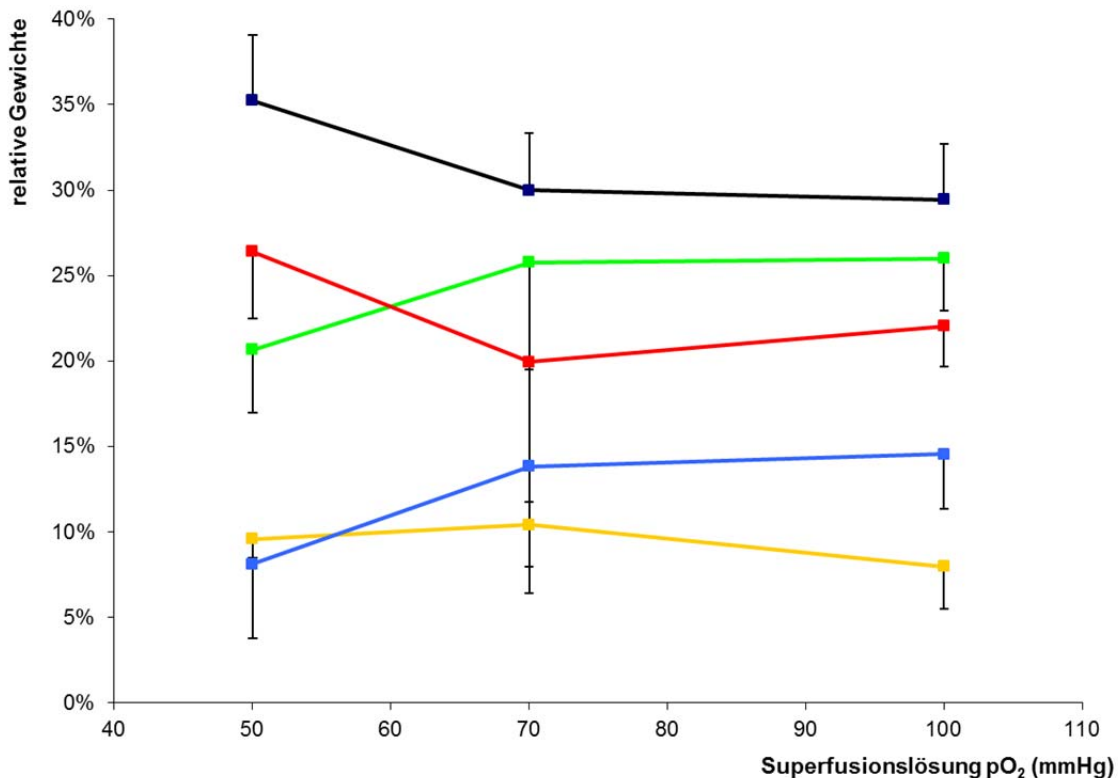


Abbildung 4.4: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der Cytochrome c₅₅₀ (schwarz), b₅₅₈ (gelb), b₅₆₃ (grün), a₅₉₂ (blau) und a₆₀₃ (rot) mit Standardabweichung in kalziumfreier, magnesiumhaltiger Superfusionslösung (Versuchslösung) in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie (50 mmHg: N = 3; 70 mmHg: N = 3; 100 mmHg: N = 4). Die Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nur in eine Richtung eingetragen.

Tabelle 4.11: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der fünf Cytochrome mit Standardabweichung in kalziumfreier, magnesiumhaltiger Superfusionslösung (Versuchslösung) in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie.

Hypoxiestufen	Anzahl der Versuche	Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Spektralgewichte der fünf Cytochrome in kalziumfreier Versuchslösung						
		pO ₂ (mmHg)	N	c ₅₅₀ (%)	b ₅₅₈ (%)	b ₅₆₃ (%)	a ₅₉₂ (%)	a ₆₀₃ (%)
		50	3	35,2 ± 3,8	9,6 ± 1,1	20,7 ± 7,3	8,1 ± 4,3	26,4 ± 3,9
		70	3	30,0 ± 3,3	10,4 ± 2,5	25,8 ± 6,3	13,8 ± 7,4	20,0 ± 8,2
		100	4	29,4 ± 3,3	8,0 ± 2,5	26,0 ± 3,0	14,6 ± 3,2	22,0 ± 2,3

4.3.4 Absorptionsverhalten bei Hypoxie nach Denervierung

Das Absorptionsverhalten des Karotiskörperchengewebes nach Denervierung bei Hypoxie zeigte die unten grafisch und tabellarisch dargestellten relativen Spektralgewichte der fünf Cytochrome mit den jeweiligen Standardabweichungen (Abbildung 4.5; Tabelle 4.12).

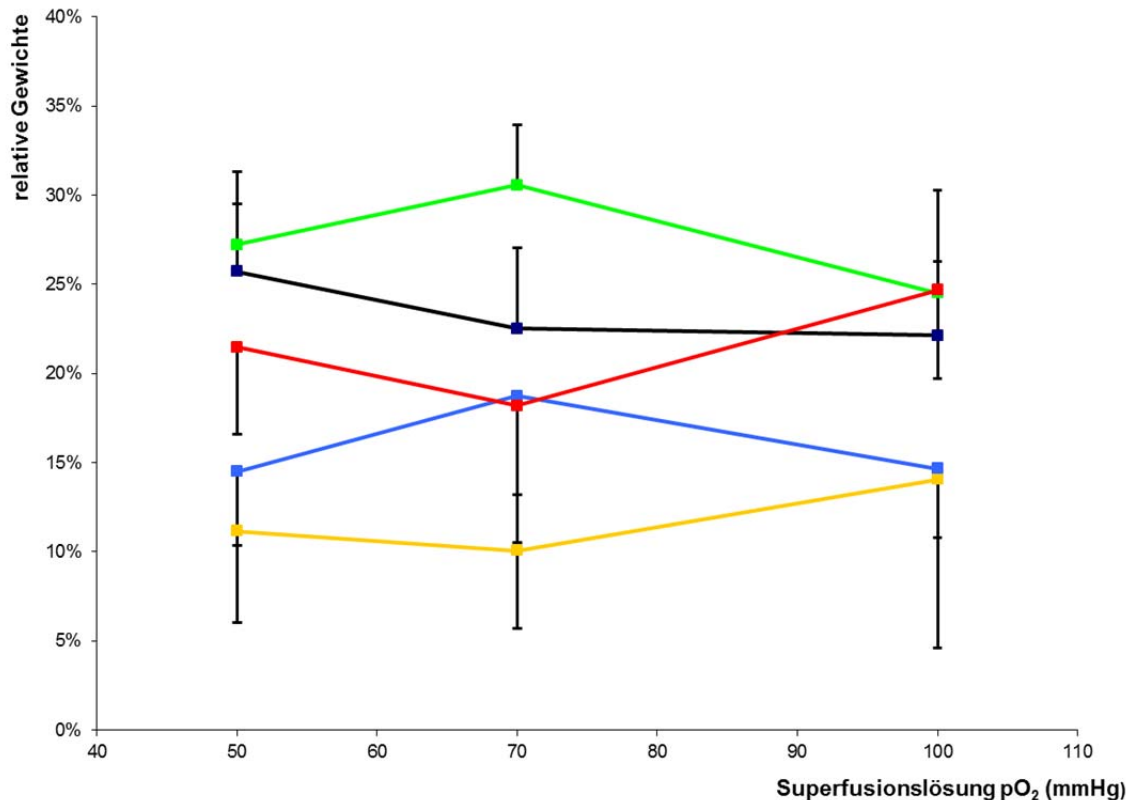


Abbildung 4.5: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der Cytochrome c₅₅₀ (schwarz), b₅₅₈ (gelb), b₅₆₃ (grün), a₅₉₂ (blau) und a₆₀₃ (rot) mit Standardabweichung nach Denervierung des Glomus caroticum in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie (50 mmHg: N = 10; 70 mmHg: N = 9; 100 mmHg: N = 6). Die Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nur in eine Richtung eingetragen.

Tabelle 4.12: Darstellung der Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der fünf Cytochrome mit Standardabweichung nach vorausgegangener, dauerhafter Denervierung des Glomus caroticum in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie.

Hypoxiestufen	Anzahl	Mittelwerte und Standardabweichung der relativen Spektralgewichte der fünf Cytochrome beim denervierten Karotiskörperchen				
	der Versuche					
pO ₂ (mmHg)	N	c ₅₅₀ (%)	b ₅₅₈ (%)	b ₅₆₃ (%)	a ₅₉₂ (%)	a ₆₀₃ (%)
50	10	25,7 ± 3,8	11,1 ± 5,1	27,2 ± 4,1	14,5 ± 4,2	21,5 ± 4,9
70	9	22,5 ± 4,5	10,0 ± 4,3	30,5 ± 3,4	18,7 ± 5,5	18,2 ± 7,7
100	6	22,1 ± 4,1	14,0 ± 9,5	24,5 ± 5,8	14,7 ± 3,9	24,7 ± 5,0

4.4. Statistische Absicherung

4.4.1 Allgemeine statistische Analyse

Insgesamt wurden 62 Versuche durchgeführt, die sich auf die in Tabelle 4.13 dargestellten drei Versuchsreihen und drei verwendeten Hypoxiestufen verteilten.

Tabelle 4.13: Darstellung der Verteilung der durchgeführten Versuche.

		Kontroll- lösung	kalziumfreie Versuchslösung	Denervierungs- versuche	Gesamt
Hypoxie-	50	10	3	11	24
stufe	70	10	3	8	21
(mmHg)	100	7	4	6	17
Gesamt		27	10	25	62

Die Verteilung der Versuche auf die drei Versuchsreihen, war mit 43,5% Versuchen in Kontrolllösung, 16,1% Versuchen in kalziumfreier Versuchslösung und 40,3% Versuchen nach vorrausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven nicht ganz ausgeglichen (Tabelle 4.14). Insgesamt wurden häufiger Karotiskörperchenpräparate der rechten Seite verwendet (Tabelle 4.15).

Tabelle 4.14: Darstellung der Häufigkeit der verwendeten Versuchsreihen.

Versuchsreihe	Häufigkeit	Prozent
Kontrolllösung	27	43,5
Versuchslösung	10	16,1
Denervierungsversuche	25	40,3
Gesamt	62	100,0

Tabelle 4.15: Darstellung der Häufigkeit der verwendeten Karotiskörperchenpräparate nach Seitenlokalisation und Versuchsreihe.

CB-Seite	Kontroll- lösung	kalziumfreie Versuchslösung	Denervierungs- versuche	Gesamt	Häufigkeit (Prozent)
rechts	15	5	25	45	72,6
links	12	5	0	17	27,4
Gesamt	27	10	25	62	100,0

Die statistische Auswertung der insgesamt 62 Versuche erfolgte mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse ($P < 0,05$; IBM SPSS Statistics Version 20) für die beiden Faktoren Versuchsreihe (Spektralserien in Kontrolllösung, in kalziumfreier Versuchslösung und nach Denervierung in Kontrolllösung) und Hypoxiestufe (50 mmHg, 70 mmHg und 100 mmHg pO_2).

Die Untersuchung ergab für das Cytochrom c_{550} , dass ein hoch signifikanter Einfluss des Faktors Versuchsreihe und ein sehr signifikanter Einfluss des Faktors Hypoxiestufe nachweisbar war, aber dass die Interaktion von beiden Faktoren zusammen nicht signifikant war (Tabelle 4.16; Abbildung 4.6).

Tabelle 4.16: Darstellung der Zwischensubjekteffekte für die abhängige Variable Cytochrom c_{550} .

Tests der Zwischensubjekteffekte - Abhängige Variable: Cytochrom c_{550}					
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Versuchsreihe	0,066	2	0,033	18,842	0,000
Hypoxie-Stufe	0,025	2	0,012	7,130	0,002
Interaktion von Versuchsreihe und Hypoxiestufe	0,002	4	0,001	0,327	0,858

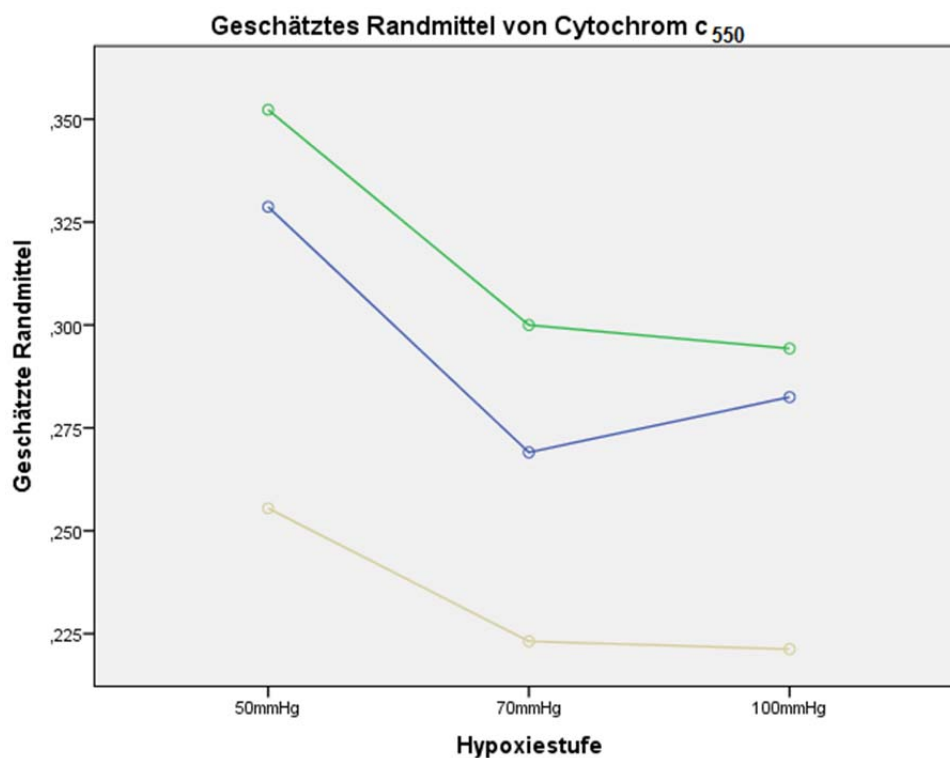


Abbildung 4.6: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte des Cytochroms c_{550} in Kontrolllösung (blau), kalziumfreier Versuchslösung (grün) und nach vorausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven (ocker).

Für das Cytochrom b_{558} waren alle Faktoren nicht signifikant. Für das Cytochrom b_{563} , a_{603} und a_{592} als abhängige Variable war nur der Faktor Hypoxiestufe signifikant. Der Einfluss der Hypoxiestufe darf für das Cytochrom a_{592} sogar als sehr signifikant bezeichnet werden. Für keines der Cytochrome war die Interaktion zwischen dem Grad der Hypoxie und der Versuchsreihe signifikant (Tabelle 4.17 bis 4.20; Abbildung 4.7 bis 4.10).

Tabelle 4.17: Darstellung der Zwischensubjekteffekte für die abhängige Variable Cytochrom b_{558} .

Tests der Zwischensubjekteffekte - Abhängige Variable: Cytochrom b_{558}					
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Versuchsreihe	0,005	2	0,002	0,994	0,377
Hypoxie-Stufe	0,002	2	0,001	0,347	0,708
Interaktion von Versuchsreihe und Hypoxie-Stufe	0,008	4	0,002	0,871	0,487

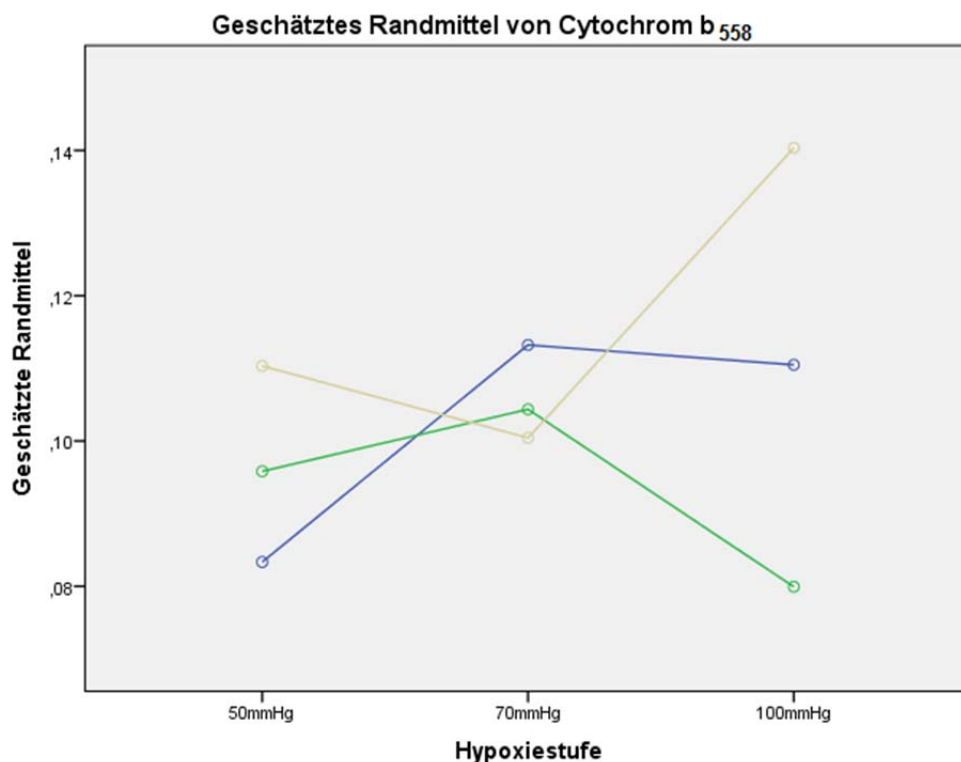


Abbildung 4.7: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte des Cytochroms b_{558} in Kontrolllösung (blau), kalziumfreier Versuchslösung (grün) und nach vorausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven (ocker).

Tabelle 4.18: Darstellung der Zwischensubjekteffekte für die abhängige Variable Cytochrom b₅₆₃.

Tests der Zwischensubjekteffekte - Abhängige Variable: Cytochrom b ₅₆₃					
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Versuchsreihe	0,009	2	0,005	2,579	0,085
Hypoxie-Stufe	0,014	2	0,007	3,969	0,025
Interaktion von Versuchsreihe und Hypoxie-Stufe	0,010	4	0,002	1,395	0,248

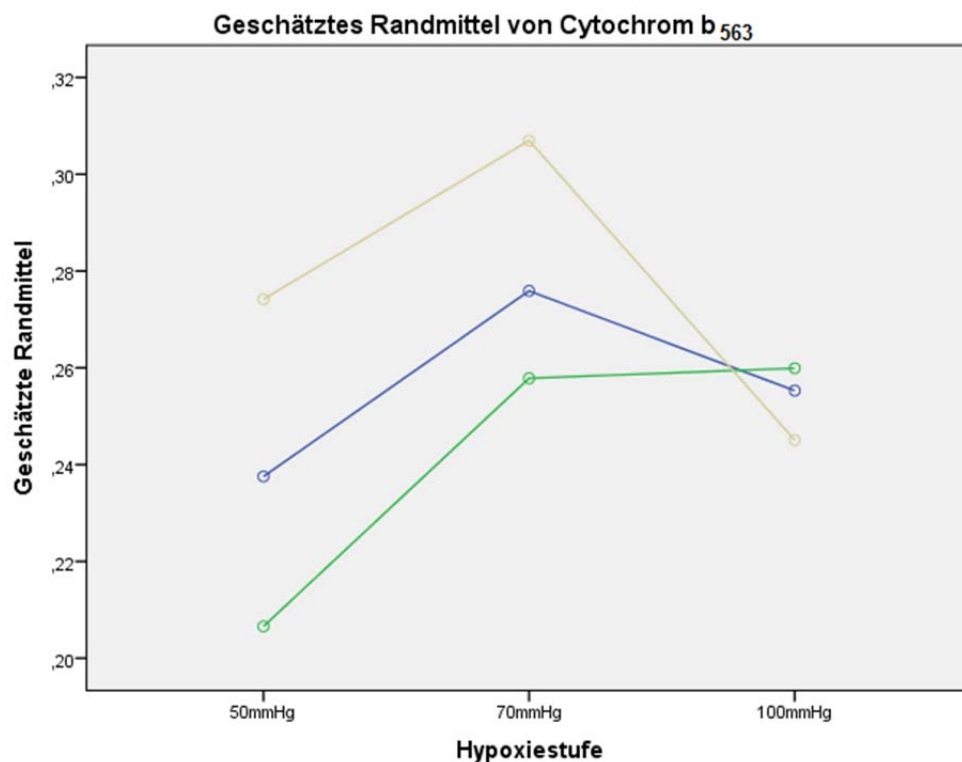


Abbildung 4.8: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte des Cytochroms b₅₆₃ in Kontrolllösung (blau), kalziumfreier Versuchslösung (grün) und nach vorausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven (ocker).

Tabelle 4.19: Darstellung der Zwischensubjekteffekte für die abhängige Variable Cytochrom a_{592} .

Tests der Zwischensubjekteffekte - Abhängige Variable: Cytochrom a_{592}					
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Versuchsreihe	0,012	2	0,006	2,698	0,077
Hypoxie-Stufe	0,022	2	0,011	5,064	0,010
Interaktion von Versuchsreihe und Hypoxie-Stufe	0,007	4	0,002	0,838	0,507

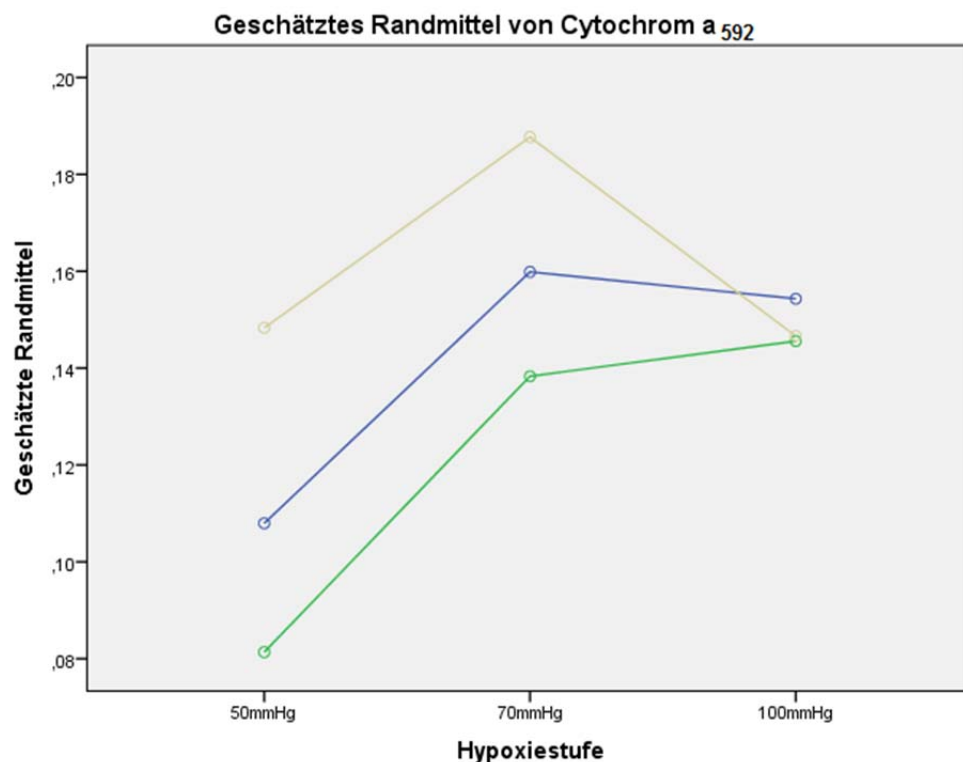


Abbildung 4.9: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte des Cytochroms a_{592} in Kontrolllösung (blau), kalziumfreier Versuchslösung (grün) und nach vorausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven (ocker).

Tabelle 4.20: Darstellung der Zwischensubjekteffekte für die abhängige Variable Cytochrom a_{603} .

Tests der Zwischensubjekteffekte - Abhängige Variable: Cytochrom a_{603}					
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Versuchsreihe	0,003	2	0,001	0,474	0,625
Hypoxie-Stufe	0,021	2	0,011	3,851	0,027
Interaktion von Versuchsreihe und Hypoxie-Stufe	0,015	4	0,004	1,337	0,269

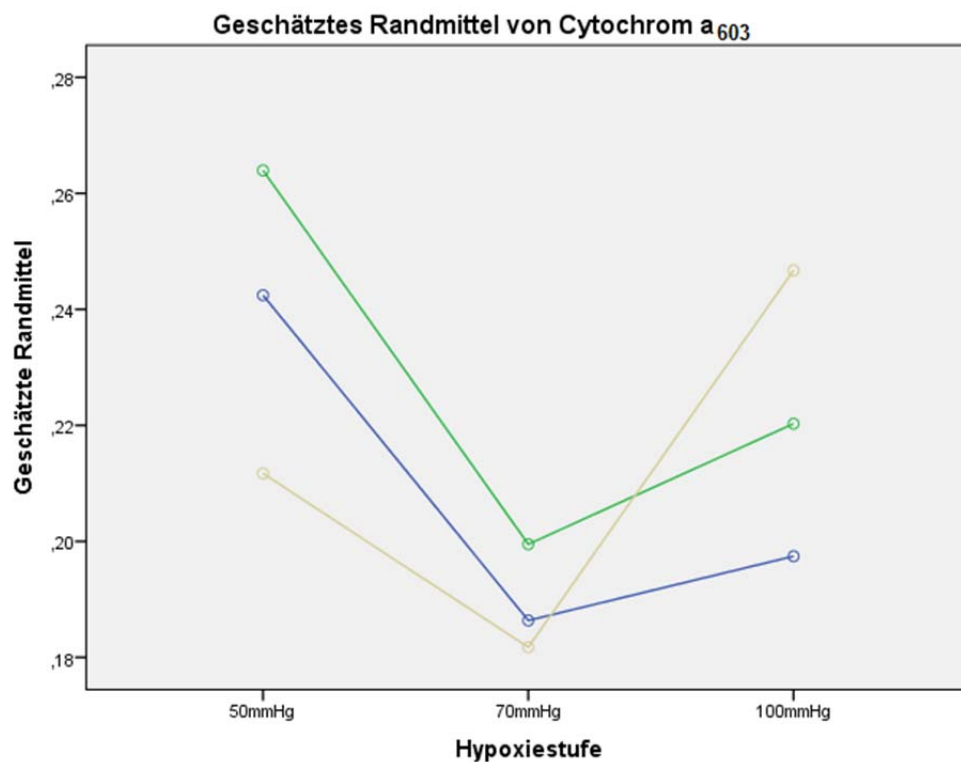


Abbildung 4.10: Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte des Cytochroms a_{603} in Kontrolllösung (blau), kalziumfreier Versuchslösung (grün) und nach vorausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven (ocker).

4.4.2 Statistische Analyse: Spektralgewichte in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie

Dass der Einfluss des Grades der Hypoxie, also die Hypoxiestufe, signifikant ist, konnte für die Cytochrome c_{550} , b_{563} , a_{592} und a_{603} mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse nachgewiesen werden. Lediglich das Cytochrom b_{558} zeigte keine signifikante Änderung des relativen Spektralgewichtes in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie.

Nun sollte untersucht werden, für welche Faktorenstufen (50 mmHg, 70 mmHg oder 100 mmHg Sauerstoffpartialdruck) ein signifikanter Unterschied für die Cytochrome c_{550} , b_{563} , a_{592} und a_{603} zu verzeichnen war (Tabelle 4.21). Dazu wurde der Post-hoc-Test Tukey (zweifaktorielle Varianzanalyse, IBM SPSS Statistics Version 20) verwendet.

Für das Cytochrom c_{550} konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Faktorenstufen 50 mmHg und 70 mmHg sowie 50 mmHg und 100 mmHg Sauerstoffpartialdruck nachgewiesen werden. Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen 70 mmHg und 100 mmHg Sauerstoffpartialdruck.

Die Cytochrome b_{563} , a_{592} und a_{603} zeigten signifikante Unterschiede ihrer relativen Spektralgewichte lediglich zwischen den Hypoxiestufen 50 mmHg und 70 mmHg Sauerstoffpartialdruck. Zwischen den Hypoxiestufen 50 mmHg und 100 mmHg sowie 70 mmHg und 100 mmHg war der Einfluss des Grads der Hypoxie auf das Versuchsergebnis nicht signifikant.

Ein hoch signifikantes Ergebnis, also $p \leq 0,01$, konnte für die Anteile der relativen Spektralgewichte zwischen den Faktorstufen 50 mmHg und 70 mmHg für das Cytochrom c_{550} und für das Cytochrom a_{592} nachgewiesen werden.

Tabelle 4.21: Post-Hoc-Test für die drei Hypoxiestufen mit Angabe der Signifikanz.

Abhängige Variable	Hypoxie-Stufe	Hypoxie-Stufe	Signifikanz
Cytochrom c ₅₅₀	50 mmHg	70 mmHg	0,004
		100 mmHg	0,032
	70 mmHg	50 mmHg	0,004
		100 mmHg	0,841
	100 mmHg	50 mmHg	0,032
		70 mmHg	0,841
Cytochrom b ₅₅₈	50 mmHg	70 mmHg	0,781
		100 mmHg	0,537
	70 mmHg	50 mmHg	0,781
		100 mmHg	0,906
	100 mmHg	50 mmHg	0,537
		70 mmHg	0,906
Cytochrom b ₅₆₃	50 mmHg	70 mmHg	0,022
		100 mmHg	0,984
	70 mmHg	50 mmHg	0,022
		100 mmHg	0,058
	100 mmHg	50 mmHg	0,984
		70 mmHg	0,058
Cytochrom a ₅₉₂	50 mmHg	70 mmHg	0,007
		100 mmHg	0,183
	70 mmHg	50 mmHg	0,007
		100 mmHg	0,473
	100 mmHg	50 mmHg	0,183
		70 mmHg	0,473
Cytochrom a ₆₀₃	50 mmHg	70 mmHg	0,018
		100 mmHg	0,793
	70 mmHg	50 mmHg	0,018
		100 mmHg	0,132
	100 mmHg	50 mmHg	0,793
		70 mmHg	0,132

4.4.3 Statistische Analyse: Spektralgewichte in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen

Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab lediglich für das Cytochrom c_{550} einen signifikanten Einfluss der Versuchsreihe auf das Testergebnis. Für die Cytochrome b_{558} , b_{563} , a_{592} und a_{603} hat der Faktor Versuchsreihe das Versuchsergebnis nicht signifikant beeinflusst.

Darüber hinaus wurde untersucht, welche Versuchsreihe das relative Spektralgewicht des Cytochroms c_{550} signifikant beeinflusst (Tabelle 4.22). Dazu wurde der Post-hoc-Test Tukey (zweifaktorielle Varianzanalyse, IBM SPSS Statistics Version 20) verwendet. Es zeigte sich, dass es einen hoch signifikanten Einfluss des Faktors Versuchsreihe gab zwischen den Denervierungsversuchen und den Versuchen in Kontrolllösung, sowie zwischen den Denervierungsversuchen und den Versuchen mit kalziumfreier Versuchslösung. Keinen signifikanten Einfluss hatte der Faktor Versuchsreihe auf die Versuche in Kontrolllösung im Vergleich zu den Versuchen in kalziumfreier Versuchslösung.

Tabelle 4.22: Post-Hoc-Test für die drei Versuchsreihen mit Angabe der Signifikanz.

Abhängige Variable	Versuchsreihe	Versuchsreihe	Signifikanz
Cytochrom c ₅₅₀	Kontrolllösung	kalziumfreie Versuchslösung	0,450
		Denervierungsversuche	0,000
	kalziumfreie Versuchslösung	Kontrolllösung	0,450
		Denervierungsversuche	0,000
	Denervierungsversuche	Kontrolllösung	0,000
		kalziumfreie Versuchslösung	0,000
Cytochrom b ₅₅₈	Kontrolllösung	kalziumfreie Versuchslösung	0,862
		Denervierungsversuche	0,610
	kalziumfreie Versuchslösung	Kontrolllösung	0,862
		Denervierungsversuche	0,446
	Denervierungsversuche	Kontrolllösung	0,610
		kalziumfreie Versuchslösung	0,446
Cytochrom b ₅₆₃	Kontrolllösung	kalziumfreie Versuchslösung	0,683
		Denervierungsversuche	0,174
	kalziumfreie Versuchslösung	Kontrolllösung	0,683
		Denervierungsversuche	0,085
	Denervierungsversuche	Kontrolllösung	0,174
		kalziumfreie Versuchslösung	0,085
Cytochrom a ₅₉₂	Kontrolllösung	kalziumfreie Versuchslösung	0,659
		Denervierungsversuche	0,235
	kalziumfreie Versuchslösung	Kontrolllösung	0,659
		Denervierungsversuche	0,102
	Denervierungsversuche	Kontrolllösung	0,235
		kalziumfreie Versuchslösung	0,102
Cytochrom a ₆₀₃	Kontrolllösung	kalziumfreie Versuchslösung	0,656
		Denervierungsversuche	0,999
	kalziumfreie Versuchslösung	Kontrolllösung	0,656
		Denervierungsversuche	0,678
	Denervierungsversuche	Kontrolllösung	0,999
		kalziumfreie Versuchslösung	0,678

Dass kein signifikanter Unterschied im Absorptionsverhalten bei Verwendung von Kontroll- und kalziumfreier Versuchslösung vorlag, war grafisch nachvollziehbar (Abbildung 4.11).

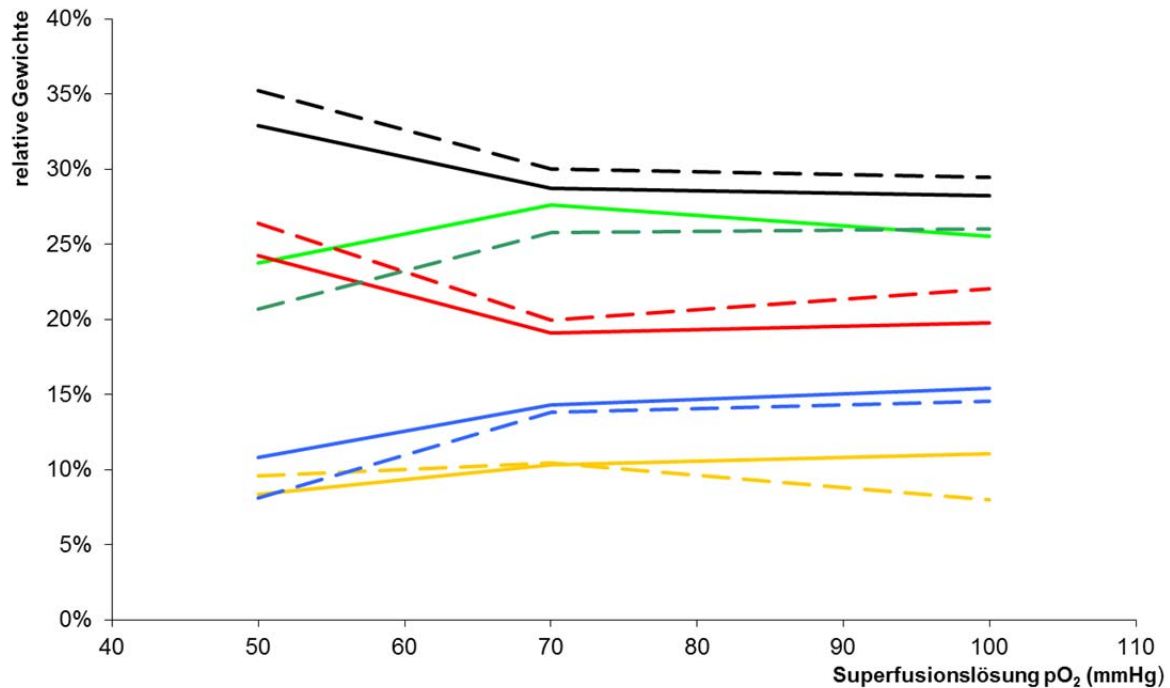


Abbildung 4.11: Vergleich der Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der Cytochrome c₅₅₀ (schwarz), b₅₅₈ (gelb), b₅₆₃ (grün), a₅₉₂ (blau) und a₆₀₃ (rot) in Kontrolllösung (durchgezogene Linie) und kalziumfreier Versuchslösung (gestrichelte Linie) in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Angabe der Standardabweichung verzichtet. Es handelt sich hierbei um eine Überlagerung der Abb. 4.3 und Abb. 4.4.

Die relativen Spektralgewichte von denervierten und nicht denervierten Karotiskörperchen-Präparaten (Versuche in Kontrolllösung) bei den drei verwendeten Hypoxiestufen wurden ebenfalls vergleichend grafisch dargestellt (Abbildung 4.12).

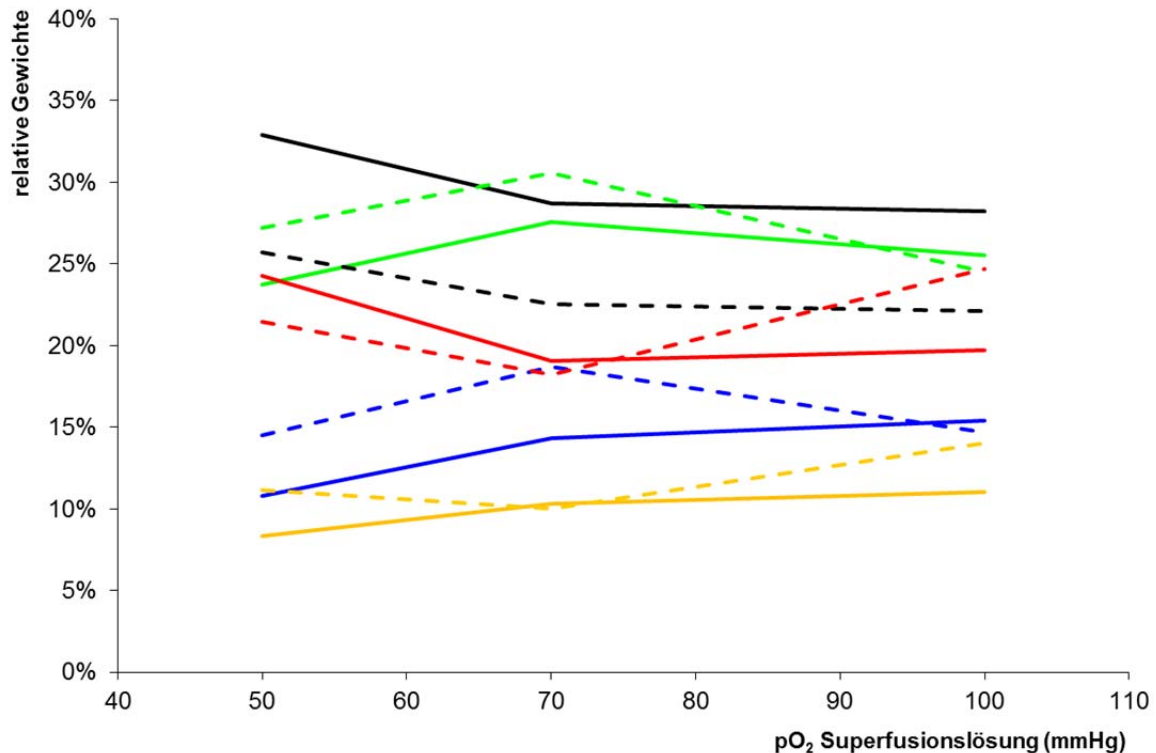


Abbildung 4.12: Vergleich der Veränderung der gemittelten, relativen Spektralgewichte der Cytochrome c₅₅₀ (schwarz), b₅₅₈ (gelb), b₅₆₃ (grün), a₅₉₂ (blau) und a₆₀₃ (rot) zwischen denervierten (gestrichelte Linien) und nicht denervierten (durchgezogene Linien) Karotiskörperchen-Präparaten in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Angabe der Standardabweichung verzichtet. Es handelt sich hierbei um eine Überlagerung der Abb. 4.3 und Abb. 4.5.

Die statistische Auswertung (Post-hoc-Test) zeigte, wie grafisch bereits erkennbar war, einen signifikanten Unterschied der relativen Spektralgewichte in Abhängigkeit von der verwendeten Versuchsreihe zwischen den Versuchen in Kontrolllösung und den Versuchen nach vorausgegangener Denervierung des Karotissinusnerven. Die Grafik zeigt auch, dass dieser Unterschied beim Cytochrom c₅₅₀ am größten zu sein scheint.

4.5. Afferente Reaktion des Karotissinusnerven

4.5.1 Das Antwortverhalten des Karotissinusnerven auf Hypoxie in Kontrolllösung

Die Reaktion des Karotissinusnerven auf Hypoxie ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Ein Anstieg der Impulsrate des Nerven bei Hypoxie war ab der zweiten Minute deutlich nachweisbar. Ab der dritten Minute erfolgte eine schrittweise Abnahme der Impulsrate auf ungefähr ein Drittel der zuvor erreichten maximalen Impulsrate. Eine Minute später hatte die Impulsrate wieder den Ausgangswert erreicht. Sowohl vor als auch nach einer Hypoxie war eine Spikerate in Form einer Ruheaktivität ableitbar.

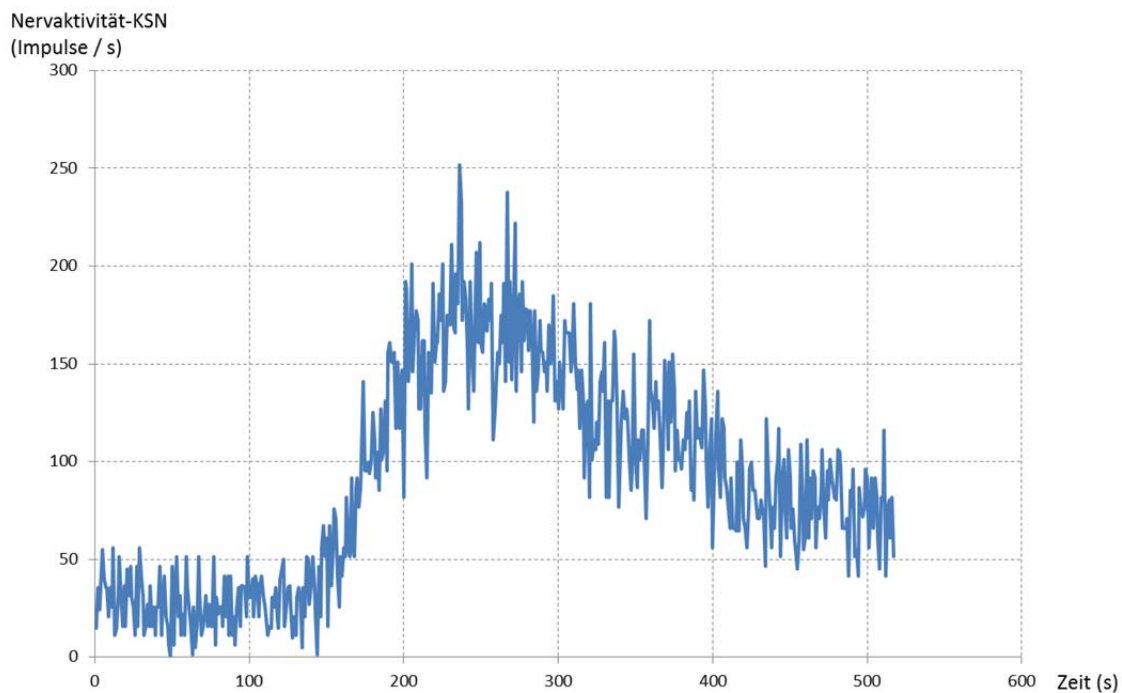


Abbildung 4.13: Grafische Darstellung der Spikerate des Karotissinusnerven pro Sekunde (blaue Linie) infolge einer Stimulation mit einer Hypoxie mit 0% zugesetztem Sauerstoff.

4.5.2 Das Antwortverhalten des Karotissinusnerven auf Hypoxie nach Kationenaustausch

Nach Austausch des Kations Kalzium gegen das Kation Magnesium in der Superfusionslösung wurde ebenfalls die Reaktion des Karotissinusnerven auf Hypoxie untersucht. Bei diesen Versuchen war kein Anstieg der Impulsrate des Karotissinusnerven nachweisbar (Abbildung 4.14).

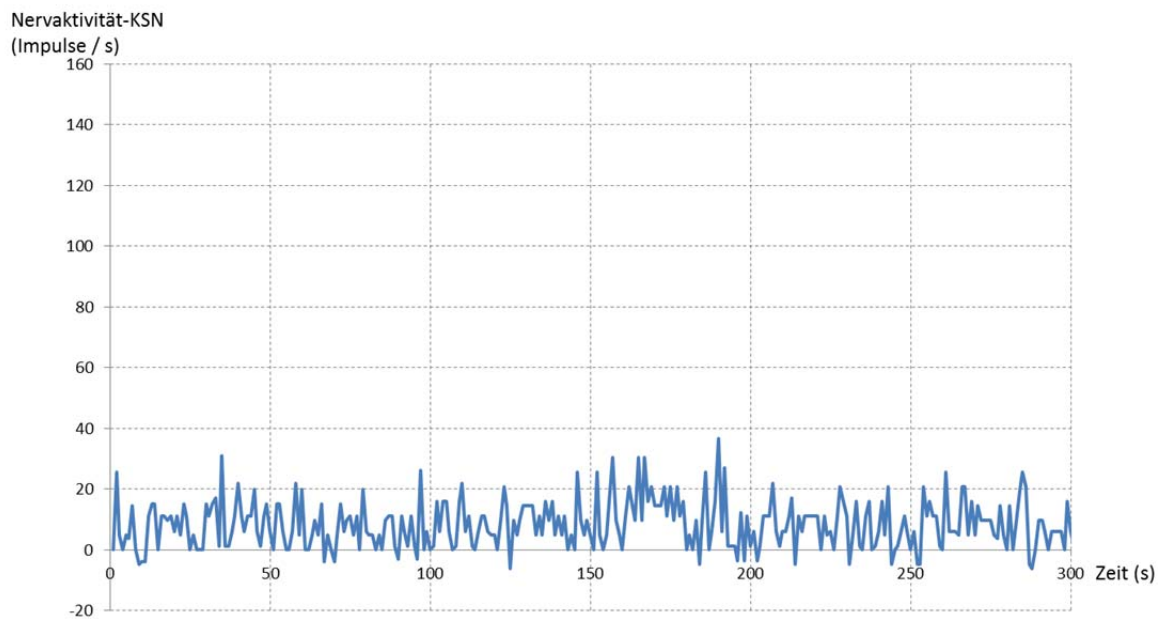


Abbildung 4.14: Fehlendes Antwortverhalten des Karotissinusnerven bei Hypoxie mit 5% zugesetztem Sauerstoff nach Kationenaustausch.

4.5.3 Das Antwortverhalten des Karotissinusnerven auf Hypoxie nach Denervierung

Nach vorausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven konnten sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei hypoxischer Stimulation keine Impulse des Nerven registriert werden. Beispielhaft ist hier das fehlende Antwortverhalten des Karotissinusnerven auf eine Stimulation mit 5% zugesetztem Sauerstoff grafisch dargestellt (Abbildung 4.15).

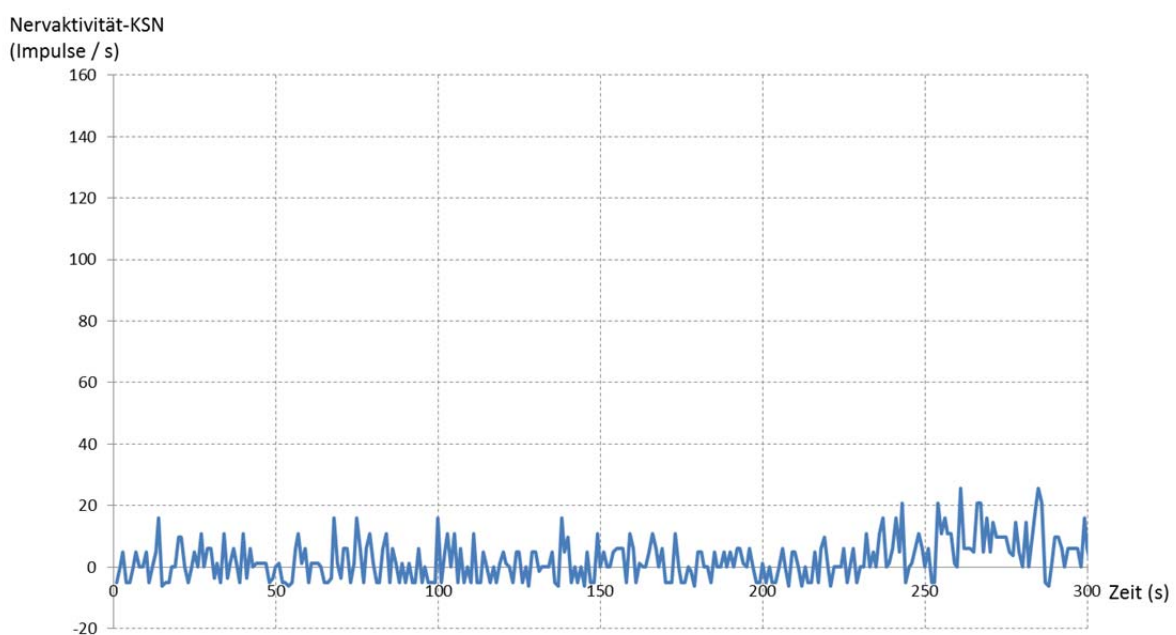


Abbildung 4.15: Fehlendes Antwortverhalten des Karotissinusnerven bei Hypoxie mit 5% zugesetztem Sauerstoff nach vorangegangener Durchtrennung des Nerven.

5 Diskussion

5.1 Diskussion des experimentellen Verfahrens

5.1.1 Das Tiermodell

Die Versuche wurden mit Präparaten von männlichen Wistar-Kyoto-Laborratten durchgeführt. Die Wistar-Kyoto-Ratte ist eine zur Untersuchung der Chemorezeption des Karotiskörperchens sehr häufig verwendete Spezies (Abdala et al. 2012, Conde et al. 2007, Jiang und Eyzaguirre 2004, Ribeiro et al. 2013, Sabino et al. 2013, Yamamoto et al. 2006). Bereits in den dreißiger Jahren wurden umfangreiche Untersuchungen über die Struktur und Innervation des Karotiskörperchens der Ratte von Castro durchgeführt (de Castro 1929). Diese Ergebnisse bildeten eine wesentliche Grundlage für die spätere Erforschung dieses Organs.

Das Alter der Versuchstiere wurde so gewählt, dass eine Ausreifung des Chemoreflexes, also sowohl der zentralen als auch der peripheren Komponenten der Chemoreflexion, sichergestellt war. Die Chemorezeptorfunktion des Karotiskörperchens der Ratte entwickelt sich in den ersten zwei Lebenswochen (Carroll und Kim 2005, Eden und Hanson 1987, Kholwadwala und Donnelly 1992), was aus Untersuchungen an neugeborenen Ratten bekannt ist. Bei den für die Arbeit verwendeten Tieren konnte bei den untersuchten Präparaten von einer vollständig ausgebildeten Chemorezeptorfunktion des Karotiskörperchens ausgegangen werden.

Andere Säugetierspezies, die zur Untersuchung der Chemorezeption des Karotiskörperchens verwendet werden, sind die Katze (Buerk et al. 1997, Iturriaga und Lahiri 1994, Ross 1957) und das Kaninchen (Duchen und Biscoe 1992, Verna et al. 1981). Die Untersuchungen zur Chemorezeption im Karotiskörperchen werden durch die in jüngster Zeit zunehmend entdeckten Speziesunterschiede noch erschwert. Beispielsweise wirkt im Katzenkarotiskörperchen der Transmitter Dopamin hemmend, während er im Karotiskörperchen des Kaninchens erregend wirkt (Eyzaguirre 2005). Während die Transmitter der Glomuszelle nach derzeitigem Wissensstand in allen Spezies gleich sind, gibt es speziesabhängige Unterschiede der postsynaptischen Membran der Nervendingung (Eyzaguirre 2005). Außerdem sind

Unterschiede in der Funktion von Kaliumkanälen zwischen verschiedenen Spezies (Ratte, Kaninchen, Maus) festgestellt worden (Evans 2006, Kemp 2006).

Trotzdem geht man von einer weitgehenden Übereinstimmung der sauerstoffsensitiven Funktion des Karotiskörperchens bei diesen Säugetierspezies aus (Pelletier et al. 1972, Vidruk et al. 2001). Ähnliche Eigenschaften werden auch beim Karotiskörperchen des Menschen vermutet (Ross 1957).

5.1.2 Behandlung der Tiere zur dauerhaften Denervierung des Karotiskörperchens

Die Durchtrennung des Ramus sinus carotici erfolgte nach schonender Präparation und Darstellung desselben. Einen Hinweis für eine erfolgreiche Durchtrennung des Karotissinusnerven lieferte das schlagartig veränderte Atmungsverhalten des Tieres und die Veränderung der Lage des N. glossopharyngeus. Der N. glossopharyngeus wurde an der Eintrittsstelle des Karotissinusnerven durch dessen Spannung V-förmig in Richtung Karotisgabel ausgezogen. Nach der Durchtrennung des Ramus sinus carotici konnte dieses Phänomen nicht mehr beobachtet werden. Trotz dieser eindeutigen Hinweise gab es ein gewisses Restrisiko, dass der Karotissinusnerv nicht vollständig durchtrennt wurde oder dass eine Regeneration der durchtrennten Axone im Intervall zwischen Denervierung und Versuch stattfand.

Wird nur ein Teil der Fasern eines peripheren Nerven geschädigt, kommt es zur kollateralen Sprossung. Die von den unversehrten Axone entsendeten Kollateralen können zumindest teilweise den Platz der ausgefallenen Axone einnehmen (Geneser 1990). Nach der vollständigen Durchtrennung peripherer Nerven kommt es regelmäßig zur sogenannten Waller-Degeneration, also dem Zugrundegehen des distal der Durchtrennungsstelle gelegenen Anteils des Nerven (Pschyrembel 1998). Das Axon und die es umhüllenden Myelinscheiden zerfallen. Die Schwann-Zellen aber bleiben unversehrt. Sie phagozytieren die Axonsubstanz und die Myelinscheiden, so dass am Ende eine Röhre übrig bleibt, deren Wand vom Zytoplasma der Schwann-Zellen gebildet wird. Überlebt der Zellkörper eines peripheren Nerven, kommt es gewöhnlich auch zu dessen Regeneration. Nach beidseitiger Transsektion des Karotissinusnerven konnten Roux et al. eine zentrale Reorganisation des arteriellen Chemoreflexweges beobachten. Nach initialer

Degeneration der zentralen Karotissinusnervendigungen kommt es zu einem erneuten Aussprossen im Nucleus tractus solitarius (Roux et al. 2000). Das proximale Axonsegment kann Filopodien ausbilden, deren Enden zu Wachstumskeulen erweitert sind. Sie können in die von den Schwann-Zellen gebildeten Röhren einsprießen und diese als Leitstruktur benutzen. Ist die Entfernung zwischen dem proximalen und distalen Axonstumpf nicht zu groß, benötigen die Filopodien etwa zwei Wochen, um ins distale Segment einzusprießen. Danach wachsen die regenerierten Fasern mit einer Geschwindigkeit von 3 - 4 mm/Tag (bei Säugetieren) bis zum Erfolgsorgan weiter und können Kontakt mit ihm aufnehmen (Geneser 1990). Falls kein regenerierendes Axon in die Röhre einwächst, verdickt sich die Wand und das Lumen verkleinert sich. So entsteht ein bandförmiges Aussehen, weshalb es auch als Büngner-Band bezeichnet wird. In dieser Form kann es noch mehrere Monate bestehen bleiben (Geneser 1990).

Die Degenerationerscheinungen des distalen Segmentes sind zwei bis drei Tage nach der Läsion lichtmikroskopisch nachweisbar und umfassen auch die Endigungen des durchtrennten Axons. Die terminale Degeneration ist sogar eine der ersten der auftretenden Veränderungen und elektronenmikroskopisch schon 12-24 Stunden nach der Läsion zu erkennen. Nach zwei Wochen sind alle Synapsen des distalen Segmentes vollständig degeneriert (Geneser 1990). Nach Durchtrennung des Karotissinusnerven erfolgten die meisten der degenerativen Veränderungen während der ersten sieben Tage (Kondo 1977). McDonald und Mitchel konnten für das Karotiskörperchen der Ratte sogar nachweisen, dass bereits nach vier Tagen die meisten Nervendigungen an der Glomuszelle verschwunden sind (McDonald und Mitchell 1975). Zehn Tage nach Durchtrennung des N. glossopharyngeus sank die Innervation der Glomuszelle auf unter fünf Prozent im Vergleich zu nicht denervierten Kontrollpräparaten der Gegenseite. Auch die Entfernung zum Läsionsort beeinflusst das zeitliche Auftreten der terminalen Veränderungen. Die geringe Entfernung zwischen Karotiskörperchen und Läsionsort führt höchstwahrscheinlich sogar zu einer schnelleren Degeneration der Endigungen. Zwischen der Durchtrennung des Ramus sinus carotici und der Untersuchung der Karotiskörperchenpräparate dieser Arbeit lagen im Mittel $13,4 \pm 6,2$ Tage, so dass von vollständig degenerierten Synapsen ausgegangen werden kann.

Um die unvollständige Durchtrennung und die Regeneration des Karotissinusnerven auszuschließen, wurde auch bei den denervierten Karotiskörperchen bei jeder Messung die Ableitbarkeit von Aktionspotentialen (wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben) überprüft. Eine Einschränkung zentraler chemosensorischer Wirkungen nach der einseitigen Durchtrennung des Karotissinusnerven ist eher unwahrscheinlich (Busch et al. 1983).

5.1.3 Narkose, Entnahme und Präparation des Karotiskörperchens

Zur Durchführung aussagekräftiger *in vitro*-Messungen am Karotiskörperchen muss das Gewebe möglichst lange nahe seinen physiologischen Bedingungen gehalten werde. Um das zu gewährleisten, war eine möglichst schonende und rasche Entnahme des Präparates erforderlich. Außerdem mussten störende Substanzen, hier vor allem das Hämoglobin, aus dem Gewebe entfernt werden.

Die schonende Entnahme des Karotiskörperchens beginnt bereits mit einer suffizienten Narkose. Sie sollte das Versuchstier möglichst stressfrei und wenig atem- und kreislaufdepressiv auf die Präparation vorbereiten. Die als Narkotikum verwendete Chloralose-Urethan-Mischung weist im Vergleich zu anderen Narkotika nur einen geringen Einfluss auf die hypoxische Chemosensitivität auf (Hughes et al. 1982). Die Narkose sollte bis zum Einsetzen des Präparates in die Versuchsapparatur durch mehrfaches Spülen außerhalb des Tieres und durch Überschreiten der Halbwertszeit ausgewaschen sein. Von einer pharmakologischen Beeinflussung der Sensorfunktion des Karotiskörperchens durch die Narkose wurde nicht ausgegangen.

Die Entnahme der Karotibifurkationen erfolgte nach Euthanasierung der unbeatmeten Tiere. Anschließend diente eine unbegaste Locke-Lösung zur Präparation und Aufbewahrung der Körperchen. Durch das Fehlen der Beatmung bzw. Begasung war eine zusätzliche Belastung der Präparate denkbar. Um diese Belastung möglichst gering zu halten, wurden Lösungen mit einer Temperatur von 0 °C verwendet, was eine starke Herabsetzung des Stoffwechsels der Präparate bewirkte. Zur weiteren Schonung wurde der pH-Wert unbegaster Lösungen auf den physiologischen Wert von 7,28 eingestellt. Ausgehend davon, dass der

Sauerstoffpartialdruck in gut durchlüftetem Wasser und in der darüber befindlichen Luft gleich groß ist, sollte der Sauerstoffpartialdruck der ungegasten Locke-Lösung 150-160 mmHg betragen (Pschyrembel 1998). Unter diesen Bedingungen sind Karotiskörperchenpräparate selbst nach einer 24-stündigen Aufbewahrungszeit noch voll funktionsfähig.

Die Präparation des intakten Karotiskörperchens und seines Nerven erfolgte sehr sorgfältig und mit größter Vorsicht. Bei der Präparation könnte der empfindliche Nerv beispielsweise durch versehentliche Berührung mit den Präparationsinstrumenten oder Dehnung beim Herausoperieren der Karotisbifurkation traumatisiert werden, was die Aufnahme der Spikerate beeinflussen würde (Vidruk et al. 2001). Auch das Gewebe des Karotiskörperchens könnte durch einen zu hohen Druck beim Spülen geschädigt werden. Das mehrfache Spülen sowie die systemische Heparinisierung waren nötig, um blut- und damit hämoglobinfreie Präparate zu erhalten. Das Vorhandensein von Hämoglobin führt bei Hypoxie zu nicht messbaren Veränderungen in der Cytochromabsorption, denn die durch das Hämoglobin verursachten Absorptionsveränderungen sind zehn Mal größer als die der Cytochrome und liegen im Bereich ähnlicher Wellenlängen (Lahiri et al. 1999). Eine Reizung oder Schädigung der Strukturen durch die verwendete Narkose oder die Präparationstechnik war trotzdem denkbar.

5.1.4 Aufbau der Messeinrichtung und Versuchsablauf

Bevor das präparierte Karotiskörperchen in die Versuchsanordnung eingesetzt werden konnte, waren umfangreiche Vorbereitungen nötig. Der Begasungskolben mit angeschlossenem Superfusionskreislauf musste rechtzeitig mit Locke-Lösung befüllt werden, die Superfusionslösung mittels des Thermostats auf 37 °C erwärmt und der pH-Wert durch die Begasung mit CO₂ auf den gewünschten Wert von 7,28 eingestellt werden. Die Vorbereitungen sollten möglichst physiologische Umweltbedingungen für das eingesetzte Präparat schaffen. Dies wurde direkt vor dem Einsetzen durch eine Probeentnahme aus der Superfusionslösung kontrolliert. Die benötigten Lösungen wurden frisch aus einer Stammlösung hergestellt oder nach gründlichem Mischen und erneuter Kontrolle der Kalziumionenkonzentration und des pH-Wertes vom

Vortrag verwendet. Eine Ausnahme bildete die magnesiumhaltige, kalziumfreie Versuchslösung. Sie wurde für jeden Versuch neu hergestellt, da ein Ausfallen des Magnesiums bei längerer Aufbewahrung und somit eine Abnahme der Magnesiumkonzentration in der Lösung zu beobachten war.

Das Einsaugen des präparierten Karotissinusnerven in die Glaselektrode ermöglichte eine Massenableitung aller Aktionspotentiale der eingesaugten Nervenfasern (Spikerate). Weder war eine Einzelfaserableitung möglich noch konnte festgestellt werden, welche (aus der Peripherie oder dem Zentrum des Karotiskörperchens) und wie viele Fasern genau eingesaugt wurden. Damit die Aktionspotentiale optimal abgeleitet werden konnten, musste die Öffnung der Glaselektrode zur Erzielung eines hohen Widerstandes dicht mit Gewebe verschlossen sein und es durfte sich keine versehentlich eingesaugte Luft in der Elektrode befinden. Außerdem musste der Faradaykäfig geschlossen und geerdet sein, damit keine Beeinflussung beispielsweise durch die Netzspannung anderer Geräte auftrat. Das Karotiskörperchen wurde in einem als Lichtblende dienenden Loch im Platinblech abgelegt. Das Auftreten von Spektren verfälschendem Streulicht ließ sich durch die Auswahl eines Loches passender Größe minimieren.

Vom Einsetzen des Präparates bis zum ersten Versuch und zwischen den einzelnen Versuchen lag eine Zeitspanne von durchschnittlich einer halben Stunde, die das Präparat zur Akklimatisierung an die neuen Versuchsbedingungen (z. B. nach dem Lösungswechsel) und zur Regeneration brauchte. Superfundierte Karotiskörperchenpräparate der Ratte benötigen nach einer schweren Hypoxie ca. 30 Minuten bis die Spikerate wieder auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt ist (Lahiri et al. 1999).

Bei den Hypoxieversuchen wurden unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen verwendet. Milde Hypoxien hatten einerseits den Vorteil, dass das Präparat für die späteren Versuche nicht zu stark belastet wurde. Andererseits war eine gute Beurteilung der Aktivität des Karotissinusnerven und des die Lichtabsorptionsspektren verfälschenden Hämoglobingehaltes möglich.

Der Lösungswechsel zwischen Versuchs- und Kontrolllösung erfolgte durch mehrfaches Aussaugen und Wiederbefüllen des Vorratsgefäßes. Vorteilhaft ist die kurze Zeitspanne bis zur Veränderung der gewünschten Ionenkonzentrationen. Nachteilig wirkt sich die abrupte Änderung des pH-Wertes (pH 7,28) durch das Einspülen der neuen Lösung (pH 8,4) aus. Dies bewirkte eine Antwort des Karotiskörperchens mit einer erhöhten Spikerate, was das Präparat zusätzlich belastete. Um diese unerwünschte Belastung des Körperchens zu minimieren, wurde temporär die Begasung mit CO₂ erhöht und dadurch eine schnellere Einstellung des pH-Wertes auf 7,28 in der eingespülten Lösung erzielt.

5.1.5 Sauerstoffversorgung des Karotiskörperchengewebes unter Superfusionsbedingungen

Die Versorgung der Zellen des in der Messkammer fixierten Karotiskörperchens erfolgte durch Diffusion aus der Superfusionslösung. Unter Kontrollbedingungen (37 °C, Begasung mit 28,8% O₂, 67,2% N₂, 4% CO₂) betrug der Sauerstoffpartialdruck der Superfusionslösung ca. 210 mmHg. Aufgrund der Diffusionsstrecke von der Organoberfläche bis ins Innere des Präparates, ist es denkbar, dass die äußeren Zellschichten besser versorgt werden, als die inneren. Als allgemeine Regel für hoch stoffwechselaktive Gewebe wie das Karotiskörperchen gilt: pro µm Entfernung von der Oberfläche des Gewebes nimmt der pO₂ um 1 mmHg ab (Kumar 2007). Bei einer durchschnittlichen Größe von Karotiskörperchenpräparaten der Ratte von 0,5 bis 0,8 mm ist zentral von einem Sauerstoffpartialdruck von circa 1 mmHg auszugehen.

Die Superfusion von Karotiskörperchenpräparaten *in vitro* ist eine zuverlässige und nützliche Methode zum Studium der Mechanismen der Chemorezeptorerregung (Eyzaguirre und Lewin 1961, Verna et al. 1981). Beobachtete Zellschäden nach einer sechsständigen Superfusionszeit bei Kaninchen-Karotiskörperchen scheinen unabhängig von der Lokalisation der Zellen im Präparat zu sein. Geschädigte Zellen kommen in der Tiefe des Organs nicht häufiger vor als an der Organoberfläche (Verna et al. 1981).

5.1.6 Bewertung der Aussagekraft der verwendeten Versuchsmethode

Die *in vitro* Untersuchung von superfundierten Karotiskörperchenpräparaten der Ratte bietet für das Verständnis der Funktion arterieller Chemorezeptoren gegenüber anderen Untersuchungsmethoden einige Vorteile. Es ist möglich, direkte Beziehungen zwischen der Veränderung „natürlicher Reize“ (pO_2 , pCO_2 , pH) des Chemosensors und der chemosensorischen Nervaktivität aufzuzeigen (Zapata und Larraín 2005). Die Präparation erlaubt außerdem die Beobachtung von direkten pharmakologischen Effekten auf den Chemorezeptorapparat. Im Gegensatz zu den *in situ* Präparationen kommt es nicht zu barosensiblen Überlagerungen oder anderen Wechselwirkungen mit dem Organismus (z. B. Osmolarität, Temperatur des Blutes, Blutfluss durch das Präparat).

Mit Hilfe des in dieser Arbeit verwendeten Versuchsaufbaus war es möglich, gleichzeitig die Nervaktivität und die Differenzabsorptionsspektren zu registrieren. Dadurch konnte eine direkte Beziehung zwischen der Reizung des Präparates und den zwei parallel aufgenommenen Antwortsignalen hergestellt werden.

5.2 Diskussion der Bestimmung der Messgrößen

5.2.1 Registrierung der Absorptionsspektren und Differenzabsorptionsspektren des Karotiskörperchengewebes

Die Absorptionsspektroskopie ist eine in der Analytischen Chemie etablierte Methode zur Untersuchung von Proteinen (Acker et al. 2004, Gorlach et al. 1993, Schmidt 2000). Da in der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung der Cytochrome im Rahmen des Mitochondrienmodells des Sauerstoffsensings untersucht werden sollte und Cytochrome Häm-enthaltende Proteine sind, wurde die Methode der Absorptionsspektroskopie gewählt. Chromophore Gruppen wie z. B. Porphyrine (Hämoglobin, Cytochrom c) zeigen Absorption im sichtbaren Licht und sind daher farbig. Für die Cytochrome der Atmungskette existieren charakteristische Absorptionsspektren im oxidierten und reduzierten Zustand. Somit waren vergleichende Untersuchungen mit Referenzspektren möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde ein in der Untersuchung des Sauerstoffsensors übliches Verfahren benutzt (Acker et al. 1992, Acker et al. 2004, Ehleben et al. 1998a, Lahiri und Acker 1999, Lahiri et al. 1999, Mills und Jöbsis 1972, Warncke 2011).

Bereits während der Registrierung der Absorptionsspektren erfolgte eine orientierende Beurteilung bezüglich des Hämoglobingehaltes. Die Verfälschung der Absorptionsspektren durch das Vorhandensein von Hämoglobin war der häufigste Grund für einen Versuchsabbruch. Ein anderer, seltenerer Grund war die schlechte Justierbarkeit des Körperchens in der Lochblende mit Verfälschung der Spektren durch vorbeifallendes Licht. Dies war vor allem bei sehr kleinen Karotiskörperchen ein Problem. Gelegentlich war eine Auswertung der spektralen Reaktion aufgrund von Gewebezestörung unmöglich. Diese zeigte sich in der Aufnahme von sehr geraden Spektren nach Stimulation. Die Ursache hierfür war in der Regel ein zu starkes Spülen des Körperchens während der Präparation.

5.2.2 Dekonvolution der Absorptionsspektren und Ermittlung der relativen spektralen Anteile der einzelnen Cytochrome

Nach Aufnahme der Differenzabsorptionsspektren bei unterschiedlichen Hypoxiestufen erfolgte die Dekonvolution. Die Dekonvolution oder Spektrenentfaltung ist in der Absorptionsspektroskopie eine übliche Methode zur Auflösung eines Spektrums in die einzelnen spektralen Komponenten. In dem relevanten Wellenlängenbereich von 510 bis 630 nm erfolgte die Integrierung bekannter Referenzspektren. Diese Methode schließt an zahlreiche Voruntersuchungen zum O₂-Sensing an (Cross et al. 1990, Ehleben et al. 1998a, Ehleben et al. 1998b, Lahiri und Acker 1999, Lahiri et al. 1999, Warncke 2011).

Die Auswahl der verwendeten Absorptionsspektren erfolgte bei den Versuchen in Kontrolllösung und den Kationenaustauschversuchen unabhängig von der Lokalisation des Karotiskörperchens. Bei den Denervierungsversuchen wurden aus operationstechnischen Gründen ausschließlich Karotiskörperchen der rechten Seite verwendet, da immer nur die rechte Seite denerviert wurde. Durch die Implantation des Spülkatheters in die rechte A. carotis communis waren rechte Karotiskörperchenpräparate oftmals besser gespült. Dadurch gelang häufiger die Aufzeichnung blutleerer Spektren. Aufgrund dessen kam es insgesamt zu einer häufigeren Verwendung von Karotiskörperchenpräparaten der rechten Seite (ein Verhältnis von 45 Präparaten der rechten Seite zu 17 Präparaten der linken Seite). Da es keinen Hinweis auf ein seitendifferentes O₂-Sensing gibt, wurde die Präparationsseite nicht weiter beachtet.

Die Aufnahme der Differenzabsorptionsspektren erfolgte in der Regel in der dritten, vierten und fünften Minute nach der Stimulation. Der Grund für diese Auswahl war, dass sich erst nach ein bis drei Minuten nach Stimulation ein Gleichgewicht in der Organversorgung und der spektralen Reaktion auf den Reiz eingestellt hatte. Sehr selten erfolgte diese Einstellung erst in der vierten Minute. Dann wurden Spektren der vierten, fünften und sechsten Minute zur Auswertung herangezogen.

Die Hypoxieversuche mit der Kontrolllösung zeigen einen Anstieg der Karotissinusnervaktivität, welche in eine frühe phasische und späte tonische

Anstiegskomponente unterteilt werden kann. Durch die Analyse der Differenzabsorptionsspektren der Cytochrome konnte gezeigt werden, dass die relativen Anteile der Spektralgewichte während der tonischen Phase konstant bleiben (Acker et al. 2004). Dies erlaubte eine Mittelwertbildung der relativen spektralen Anteile jedes Cytochroms während dieser Phase.

5.2.3 Messung der Aktivität des Karotissinusnerven

Durch die zeitgleiche Ableitung der Aktionspotentiale sollte sowohl bei den Austauschversuchen als auch bei den Denervierungsversuchen, geprüft werden, ob eine Weiterleitung der Hypoxieantwort stattfindet oder nicht. Dazu wurde das Ableitsignal in ein Spikerate-Aktivitätsmaß transformiert.

Die Verwendung eines Fensterdiskriminators zur Ermittlung der Spikerate des Karotissinusnerven ist ein übliches Verfahren (Lahiri et al. 1999, Tomares et al. 1994, Zapata und Eyzaguirre 1985, Zapata und Larraín 2005). Vorteilhaft sind die wirksame Unterdrückung von Rausch- und Störsignalen durch die Wahl einer geeigneten oberen und unteren Diskriminatorschwelle und die problemlose Signaltransformation. Dieses Verfahren birgt allerdings selbst bei optimaler Einstellung der Schwelle die Gefahr der systematischen Unterschätzung der Aktivität des Nerven. Ursächlich für diese Unterschätzung sind einerseits Aktionspotentiale von weiter von der Platinelektrode entfernt verlaufender Nerven, die unterhalb der unteren Diskriminatorschwelle bleiben (Richter 1979). Andererseits kommt es bei steigender Nervaktivität immer öfter zu zeitlichen Überlagerungen der Spikes im Ableitsignal (Dick et al. 1974), welche dadurch oberhalb der oberen Grenzspannung und damit außerhalb des Diskriminatorbereiches liegen.

Das afferente Chemorezeptorsignal kann mathematisch in eine phasische (schnell adaptierende) und eine tonische (langsam adaptierende) Komponente zerlegt werden (Streller et al. 2002). Aussagen zum zeitlichen Verlauf der Reaktion des N. sinus carotici auf Stimulation wurden in dieser Arbeit nicht getroffen. Diesbezüglich sei auf die Untersuchungen von Streller et al. verwiesen, der das Zeitverhalten der Sensorantwort des Karotissinusnerven ausführlich charakterisierte (Huckstorf et al. 2002, Streller 2000, Streller et al. 2002).

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Absorptionsverhalten und Spikerate bei Hypoxie in Kontrolllösung

Die Analyse der spektralen Reaktion des Karotiskörperchengewebes in den untersuchten Wellenlängenbereichen zeigte eine deutliche spektroskopische Antwort. Es gelang eine fast vollständige Anpassung der Absorptionsspektren mit Hilfe der genannten Cytochrome der Atmungskette, einschließlich des für das Karotiskörperchengewebe einzigartigen Cytochroms a_{592} und der NADPH-Oxidase. Dies gilt ebenso für das Absorptionsverhalten bei Hypoxie in kalziumfreier Versuchslösung und nach vorausgegangener dauerhafter Denervierung des Karotiskörperchens.

Bei den Versuchen mit Kontrolllösung als Superfusionslösung zeigte sich eine Spikerate, wie sie auch aus anderen Untersuchungen bekannt ist (Streller 2000, Warncke 2011). Die Spikerate des Karotissinusnerven bei normoxischen Versuchsbedingungen (arterieller pO_2 ca. 100 mmHg) ist niedrig, steigt aber unverzüglich bei geringstem arteriellen pO_2 Abfall (80-60 mmHg) an (Biscoe et al. 1970, Eyzaguirre und Lewin 1961, Vidruk et al. 2001). Die nervale Antwort erfolgt innerhalb von Sekunden nach Beginn der Hypoxie (Ponte und Purves 1974). Der zeitliche Verlauf der Reaktion des Karotissinusnerven auf den Reiz Hypoxie wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht. Für die Fragestellung dieser Arbeit wurden das Auftreten einer hypoxiebedingten Zunahme der Nervaktivität oder das Fehlen dieser Reaktion als ausreichend angesehen. Umfangreiche Untersuchungen zum Zeitverhalten der Sensorantwort des Karotissinusnerven wurden von Streller et al. durchgeführt (Streller 2000, Streller et al. 2002).

5.3.2 Absorptionsverhalten und Spikerate bei Hypoxie in kalziumfreier Versuchslösung

Das Absorptionsverhalten bei Hypoxie in Kontrolllösung und kalziumfreier Versuchslösung zeigt die im Kapitel 4.4.3 dargestellten, statistisch abgesicherten

Ergebnisse. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der spektralen Reaktion zwischen den Kontrollversuchen und den Versuchen in kalziumfreier, magnesiumhaltiger Versuchslösung für alle fünf untersuchten Cytochrome. Das Verhalten der Cytochrome bei Hypoxie ist also unbeeinflusst von der extrazellulären Kalziumkonzentration. In Abwesenheit von Kalzium kann somit im Vergleich zu Normalbedingungen (Kontrolllösung) von einer unverändert funktionierenden Atmungskette im Karotiskörperchen der Ratte ausgegangen werden.

Die zeitgleiche Ableitung der Aktivität des Karotissinusnerven im Rahmen der Austauschversuche zeigte die in Kapitel 4.5.2 exemplarisch angegebenen Ergebnisse. Bei Abwesenheit von Kalzium in der Superfusionslösung kam es zu keiner oder nur einer ganz geringen afferenten Aktivität des Karotissinusnerven. Es ist bekannt, dass bei starker Herabsetzung der extrazellulären Kalziumkonzentration die chemisch-synaptische Übertragung unterbrochen wird (Augustine et al. 1987, Schmidt et al. 2011). Bei gleichzeitig unverändert registriertem Absorptionsverhalten der Cytochrome ist davon auszugehen, dass der eigentliche chemosensorische Vorgang trotzdem abläuft. Es ist denkbar, dass das extrem sauerstoffsensible Cytochrom a_{592} bereits bei milder Hypoxie vermehrt reduziert vorliegt. Dadurch könnte es als Protonenpumpe ausfallen und so zu einer Depolarisation des mitochondrialen transmembranären Potentials führen mit nachfolgender mitochondrialer Kalziumfreisetzung. Die mitochondriale Kalziumfreisetzung allein scheint aber ohne den extrazellulären Kalziumeinstrom (bei Abwesenheit von Kalzium in der Versuchslösung der Kationenaustauschversuche) beziehungsweise bei wahrscheinlich verminderter intrazellulärer Kalziumkonzentration (infolge der Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium) nicht auszureichen, um eine ausreichende Transmitterfreisetzung und damit eine messbare Spikerate am Karotissinusnerven auszulösen. Zu ähnlichen Untersuchungsergebnissen an Katzenkarotiskörperchen kamen auch Iturriaga und Lahiri (Iturriaga und Lahiri 1994) und Buerk et al. (Buerk et al. 1997).

Kationenaustauschversuche wurden schon 1994 von Iturriaga und Lahiri an *in vitro* Präparationen von Katzenkarotiskörperchen durchgeführt (Iturriaga und Lahiri 1994). Von den zusammen mit der Karotisbifurkation entnommenen und gleichzeitig perfundierten sowie superfundierten Körperchen konnte parallel zur Stimulation die

Spikerate des Karotissinusnerven abgeleitet werden. Das Antwortverhalten auf die Reize Hypoxie, Hyperkapnie und Nikotin bei verschiedenen zusammengesetzten Perfusaten wurde untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass bereits sehr geringe Kalziumkonzentrationen, wie sie bei den Versuchen mit kalziumfreier Tyrodelösung ohne den Zusatz des Komplexbildners EGTA auftraten, zur Aufrechterhaltung der Chemorezeption für Sauerstoff ausreichen (nur mäßig reduzierte Hypoxieantwort). Bei der Abwesenheit von Kalzium (kalziumfreie Tyrode-Lösung und 1 mM EGTA) war auch die Hypoxieantwort größtenteils verschwunden. Die Verwendung der kalziumfreien Tyrode-Lösung zusammen mit dem Komplexbildner EGTA senkte sofort die Grundaktivität des Karotissinusnerven. Es gab keine Zunahme der Nervaktivität bei Hypoxie, Hyperkapnie und Nikotin. Nach Entfernung von EGTA aus dem Perfusat war die Hypoxieantwort wieder hergestellt, die Antwort auf Hyperkapnie aber blieb reduziert. Die Untersucher schlussfolgerten daraus, dass es bei Hypoxie neben dem Kalziumeinstrom auch zu einer Freisetzung aus intrazellulären Speichern kommen könnte, da die Hypoxieantwort bei gleich niedrigen Kalziumkonzentrationen im Vergleich mit den Antworten auf Hyperkapnie und Nikotin am wenigsten vermindert war (Iturriaga und Lahiri 1994).

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Buerk et al. veröffentlicht. Hier konnte eine Abnahme der Sauerstoffempfindlichkeit in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration im Perfusat für Karotiskörperchenpräparate von Katzen nachgewiesen werden (Buerk et al. 1997). Zusätzlich zeigten sie, dass der Sauerstoffverbrauch unbeeinflusst von der Höhe des extrazellulären Kalziums war und somit die Abnahme der Sauerstoffempfindlichkeit nicht auf eine Abnahme des Metabolismus zurückgeführt werden darf (Buerk et al. 1997).

Austauschversuche mit den extrazellulären Kationen Kalzium und Magnesium wurden auch an Co-Kulturen von Typ-I-Zell-Clustern und Neuronen des Ganglion petrosum von Ratten durchgeführt (Zhong et al. 1997). Nach Zugabe der Ganglienzellen zu den Typ-I-Zell-Cluster enthaltenden Monolayern bildeten die Ganglienzellen neue Synapsen mit verschiedenen Typ-I-Zell-Clustern und ihre Neurone zeigten eine spontane Aktivität mit Spikes und unterschwelligen Potentialen. Eine Veränderung der extrazellulären Kationenkonzentration führte zu einer deutlichen, reversiblen Unterdrückung der spontanen Aktivität der

Ganglienneurone bei geringen Kalziumkonzentrationen (0 mM) und hohen Magnesiumkonzentrationen (10 mM) im Vergleich zur Kontrolllösung (2 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+}).

Um den Ursprung des intrazellulären Kalziumanstiegs in isolierten Glomuszellen der Ratte nach Reizung mit Acetylcholin zu untersuchen wurden ebenfalls Versuche in kalziumfreier Lösung mit Zusatz von 1 mM EGTA durchgeführt (Jiang und Eyzaguirre 2004). Die unter diesen Versuchsbedingungen gemessenen intrazellulären Kalziumkonzentrationen waren gegenüber der Kontrolle ausnahmslos vermindert, fielen aber nur auf den Wert Null, wenn der basale Kalziumwert schon stark reduziert war. Nach Reizung der Zellen mit Acetylcholin blieben die intrazellulären Kalziumkonzentrationen auf ihrem geringen Ausgangsniveau. Das führte zu der Schlussfolgerung, dass der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bei Acetylcholinreizung durch den Einstrom von extrazellulärem Kalzium verursacht sein muss.

Erschwerend kommt hinzu, dass für die Typ-II-Zelle eine gewisse Rolle in der Signaltransduktion nicht ausgeschlossen werden kann. Wie Xu et al. berichten, führt die Applikation von ATP zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der Typ-II-Zelle (Xu et al. 2003). Eine anschließende Exozytose konnte jedoch nicht beobachtet werden. Allerdings könnte eine ATP-abhängige ATP-Freisetzung ein möglicher parakriner Mechanismus mit Beeinflussung der chemosensorischen Synapse sein (Nurse 2014). Auch andere Neuromodulatoren des Karotiskörperchens scheinen die intrazelluläre Kalziumkonzentration in der Typ-II-Zelle zu beeinflussen (Tse et al. 2012).

Die Rolle des Kalziums bei der Hypoxieantwort des Karotiskörperchens ist noch nicht vollständig geklärt. Die Forschungsergebnisse zu diesem Thema sind widersprüchlich. Während zum Beispiel Duchon und Biscoe einen Anstieg des intrazellulären Kalziums bei Hypoxie gemessen haben (Duchon und Biscoe 1992), behaupten Kholwadwala und Donnelly das Gegenteil (Kholwadwala und Donnelly 1992). Höchstwahrscheinlich ist aber der Einstrom von Kalzium durch spannungsabhängige Kanäle mitbestimmend für die Hypoxieantwort des Glomus caroticum (Buckler und Vaughan-Jones 1994, González et al. 1992, Shirahata und

Fitzgerald 1991, Wyatt und Buckler 2004). Nach der durch eine Hypoxie ausgelösten Depolarisation sollen sich spannungsabhängige Kalziumkanäle öffnen und den Kalziumeinstrom in die Glomuszelle ermöglichen. Hingegen gib es Daten, die zeigen, dass eine Hypoxie auch zu einer Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Vesikeln, vornehmlich den Mitochondrien, führen kann (Duchen und Biscoe 1992). Allerdings sind Stoffe, welche zur Entleerung von intrazellulären Kalziumspeichern führen (Koffein, Ryanodin, Thapsigargin und Cyclopiazonsäure), nicht in der Lage, ausreichend große Veränderungen des intrazellulären Kalziumspiegels zu bewirken und so eine Neurosekretion bei intaktem Karotiskörperchen oder eine Zelldepolarisation bei isolierten Karotiskörperchenpräparaten auszulösen (Obeso et al. 1996, Vicario et al. 2000, Wyatt und Buckler 2004). Dieselben Untersucher konnten aber auch bestätigen, dass Mitochondrien bei der sauerstoffabhängigen Beeinflussung von Kaliumkanälen eine große Rolle spielen, wobei der genaue Mechanismus (ev. über eine Regulierung des Energiehaushaltes oder ATP) unklar bleibt.

Neueste Untersuchungen von neonatalen Typ-I-Zell-Clustern der Ratte mit Verwendung von kalziumfreien Medien oder sogar mit zusätzlicher Verwendung von Kalziumkanalantagonisten wie Ni^{2+} zeigten, dass die Hypoxieeffekte auf das Membranpotential der Mitochondrien nicht von der Höhe des zytosolischen Kalziumspiegels abhängen (Buckler und Turner 2013). Buckler und Turner fanden heraus, dass Hypoxie den Elektronentransport selbst bei partiell depolarisierten Mitochondrien und unabhängig von der ATP-Synthese hemmen kann (Buckler und Turner 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte dies bestätigt werden. Die Untersuchungen zeigten von der extrazellulären Kalziumkonzentration unbeeinflusste Absorptionsspektren der mitochondrialen Cytochrome des Karotiskörperchens der Ratte bei Hypoxie. Somit kann bei Abwesenheit von Kalzium von einer im Vergleich zu Normalbedingungen (Kontrolllösung) unverändert funktionierenden Atmungskette im Karotiskörperchen der Ratte ausgegangen werden. Dennoch kommt es nicht zu einer Zunahme der Nervaktivität unter Hypoxie. Als Grund dafür ist vermutlich ein nicht ausreichender Kalziumanstieg in der Typ-I-Zelle anzunehmen, der die Ausschüttung entsprechender Transmitter auslösen würde. Eine hypoxiebedingte Kalziumfreisetzung allein aus den Mitochondrien der

Typ-I-Zelle durch eine Depolarisation des mitochondrialen transmembranären Potentials scheint bei fehlendem extrazellulärem Kalzium nicht ausreichend zu sein.

5.3.3 Absorptionsverhalten und Spikerate bei Hypoxie nach vorausgegangener dauerhafter Denervierung

Es gibt umfangreiche Voruntersuchungen zur beidseitigen Transsektion des Karotissinusnerven bei Säugetieren (Martin-Body et al. 1986, Mouradian Jr et al. 2012, Roux et al. 2000, Sabino et al. 2013, Serra et al. 2001) und beim Menschen (Timmers et al. 2003). Sehr wenige Untersucher beschäftigten sich allerdings mit der Frage der einseitigen Durchtrennung des Karotissinusnerven (Niewinski et al. 2013, Pequignot et al. 1991, Timmers et al. 2003). In der zugänglichen Literatur fanden sich keine Untersuchungen der Spektralgewichte der Cytochrome nach einseitiger oder beidseitiger Durchtrennung des Karotissinusnerven.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung des spektralen Verhaltens der Karotiskörperchenpräparate unter Hypoxie sind in Kapitel 4.4.3 dargestellt. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der spektralen Reaktion der Kontrollversuche im Vergleich zu den Versuchen nach vorausgegangener dauerhafter Denervierung für die Cytochrome b_{558} , b_{563} , a_{592} und a_{603} . Es konnte für das Cytochrom c_{550} als einziges der untersuchten Cytochrome ein sehr signifikanter Einfluss ($p \leq 0,01$) in Abhängigkeit von der durchgeführten Versuchsreihe nachgewiesen werden. Bei genauer Betrachtung war dieser nur zwischen Versuchen in Kontrolllösung und Denervierungsversuchen sowie zwischen Versuchen in kalziumfreier Versuchslösung und Denervierungsversuchen (beides $p \leq 0,01$) nachweisbar. Nach Durchtrennung des Karotissinusnerven kam es zu deutlich reduzierten relativen Spektralgewichten für das Cytochrom c_{550} bei allen drei verwendeten Hypoxiestufen. Die unterschiedliche spektrale Reaktion könnte auf die deutlich schwierigeren Versuchsbedingungen bei denervierten Präparaten zurückzuführen sein. Nach Denervierung bildete sich in der Regel ein kräftiges Narbengewebe im Operationsgebiet aus. Dies erschwerte die Entnahme und die Feinpräparation der Karotiskörperchenpräparate erheblich. Da es signifikante Abweichungen in der spektralen Reaktion vor allem in den Cytochromen mit den Absorptionsmaxima in den kurzwelligen Bereichen gibt und Narbengewebe für

kurzwelliges Licht schwieriger zu durchstrahlen ist, könnte dies eine Erklärung für die spektrale Veränderung sein. Außerdem waren die Versuchstiere der Denervierungsversuche im Mittel 20 g schwerer ($301,7 \pm 54,1$ g) als die Tiere der Versuche in Kontrolllösung ($282,7 \pm 65,1$ g) bzw. kalziumfreier Versuchslösung ($280,0 \pm 94,3$ g). Das höhere Körpergewicht führte ebenfalls zu erschwerten Operationsbedingungen aufgrund der Zunahme des subkutanen Fettgewebes.

Eine andere Ursache für die Abnahme der relativen Spektralgewichte des Cytochroms c_{550} könnte auch durch ein Voranschreiten des Alterungsprozesses in den feingeweblichen Strukturen des Karotiskörperchens zu erklären sein. Im Mittel lag eine Zeitspanne von $13,4 \pm 6,2$ Tage zwischen der Durchtrennung des Karotissinusnerven und dem eigentlichen Versuch. Die Effekte des Alterns von Typ-I-Zellen junger (2-3 Monate) und alter (22 Monate) Wistar Ratten wurden von Di Giulio et al. untersucht (Di Giulio et al. 2009). Der Alterungsprozess ist unter anderem mit einer Abnahme der Anzahl der Mitochondrien und ihres Volumens verbunden. Obwohl dies und auch ein Anstieg des Volumenverhältnisses zwischen Zytoplasma und Mitochondrien in der Typ-1-Zelle bei alten Ratten beobachtet wurde und eine Beeinflussung der spektralen Reaktion bei älteren Tieren somit denkbar wäre, ist diese Beeinflussung in der vorliegenden Arbeit eher unwahrscheinlich. Ein Altersunterschied von knapp 14 Tagen kann als zu gering betrachtet werden.

Auf der Suche nach der Ursache der reduzierten relativen Spektralgewichten für das Cytochrom c_{550} nach vorausgegangener dauerhafter Denervierung des Karotiskörperchens war auch das Verhältnis der Atmungskettenkomplexe zueinander interessant. In den Untersuchungen von Benard et al. konnte gezeigt werden, dass dieses Verhältnis in den Mitochondrien unterschiedlicher Gewebearten der Ratte variiert (Benard et al. 2006). In isolierten Mitochondrien aus Herz, Gehirn, Skelettmuskulatur, Leber und Niere von Ratten konnten unterschiedliche Verhältnisse der Atmungskettenkomplexe zueinander nachgewiesen werden. Außerdem konnten Benard et al. feststellen, dass in den unterschiedlichen Geweben nicht nur unterschiedliche Mengen an Mitochondrien vorhanden waren, sondern auch, dass unterschiedliche Mitochondrientypen mit einer möglicherweise variablen Anzahl von Atmungskettenkomplexen vorlagen. Die kalkulierten stöchiometrischen Verhältnisse zwischen Cytochrom c und Komplex IV der Atmungskette variierten

stark zwischen $1,4 \pm 0,3$ in der Rattenleber und $4,4 \pm 1,1$ im Nervengewebe der Ratten (Benard et al. 2006). Das kann bedeuten, dass das Hirngewebe viel mehr Cytochrom c im Verhältnis zum Komplex IV aufweist als die anderen untersuchten Gewebearten. Man könnte also schlussfolgern, dass nach Degeneration der Nervendigungen des Karotissinusnerven, welche formal dem Hirngewebe zugerechnet werden, vermehrt Cytochrom c im Verhältnis zum Komplex IV fehlt und dies die reduzierte spektrale Antwort von Cytochrom c_{550} erklären könnte.

Da die Nervenfasern einschließlich der Nervendigung nach der Durchtrennung degenerieren, gehen auch die sich in der Nervendigung befindenden Mitochondrien zugrunde. Zu beachten ist allerdings auch, dass alle Absorptionsänderungen immer eine Summe von Cytochromen in Zellen mit unterschiedlicher Funktion sein müssen, also solchen mit und solchen ohne O_2 -Sensor-Funktion, wobei die Glomuszellen und somit auch deren Mitochondrien den Typ-II-Zellen zahlenmäßig um den Faktor drei bis fünf überlegen sind (McDonald und Mitchell 1975). Die aufgenommenen Absorptionsspektren enthalten aber neben den Absorptionsveränderungen der mitochondrialen Cytochrome auch Veränderungen des nicht-mitochondrialen Cytochroms b_{558} der NADPH-Oxidase, des Cytochroms b des Hämoglobins (siehe Kapitel 5.2.1) und des Cytochroms P450. Das Cytochrom P450 ist für die vorliegende Arbeit ohne Relevanz, da der untersuchte Wellenlängenbereich sich von 510 bis 630 nm erstreckte und somit außerhalb des Absorptionsmaximums dieses Cytochroms lag. Neben dem Problem der Differenzierung dieser einzelnen Cytochrome ist zusätzlich nur eine Beobachtung derselben ohne Unterscheidung nach unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle möglich.

Diese Schwierigkeiten machen es momentan unmöglich, die genaue Ursache für die Veränderung der relativen spektralen Anteile des Cytochroms c_{550} nach vorausgegangener dauerhafter Denervierung des Karotiskörperchen zu erklären. Allerdings bestand kein statistisch signifikanter Unterschied in der spektralen Reaktion der Versuche nach vorausgegangener dauerhafter Denervierung im Vergleich zu den Kontrollversuchen für die Cytochrome b_{558} , b_{563} , a_{592} und a_{603} . Somit ist eine intakte und voll funktionstüchtige Atmungskette im Karotiskörperchen der Ratte auch nach Durchtrennung und Degeneration des Karotissinusnerven und seiner Synapsen wahrscheinlich.

Einige Untersucher beschäftigten sich schon früher mit Fragen zur einseitigen Durchtrennung des Karotissinusnerven (Niewinski et al. 2013, Pequignot et al. 1991, Timmers et al. 2003).

Aus den Untersuchungen von Timmers et al. ist bekannt, dass die einseitige Denervierung der Chemo- und Barorezeptoren des Glomus caroticum beim Menschen zu einem persistierenden Abfall der vagalen und sympathischen Baroreflexsensitivität sowie zu einem Anstieg der Blutdruckvariabilität führt, nicht aber zu der Entwicklung einer Hypertonie. Ein Unterschied zwischen rechts- oder linksseitiger Denervierung des Barorezeptors konnte nicht beobachtet werden. Umgekehrt führte die Denervierung des Chemorezeptors zu einer persistierenden Aufhebung der normokapnischen Atemantwort auf Hypoxie und reduzierte die Atemantwort auf Hyperkapnie.

Vergleichende Untersuchungen nach unilateraler Transsektion des Karotissinusnerven von Ratten wurden von Pequignot et al. durchgeführt. Sie untersuchten den Einfluss langandauernder Hypoxien (10% O₂ über eine und drei Wochen) auf das Vorhandensein von Katecholaminen und die Vaskularisierung der Karotiskörperchen (Pequignot et al. 1991). In den intakten, nicht denervierten Körperchen verursachte die langandauernde Hypoxie einen erhöhten Umsatz von Dopamin und Norepinephrin, eine Zunahme der Blutgefäßdichte und eine Abnahme der Dichte des Glomusgewebes. Die Transsektion des Karotissinusnerven reduzierte, aber beseitigte nicht den durch die langandauernde Hypoxie verursachten erhöhten Dopamin- und Norepinephrinsatz. Die strukturellen Veränderungen (Zunahme der Blutgefäßdichte, Abnahme der Dichte des Glomusgewebes) infolge der chronischen Hypoxie zeigten sich unbeeinflusst von der Intaktheit des Karotissinusnerven auch in den denervierten Karotiskörperchenpräparaten. Immunzytochemische Studien zeigten das Vorhandensein von Nervenfasern, die eine Neuropeptid Y ähnliche Immunreaktivität aufwiesen und nach Durchtrennung des Karotissinusnerven persistierten. Nervenfasern, die eine Substanz P-ähnliche Immunreaktivität zeigten, wurden nur in den intakten und nicht in den denervierten Karotiskörperchenpräparaten gefunden. Pequignot et al. schlussfolgerten, dass der Karotissinusnerv bei langandauernder Hypoxie einen stimulierenden, efferenten Einfluss auf die Synthese und Freisetzung von Dopamin und Norepinephrin im Karotiskörperchen der Ratte ausübt. Er scheint aber keinen nennenswerten Einfluss auf die Vaskularisierung des Glomus caroticum zu haben. Substanz P, als typisches

Peptid und Marker für sensorische Nervenfasern, war nach KSN-Transsektion nicht mehr nachweisbar (Pequignot et al. 1991).

Es gibt drei Arten von Nervenfasern im Karotissinusnerven, die bei Hypoxie erregt werden könnten: afferente Fasern, preganglionäre parasympathische Fasern und postganglionäre sympathische Fasern (Pequignot et al. 1991). Es gibt keine Einigkeit darüber, ob viele oder sogar alle Nervenendigungen an der Typ-I-Zelle afferent sind (Verna 1979). In der Ratte sind ca. 10% der sensorischen Nervendigungen an der Typ-I-Zelle über reziproke Synapsen mit der Glomuszelle verbunden (McDonald und Mitchell 1975, Pallot und Blakeman 1986), was zu der Theorie einer gegenläufigen Aktivierung der Glomuszelle durch sensorische Fasern des Karotissinusnerven geführt hat (McDonald und Mitchell 1975). In der Ratte sind die efferenten Fasern, die im KSN verlaufen, hauptsächlich preganglionäre parasympathische Axone, die Ganglionzellen im Inneren des Karotiskörperchens versorgen (McDonald und Mitchell 1975). Axone, hervorgebracht von den Ganglienzellen, enden nahe der Blutgefäße und haben vasodilatatorische Eigenschaften. Zuletzt gibt es noch einige postganglionäre sympathische Fasern, die im Karotissinusnerven verlaufen. Diese Fasern sind nicht immer nachweisbar und ihre physiologische Rolle ist noch unklar (Verna 1979).

Aus Tierversuchen sind die akuten Folgen einer Chemorezeptor-Denervierung des Karotiskörperchens wie Hypoventilation, Apnoe, eine variable Abnahme der Atemempfindlichkeit auf Hypoxie und Abschwächung der CO₂-Sensitivität bekannt (Mouradian Jr et al. 2012). Das Auftreten einer (zum Teil nur partiellen) Wiederherstellung der Chemoreflexfunktion variiert zwischen den Spezies und ist häufiger bei neugeborenen als bei erwachsenen Tieren zu beobachten. Außerdem sind die Effekte nach beidseitiger Denervierung größer als nach einseitiger Denervierung (Forster et al. 2000). Bei denervierten Ratten verschwindet anfangs die Reaktionsbereitschaft auf Hypoxie, erholt sich allerdings über Wochen bis hin zum halben Ausgangsniveau (Martin-Body et al. 1986). Diese Kompensation resultiert entweder durch einen vermehrten Einfluss der aortalen oder intestinalen Chemorezeptoren oder sehr wahrscheinlicher durch zentrale Mechanismen. Die Wiederherstellung des peripheren O₂-Chemoreflexes nach Denervierung erfolgt nicht durch Reinnervation oder Wiederaufnahme der Karotiskörperchen-Chemosensitivität, was durch die fehlende Atmungsstimulation nach Injektionen von

NaCN in die A. carotis communis bei verschiedenen dauerhaft denervierten Säugetieren bewiesen werden konnte (Forster 2003). Die zeitgleiche Ableitung der Aktivität des Karotissinusnerven im Rahmen der Denervierungsversuche zeigte die in Kapitel 4.5.3 exemplarisch angegebenen Ergebnisse. Sie diente hauptsächlich der Kontrolle der Denervierung. Es sollte sichergestellt werden, dass nur spektrale Reaktionen von denervierten Präparaten aufgenommen werden. Konnte auch auf hypoxische Stimulation hin keine Nervantwort aufgenommen werden, war der Karotissinusnerv sicher durchtrennt.

5.3.4 Vergleich von Absorptionsverhalten und Spikerate bei Hypoxie zwischen den drei Versuchsreihen

Die Analyse der spektralen Reaktion des Karotiskörperchengewebes in den untersuchten Wellenlängenbereichen zeigte in allen drei durchgeführten Versuchsreihen eine deutliche spektroskopische Antwort. Es gelang eine fast vollständige Anpassung der Absorptionsspektren mit den genannten Cytochromen der Atmungskette, einschließlich des für das Karotiskörperchengewebe einzigartigen Cytochroms a_{592} und der NADPH-Oxidase.

Die statistische Analyse der relativen Spektralgewichte der fünf untersuchten Cytochrome aller drei Versuchsreihen zeigte signifikante Unterschiede der spektralen Reaktion der Cytochrome in Abhängigkeit von der Hypoxiestufe für die Cytochrome c_{550} , b_{563} , a_{592} und a_{603} . Zwischen den Hypoxiestufen 50 mmHg und 70 mmHg Sauerstoffpartialdruck wurden die Spektralgewichte der genannten Cytochrome signifikant und bei den Cytochromen c_{550} und a_{592} sogar sehr signifikant ($p \leq 0,01$) beeinflusst. Der Grad der Hypoxie beeinflusste die Höhe der relativen Spektralgewichte zwischen den Hypoxiestufen 50 mmHg und 100 mmHg sowie 70 mmHg und 100 mmHg (mit Ausnahme des Cytochroms c_{550} zwischen 50 mmHg und 100 mmHg) nicht signifikant. Lediglich für die spektrale Reaktion des Cytochroms b_{558} der NADPH-Oxidase konnte kein Einfluss des Faktors Hypoxiestufe nachgewiesen werden.

In Untersuchungen von Chemorezeptoren der Lunge konnte ebenfalls kein Einfluss des Faktors Hypoxie auf die relativen Spektralgewichte von Cytochrom b_{558} nachgewiesen werden (Sommer 2011). In spektroskopischen Untersuchungen der Redoxveränderungen mitochondrialer Cytochrome von Hollis et al. an intakten Säugetierzellen (menschliche Leukozyten), wurden auch keine Veränderungen des Redoxstatus der Cytochrome von Komplex II der Atmungskette (Cytochrom c_1 und b_{560}) beobachtet (Hollis et al. 2003). Dass die Reduktion von Cytochrom b_{558} der NADPH-Oxidase unter anaeroben Bedingungen nur als schnell beobachtet werden kann, wenn zusätzlich mit NADPH stimuliert wird, wurde bereits von Cross et al. beschrieben (Cross et al. 1984). Anderenfalls verläuft die Reduktion langsam und unvollständig, sogar nach mehreren Minuten Anoxie. Dies sei auf Konformationsänderungen zurückzuführen, die einen Einstrom von Elektronen in den Komplex II nur erlauben, wenn Sauerstoff anwesend ist (Sommer 2011). Diese Ergebnisse führten zu der Frage, ob die Reduktion von Cytochrom b_{558} überhaupt zur Erkenntnis der Aktivität der NADPH-Oxidase beiträgt (Foroozan et al. 1992).

Die NADPH-Oxidase ist das einzige hier untersuchte nicht-mitochondriale Cytochrom. Eine Funktion als Sauerstoffsensor scheint für NADPH-Oxidase somit unwahrscheinlich zu sein.

Bereits aus den Untersuchungen am Karotiskörperchen der Ratte von Streller et al. ist bekannt, dass die spektrale Reaktion des Cytochroms a_{592} sehr signifikant vom Grad der Hypoxie abhängt (Streller et al. 2002). Die relativen Spektralgewichte von Cytochrom a_{592} zeigten in den Untersuchungen eine signifikante Abnahme bei zunehmender Hypoxie: 15,4% bei 100 mmHg, 9,7% bei 80 mmHg und 7,6% bei 60 mmHg. Diese Abnahme der relativen Spektralgewichte bei zunehmender Hypoxie zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. In der Kontrolllösung wurde gemessen: $15,4\% \pm 0,5\%$ bei 100 mmHg, $14,3\% \pm 1,6\%$ bei 70 mmHg und $10,8\% \pm 0,8\%$ bei 50 mmHg Sauerstoffpartialdruck der Superfusionslösung. In der vorliegenden Arbeit kann somit bestätigt werden, dass das Cytochrom a_{592} eine ausgesprochen niedrige O_2 -Bindungsaffinität hat und damit extrem sauerstoffsensibel ist. Bereits Mills und Jöbsis (Mills und Jöbsis 1972) vermuteten, dass die Zellen des Karotiskörperchens eine Cytochrom-c-Oxidase mit einer geringen Sauerstoffaffinität enthalten. Buckler und Turner (Buckler und Turner 2013) konnten vor Kurzem bestätigen, dass Hypoxie den Elektronentransport und die Aktivität der Cytochromoxidase bereits bei einem

relativ hohen pO_2 hemmen kann. Somit wäre diese als möglicher Sauerstoffsensor besonders geeignet. Der Nachweis des Cytochroms a_{592} als einzigartige Komponente der Cytochrom-c-Oxidase des Karotiskörperchens der Ratte (Warncke 2011) führte zu der Theorie, dass es den Elektronenfluss zwischen dem Cu_A und dem Cytochrom a_3-Cu_B kurzschließen kann und somit als primärer O_2 -Sensor fungieren könnte (Acker und Acker 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Theorie.

Ausgehend von dieser Theorie sind zwei Orte denkbar, an denen Mitochondrien vorkommen: die Typ-I-Zelle und die Endigung des Karotissinusnerven, welche die Synapse bildet. Bei den Kationenaustauschversuchen wurde das Kalzium aus der Superfusionslösung entfernt und es wurde gezeigt, dass ohne extrazelluläres Kalzium keine Karotissinusnervaktivität messbar ist, weil es vermutlich zu keiner Transmitterfreisetzung aus der Glomuszelle kam. Dies ist ein entscheidender Hinweis dafür, dass der Sauerstoffsensor in der Glomuszelle lokalisiert ist und eine Signalweiterleitung zwischen Glomuszelle und Nervendigung durch kalziumabhängige Transmitterausschüttung über die Synapse stattfindet. Wenn sich der Sauerstoffsensor in den Typ-I-Zellen befindet, sind bei hypoxischer Stimulation unveränderte Cytochrommuster unabhängig von der Intaktheit des Karotissinusnerven zu erwarten, da es nach vorausgegangener dauerhafter Denervierung zu einer Degeneration des Nerven und seiner Mitochondrien kommt. Nach Denervierung des Karotissinusnerven konnten in dieser Arbeit keine statistisch signifikanten Unterschiede in der spektralen Reaktion im Vergleich zu den Kontrollversuchen für die Cytochrome b_{558} , b_{563} , a_{592} und a_{603} nachgewiesen werden. Lediglich für das Cytochrom c_{550} kam es nach Durchtrennung des Karotissinusnerven zu deutlich reduzierten relativen Spektralgewichten bei allen drei verwendeten Hypoxiestufen im Vergleich zu den Versuchen in Kontroll- und Versuchslösung. Die Ursache dafür wurde ausführlich diskutiert und bleibt unklar. Aufgrund typischer spektraler Reaktionen der anderen Cytochrome ist eine unverändert funktionierende Atmungskette im Karotiskörperchen der Ratte im Vergleich zu Normalbedingungen (Kontrolllösung) nach Denervierung dennoch anzunehmen.

Allerdings konnte die Theorie der Kalziumfreisetzung aus dem Mitochondrium als erster Schritt hin zur Transmitterfreisetzung und Erregung der afferenten Nervendigung (Streller et al. 2002, Warncke 2011) mit den vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden. Dies ist kongruent zu aktuellen Forschungsergebnissen

(Obeso et al. 1996, Vicario et al. 2000, Wyatt und Buckler 2004). Die mitochondriale Kalziumfreisetzung alleine scheint zumindest nicht ausreichend zu sein, um eine Nervaktivität auszulösen. Ein modulierender Einfluss wäre aber denkbar.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

1. Hämproteine, wie z.B. die Cytochrome der mitochondrialen Atmungskette oder die NADPH-Oxidase, können nach hypoxischer Stimulation mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie gut identifiziert werden.

2. Die Höhe der relativen spektralen Gewichte der mitochondrialen Cytochrome c_{550} , b_{563} , a_{592} und a_{603} aller drei Versuchsreihen ist signifikant abhängig vom Grad der Hypoxie zwischen den Hypoxiestufen 50 mmHg und 70 mmHg Sauerstoffpartialdruck der Superfusionslösung. Für das Cytochrom c_{550} und a_{592} konnte sogar eine hoch signifikante Abhängigkeit nachgewiesen werden. Für das Cytochrom c_{550} konnte zusätzlich ein signifikanter Unterschied zwischen den Faktorenstufen 50 mmHg und 100 mmHg Sauerstoffpartialdruck nachgewiesen werden.

3. Die relativen spektralen Anteile der Cytochrome bei Hypoxie sind unbeeinflusst vom Vorhandensein von Kalzium in der Superfusionslösung. Es kann somit auch bei Fehlen von Kalzium in der Superfusionslösung von einer intakten und unverändert funktionierenden Atmungskette im Karotiskörperchen der Ratte im Vergleich zu Normalbedingungen (Versuche in Kontrolllösung) ausgegangen werden.

4. In kalziumfreier Superfusionslösung kommt es zu keiner Zunahme der Spikerate des Karotissinusnerven nach hypoxischer Stimulation. Somit liegt es nahe, dass eine Signalweiterleitung zwischen der Glomuszelle und der Nervendingung durch kalziumabhängige Transmitterausschüttung über die Synapse stattfindet. Eine Kalziumfreisetzung aus dem Mitochondrium als erster Schritt hin zur Transmitterfreisetzung und Erregung der afferenten Nervendingung scheint zumindest alleine nicht ausreichend zu sein.

5. Die vorrausgegangene dauerhafte Denervierung des Glomus caroticum hat keinen signifikanten Einfluss auf die spektralen Veränderungen der Cytochrome b_{558} , b_{563} , a_{592} und a_{603} im Vergleich zu nicht denervierten Karotiskörperchenpräparaten. Damit

ist die Lokalisation des sauerstoffsensitiven Cytochroms a_{592} in den Zellen des Karotiskörperchens, also in den Typ-1-Zellen, wahrscheinlich.

6. Die Durchtrennung des Karotissinusnerven beeinflusste hoch signifikant die relativen spektralen Anteile von Cytochrom c_{550} . Die genaue Ursache dieses Ergebnisses bleibt unklar.

7. Nach vorausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven konnten sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei hypoxischer Stimulation keine Impulse des Karotissinusnerven registriert werden.

8. Das nicht-mitochondriale Cytochrom b_{558} der NADPH-Oxidase zeigte keine signifikante Änderung seiner relativen Spektralgewichte in Abhängigkeit von Grad der Hypoxie. Eine Beteiligung am Sauerstoffsensing-Mechanismus des Glomus caroticum scheint somit unwahrscheinlich zu sein.

6.2 Einordnung in den aktuellen Kontext

Der eigentliche Sauerstoffsensor im Glomus caroticum der Ratte sowie auch des Menschen ist bis heute nicht bekannt. Somit ist auch seine genaue Lokalisation, die möglicherweise in der Typ-I-Zelle oder auch in der Nervendingung sein könnte, unbekannt.

In dieser Arbeit wird die Cytochrom-c-Oxidase in der Atmungskette der Mitochondrien der Typ-I-Zelle des Glomus caroticum als möglicher Sauerstoffsensor angenommen, da diese aufgrund des Cytochroms a_{592} über einen Bestandteil mit einer extrem niedrigen Sauerstoffaffinität verfügt (Steller et al. 2002, Warncke 2011). Die Versuchsreihen sind bisher nicht veröffentlicht, unterstützen aber die These vom Sauerstoffsensor Cytochrom-c-Oxidase. Die neutrophile NADPH-Oxidase scheint bei der O_2 -Messung sehr wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle (Kemp 2006, Sommer 2011) zu spielen, was in der Arbeit durch fehlende signifikante Änderungen der Spektralgewichte ihres Cytochroms b_{558} bei Hypoxie vermutet werden konnte. Bei Versuchen mit dem Reiz Hypoxie konnte eine Zunahme der Spikerate im Karotissinusnerv gezeigt werden, welche nach Entfernung des extrazellulären

Kalziums nicht mehr nachweisbar war. Dies stimmt mit der derzeitigen Theorie überein, dass das Hypoxiesignal vom Glomus caroticum auf die Nervendigung des Karotissinusnerven durch kalziumabhängige Transmitterausschüttung über die Synapse stattfindet (Carroll und Kim 2005, Prabhakar 2000).

Nachdem die ein- und beidseitige Denervierung des Glomus caroticum in den 1950iger bis 1970iger Jahren eine große Anwendung zur Therapie von Atemwegserkrankungen wie Asthma und COPD hatte, nahmen aufgrund der ausbleibenden Evidenz dieser Therapiemethode operative Eingriffe rund um das Karotiskörperchen ab. In jüngster Vergangenheit aber erlebte dieser chirurgisch sicher durchführbare Eingriff eine neue Renaissance in der Behandlung von chronischen Herzerkrankungen (Niewinski et al. 2013). Außerdem könnte das Karotiskörperchen in Zukunft auch für die Therapie des Metabolischen Syndroms (Conde et al. 2014, Prabhakar und Peng 2004, Ribeiro et al. 2013) einschließlich des Diabetes mellitus (Prabhakar und Joyner 2015), der Hypertonie (Abdala et al. 2012, McBryde et al. 2013) und des Schlafapnoe-Syndroms interessant werden. Genau wie beim Sauerstoffsensing sind die genauen Mechanismen und Zusammenhänge zur Messung von Glukose und Blutdruck im Glomus caroticum noch nicht vollständig geklärt und machen eine kontinuierliche und umfangreiche Forschung auf diesem Gebiet notwendig.

7 Literaturverzeichnis

- A. P. Abdala, F. D. McBryde, N. Marina, E. B. Hendy, Z. J. Engelman, M. Fudim, P. A. Sobotka, A. V. Gourine, J. F. R. Paton, "Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat" *Journal of Physiology* **2012**, 590, 4269.
- H. Acker, B. Bölling, M. A. Delpiano, E. Dufau, A. Görlach, G. Holtermann, "The meaning of H₂O₂ generation in carotid body cells for PO₂ chemoreception" *Journal of the Autonomic Nervous System* **1992**, 41, 41.
- H. Acker, C. Huckstorf, H. Sauer, T. Streller, M. Wartenberg, "Deciphering the oxygen sensing pathway by microscopy" *Methods in Enzymology* **2004**, 381, 488.
- T. Acker, H. Acker, "Cellular oxygen sensing need in CNS function: Physiological and pathological implications" *Journal of Experimental Biology* **2004**, 207, 3171.
- T. Acker, J. Fandrey, H. Acker, "The good, the bad and the ugly in oxygen-sensing: ROS, cytochromes and prolyl-hydroxylases." *Cardiovascular Research* **2006**, 71, 195.
- G. J. Augustine, M. P. Charlton, S. J. Smith, "Calcium action in synaptic transmitter release" *Annual Review of Neuroscience* **1987**, 10, 633.
- G. Benard, B. Faustin, E. Passerieux, A. Galinier, C. Rocher, N. Bellance, J.-P. Delage, L. Casteilla, T. Letellier, R. Rossignol, "Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation", Vol. 291, **2006**.
- T. J. Biscoe, M. J. Purves, S. R. Sampson, "The frequency of nerve impulses in single carotid body chemoreceptor afferent fibres recorded *in vivo* with intact circulation" *Journal of Physiology* **1970**, 208, 121.
- K. J. Buckler, "Effects of exogenous hydrogen sulphide on calcium signalling, background (TASK) K channel activity and mitochondrial function in chemoreceptor cells" *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **2012**, 463, 743.
- K. J. Buckler, P. J. Turner, "Oxygen sensitivity of mitochondrial function in rat arterial chemoreceptor cells" *Journal of Physiology* **2013**, 591, 3549.
- K. J. Buckler, R. D. Vaughan-Jones, "Effects of hypoxia on membrane potential and intracellular calcium in rat neonatal carotid body type I cells" *Journal of Physiology* **1994**, 476, 423.
- D. G. Buerk, S. Osanai, D. K. Chugh, A. Mokashi, S. Lahiri, "Calcium-dependent O₂ sensitivity of cat carotid body" *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1997**, 411, 1.
- M. A. Busch, G. E. Bisgard, J. E. Mesina, H. V. Forster, "The effects of unilateral carotid body excision on ventilatory control in goats." *Respiration Physiology* **1983**, 54, 353.
- V. H. Busch, "Quantitative histochemische und immunhistochemische Darstellung der Succinatdehydrogenaseaktivität und der Proteinuntereinheiten in Herz und Lunge der Ratte" Dissertation, Fachbereich Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, **2008**.
- J. L. Carroll, I. Kim, "Postnatal development of carotid body glomus cell O₂ sensitivity" *Respiratory Physiology and Neurobiology* **2005**, 149, 201.

- N. S. Chandel, "Mitochondrial complex III: An essential component of universal oxygen sensing machinery?" *Respiratory Physiology and Neurobiology* **2010**, 174, 175.
- S. V. Conde, A. Obeso, C. Gonzalez, "Low glucose effects on rat carotid body chemoreceptor cells' secretory responses and action potential frequency in the carotid sinus nerve" *Journal of Physiology* **2007**, 585, 721.
- S. V. Conde, J. F. Sacramento, M. P. Guarino, C. Gonzalez, A. Obeso, L. N. Diogo, E. C. Monteiro, M. J. Ribeiro, "Carotid body, insulin and metabolic diseases: unravelling the links" *Frontiers in Physiology* **2014**, 5, 418.
- A. R. Cross, L. Henderson, O. T. G. Jones, M. A. Delpiano, J. Hentschel, H. Acker, "Involvement of an NAD(P)H oxidase as a pO₂ sensor protein in the rat carotid body" *Biochemical Journal* **1990**, 272, 743.
- A. R. Cross, J. F. Parkinson, O. T. G. Jones, "The superoxide-generating oxidase of leucocytes. NADPH-dependent reduction of flavin and cytochrome b in solubilized preparations" *Biochemical Journal* **1984**, 223, 337.
- F. de Castro, "Über die Struktur und Innervation des Glomus caroticum beim Menschen und bei den Säugetieren" *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* **1929**, 89, 250.
- C. Di Giulio, J. Antosiewicz, M. Walski, G. Petruccelli, V. Verratti, G. Bianchi, M. Pokorski, in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 648 (Eds.: C. Gonzalez, C. a. Nurse, C. Peers), **2009**, pp. 257.
- D. E. Dick, J. R. Meyer, J. V. Weil, "A new approach to quantitation of whole nerve bundle activity" *Journal of Applied Physiology* **1974**, 36, 393.
- D. F. Donnelly, I. Kim, E. M. Mulligan, J. L. Carroll, "Non-additive interactions between mitochondrial complex IV blockers and hypoxia in rat carotid body responses" *Respiratory Physiology and Neurobiology* **2014**, 190, 62.
- M. R. Duchon, T. J. Biscoe, "Relative mitochondrial membrane potential and [Ca²⁺]_i in type I cells isolated from the rabbit carotid body" *Journal of Physiology* **1992**, 450, 33.
- G. J. Eden, M. A. Hanson, "Maturation of the respiratory response to acute hypoxia in the newborn rat." *The Journal of Physiology* **1987**, 392, 1.
- W. Ehleben, B. Bölling, E. Merten, T. Porwol, A. R. Strohmaier, H. Acker, "Cytochromes and oxygen radicals as putative members of the oxygen sensing pathway" *Respiration Physiology* **1998a**, 114, 25.
- W. Ehleben, T. Porwol, J. Fandrey, H. Acker, "The influence of phenobarbital on cytochromes and reactive oxygen species in erythropoietin producing HepG2 cells" *FEBS Letters* **1998b**, 440, 343.
- A. M. Evans, "AMP-activated protein kinase and the regulation of Ca²⁺ signalling in O₂-sensing cells." *The Journal of Physiology* **2006**, 574, 113.
- C. Eyzaguirre, "Chemical and electric transmission in the carotid body chemoreceptor complex" *Biological Research* **2005**, 38, 341.
- C. Eyzaguirre, J. Lewin, "Effect of different oxygen tensions on the carotid body *in vitro*" *The Journal of physiology* **1961**, 159, 238.
- R. Foroozan, J. M. Ruedi, B. M. Babior, "The reduction of cytochrome b₅₅₈ and the activity of the respiratory burst oxidase from human neutrophils" *Journal of Biological Chemistry* **1992**, 267, 24400.
- H. V. Forster, "Plasticity in the control of breathing following sensory denervation." *Journal of Applied Physiology* **2003**, 94, 784.
- H. V. Forster, L. G. Pan, T. F. Lowry, A. Serra, J. Wenninger, P. Martino, "Important role of carotid chemoreceptor afferents in control of breathing of adult and neonatal mammals" *Respiration Physiology* **2000**, 119, 199.

- F. Geneser, "*Histologie*", Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln, **1990**.
- C. González, L. Almaraz, A. Obeso, R. Rigual, "Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors" *Trends in Neurosciences* **1992**, 15, 146.
- A. Gorlach, G. Holtermann, W. Jelkmann, J. T. Hancock, S. A. Jones, O. T. G. Jones, H. Acker, "Photometric characteristics of haem proteins in erythropoietin-producing hepatoma cells (HepG2)" *Biochemical Journal* **1993**, 290, 771.
- P. C. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, "*Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*", 9. Ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2014**.
- M. P. Hlastala, A. J. Berger, "*Physiology of Respiration*", Oxford University Press, New York, Oxford, **1996**.
- V. S. Hollis, M. Palacios-Callender, R. J. Springett, D. T. Delpy, S. Moncada, "Monitoring cytochrome redox changes in the mitochondria of intact cells using multi-wavelength visible light spectroscopy" *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **2003**, 1607, 191.
- H. R. Horton, L. A. Moran, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry, J. D. Rawn, "*Biochemie Lehrbuch*", 4. Ed., Pearson Education, München, Boston, San Francisco, Harlow, Don Mills, Sydney, Mexico City, Madrid, Amsterdam, **2008**.
- C. Huckstorf, T. Streller, H. Acker, "An unusual cytochrome a_{592} with low pO_2 affinity correlates with afferent discharge in the carotid body chemoreceptor discharge" *Advances in Experimental Medicine and Biology* **2002**, 536, 75.
- E. W. Hughes, R. L. Martin-Body, I. H. Sarelius, J. D. Sinclair, "Effects of urethane-chloralose anaesthesia on respiration in the rat" *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **1982**, 9, 119.
- R. Iturriaga, S. Lahiri, "Carotid body chemoreception: role of extracellular Ca^{2+} " *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1994**, 360, 171.
- R. G. Jiang, C. Eyzaguirre, "Effects of hypoxia and putative transmitters on $[Ca^{2+}]_i$ of rat glomus cells" *Brain Research* **2004**, 995, 285.
- P. J. Kemp, "Detecting acute changes in oxygen: will the real sensor please stand up?" *Experimental Physiology* **2006**, 91, 829.
- P. J. Kemp, V. Telezhkin, "Oxygen sensing by the carotid body: Is it all just rotten eggs?" *Antioxidants and Redox Signaling* **2014**, 20, 794.
- D. Kholwadwala, D. F. Donnelly, "Maturation of carotid chemoreceptor sensitivity to hypoxia: In vitro studies in the newborn rat" *Journal of Physiology* **1992**, 453, 461.
- R. Klinke, S. Silbernagel, "*Lehrbuch der Physiologie*", 2. Ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2000**.
- H. Kondo, "Innervation of the chief cells of the carotid body: an ultrastructural review" *Archivum Histologicum Japonicum* **1977**, 40 Suppl, 221.
- P. Körner, "Charakterisierung der Zellen des Glomus caroticum" Dissertation, Medizinischen Fakultät Ludwig-Maximilians-Universität, München, **2005**.
- P. Kumar, "Sensing hypoxia in the carotid body: from stimulus to response" *Essays in biochemistry* **2007**, 43, 43.
- P. Kumar, D. Phil, "Translating blood-borne stimuli: chemotransduction in the carotid body" *Sheng Li Xue Bao*. **2007**, 59(2), 128.
- W. Kummer, Y. Yamamoto, "Cellular distribution of oxygen sensor candidates - Oxidases, cytochromes, K^+ -channels - In the carotid body" *Microscopy Research and Technique* **2002**, 59, 234.
- S. Lahiri, H. Acker, "Redox-dependent binding of CO to heme protein controls $P(O_2)$ -sensitive chemoreceptor discharge of the rat carotid body" *Respiration Physiology* **1999**, 115, 169.

- S. Lahiri, W. Ehleben, H. Acker, "Chemoreceptor discharges and cytochrome redox changes of the rat carotid body: Role of heme ligands" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96, 9427.
- S. Lahiri, A. Roy, S. Baby, T. Hoshi, G. Semenza, N. Prabhakar, "Oxygen sensing in the body." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **2006**, 91, 249.
- J. López-Barneo, R. Del Toro, K. L. Levitsky, M. D. Chiara, P. Ortega-Sáenz, "Regulation of oxygen sensing by ion channels" *Journal of Applied Physiology* **2004**, 96, 1187.
- J. López-Barneo, J. R. López-López, J. Ureña, C. González, "Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by pO₂ in type I chemoreceptor cells" *Science* **1988**, 241, 580.
- R. L. Martin-Body, G. J. Robson, J. D. Sinclair, "Restoration of hypoxic respiratory responses in the awake rat after carotid body denervation by sinus nerve section" *Journal of Physiology* **1986**, Vol. 380, 61.
- F. D. McBryde, A. P. Abdala, E. B. Hendy, W. Pijacka, P. Marvar, D. J. A. Moraes, P. A. Sobotka, J. F. R. Paton, "The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension" *Nature Communications* **2013**, 4, 2395.
- D. M. McDonald, R. A. Mitchell, "The innervation of glomus cells, ganglion cells and blood vessels in the rat carotid body: a quantitative ultrastructural analysis" *Journal of Neurocytology* **1975**, 4, 177.
- E. Mills, F. F. Jöbsis, "Mitochondrial respiratory chain of carotid body and chemoreceptor response to changes in oxygen tension" *Journal of Neurophysiology* **1972**, 35, 405.
- G. C. Mouradian Jr, H. V. Forster, M. R. Hodges, "Acute and chronic effects of carotid body denervation on ventilation and chemoreflexes in three rat strains" *Journal of Physiology* **2012**, 590, 3335.
- E. Mutschler, H.-G. Schaible, P. Vaupel, "*Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*", 6. Ed., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **2007**.
- P. K. Nair, D. G. Buerk, W. J. Whalen, "Cat carotid body oxygen metabolism and chemoreception described by a two-cytochrome model" *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **1986**, 250, H202.
- P. Niewinski, D. Janczak, A. Rucinski, P. Jazwiec, P. A. Sobotka, Z. J. Engelman, M. Fudim, S. Tubek, E. A. Jankowska, W. Banasiak, E. C. J. Hart, J. F. R. Paton, P. Ponikowski, "Carotid body removal for treatment of chronic systolic heart failure" *International Journal of Cardiology* **2013**, 168, 2506.
- C. A. Nurse, "Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors" *Journal of Physiology* **2014**, 592, 3419.
- A. Obeso, A. Rocher, J. Lopez-Lopez, C. Gonzalez, "Intracellular Ca²⁺ deposits and catecholamine secretion by chemoreceptor cells of the rabbit carotid body" *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1996**, 410, 279.
- D. J. Pallot, "*The Mammalian Carotid Body*", Vol. 102, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, **1987**.
- D. J. Pallot, N. Blakeman, "Quantitative studies of rat carotid body type I cell nerve endings" *Acta Anatomica* **1986**, 126, 212.
- R. Pardal, J. López-Barneo, "Low glucose-sensing cells in the carotid body" *Nature Neuroscience* **2002**, 5, 197.
- C. Peers, C. N. Wyatt, A. M. Evans, "Mechanisms for acute oxygen sensing in the carotid body" *Respiratory Physiology and Neurobiology* **2010**, 174, 292.

- C. L. Pelletier, D. L. Clement, J. T. Shepherd, "Comparison of afferent activity of canine aortic and sinus nerves" *Circulation Research* **1972**, 31, 557.
- J. M. Pequignot, S. Hellström, S. Forsgren, J. M. Cottet-Emard, L. Peyrin, "Transection of carotid sinus nerve inhibits the turnover of dopamine and norepinephrine in long-term hypoxic carotid bodies: a biochemical and morphometric study" *Journal of the Autonomic Nervous System* **1991**, 32, 165.
- J. Pick, "The Discovery of the Carotid Body" *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* **1959**, 14, 61.
- J. Ponte, M. J. Purves, "Frequency response of carotid body chemoreceptors in the cat to changes of P_{aCO_2} , P_{aO_2} , and pH_a " *Journal of Applied Physiology* **1974**, 37, 635.
- T. Porwol, W. Ehleben, V. Brand, H. Acker, "Tissue oxygen sensor function of NADPH oxidase isoforms, an unusual cytochrome aa3 and reactive oxygen species." *Respiration Physiology* **2001**, 128, 331.
- N. R. Prabhakar, "Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors" *Journal of Applied Physiology* **2000**, 88, 2287.
- N. R. Prabhakar, "O₂ sensing at the mammalian carotid body: Why multiple O₂ sensors and multiple transmitters?" *Experimental physiology* **2006**, 91, 17.
- N. R. Prabhakar, M. J. Joyner, "Tasting arterial blood: what do the carotid chemoreceptors sense?" *Frontiers in Physiology* **2015**, 5, 1.
- N. R. Prabhakar, C. Peers, "Gasotransmitter Regulation of Ion Channels: A Key Step in O₂ Sensing By the Carotid Body" *Physiology* **2014**, 29, 49.
- N. R. Prabhakar, Y.-J. Peng, "Peripheral chemoreceptors in health and disease" *Journal of Applied Physiology* **2004**, 96, 359.
- W. Pschyrembel, "*Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*", 258. Ed., Walter de Gruyter, Berlin, New York, **1998**.
- M. J. Ribeiro, J. F. Sacramento, C. Gonzalez, M. P. Guarino, E. C. Monteiro, S. V. Conde, "Carotid body denervation prevents the development of insulin resistance and hypertension induced by hypercaloric diets" *Diabetes* **2013**, 62, 2905.
- K. Richter, "*Allgemeine Elektrophysiologie*", VEB Gustav Fischer Verlag Jena, Jena, **1979**.
- L. L. Ross, "A cytological and histochemical study of the carotid body of the cat" *The Anatomical record* **1957**, 129, 433.
- J. C. Roux, J. Peyronnet, O. Pascual, Y. Dalmaz, J. M. Pequignot, "Ventilatory and central neurochemical reorganisation of O₂ chemoreflex after carotid sinus nerve transection in rat." *The Journal of Physiology* **2000**, 522, 493.
- J. P. J. Sabino, M. de Oliveira, H. Giusti, M. L. Glass, H. C. Salgado, R. Fazan Jr, "Hemodynamic and ventilatory response to different levels of hypoxia and hypercapnia in carotid body-denervated rats" *Clinics* **2013**, 68, 395.
- R. F. Schmidt, F. Lang, M. Heckmann, "*Physiologie des Menschen*", 31. Ed., Springer Verlag, Berlin, **2011**.
- W. Schmidt, "*Optische Spektroskopie. Eine Einführung*", Wiley VCH Verlag, Weinheim, **2000**.
- A. Serra, D. Brozoski, N. Hedin, R. Franciosi, H. V. Forster, "Mortality after carotid body denervation in rats" *Journal of Applied Physiology* **2001**, 91, 1298.
- M. Shirahata, R. S. Fitzgerald, "Dependency of hypoxic chemotransduction in cat carotid body on voltage-gated calcium channels" *Journal of Applied Physiology* **1991**, 71, 1062.

- N. Sommer, "Mitochondria and Cellular Cytochromes as Oxygen Sensors in Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction" Dissertation, Veterinärmedizin und Medizin, Justus Liebig Universität Giessen, Giessen, **2011**.
- T. Streller, "Vergleichende Untersuchungen zum Kurzzeitverhalten des Karotis-Chemosensors bei akuter Hypoxie" Dissertation, Mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock, Rostock, **2000**.
- T. Streller, C. Huckstorf, C. Pfeiffer, H. Acker, "Unusual cytochrome a_{592} with low PO_2 affinity correlates as putative oxygen sensor with rat carotid body chemoreceptor discharge" *The FASEB Journal* **2002**, 16, 1277.
- H. J. L. M. Timmers, W. Wieling, J. M. Karemaker, J. W. M. Lenders, "Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans" *The Journal of physiology* **2003**, 553, 3.
- S. M. Tomares, O. S. Bamford, L. M. Sterni, R. S. Fitzgerald, J. L. Carroll, "Effects of domperidone on neonatal and adult carotid chemoreceptors in the cat" *Journal of Applied Physiology* **1994**, 77, 1274.
- A. Tse, L. Yan, A. K. Lee, F. W. Tse, "Autocrine and paracrine actions of ATP in rat carotid body" *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **2012**, 90, 705.
- R. Varas, C. N. Wyatt, K. J. Buckler, "Modulation of TASK-like background potassium channels in rat arterial chemoreceptor cells by intracellular ATP and other nucleotides" *Journal of Physiology* **2007**, 583, 521.
- A. Verna, "Ultrastructure of the carotid body in the mammals" *International Review of Cytology* **1979**, 60, 271.
- A. Verna, M. Roumy, L.-M. Leitner, "Ultrastructural features of the carotid body after in vitro experiments: correlation with physiological results." *Journal of Neurocytology* **1981**, 10, 659.
- I. Vicario, A. Obeso, A. Rocher, J. R. López-Lopez, C. González, "Intracellular Ca^{2+} stores in chemoreceptor cells of the rabbit carotid body: Significance for chemoreception" *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **2000**, 279, C51.
- E. H. Vidruk, E. B. Olson, L. Ling, S. M. Gordon, "Responses of single-unit carotid body chemoreceptors in adult rats" *Journal of Physiology* **2001**, 531, 165.
- G. Warncke, "Extraktion einer Cytochrom-a-Komponente aus Hypoxie-induzierten Absorptionsspektren des Karotiskörperchens" Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität Rostock, Rostock, **2011**.
- D. F. Wilson, A. Mokashi, D. Chugh, S. Vinogradov, S. Osanai, S. Lahiri, "The primary oxygen sensor of the cat carotid body is cytochrome a_3 of the mitochondrial respiratory chain" *FEBS Letters* **1994**, 351, 370.
- C. N. Wyatt, K. J. Buckler, "The effect of mitochondrial inhibitors on membrane currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells." *The Journal of Physiology* **2004**, 556, 175.
- J. Xu, F. W. Tse, A. Tse, "ATP triggers intracellular Ca^{2+} release in type II cells of the rat carotid body" *Journal of Physiology* **2003**, 549, 739.
- Y. Yamamoto, P. König, M. Henrich, J. Dedio, W. Kummer, "Hypoxia induces production of nitric oxide and reactive oxygen species in glomus cells of rat carotid body" *Cell and Tissue Research* **2006**, 325, 3.
- P. Zapata, C. Eyzaguirre, "Bioelectric potentials in the carotid body" *Brain Research* **1985**, 331, 39.
- P. Zapata, C. Larraín, "How the carotid body works: Different strategies and preparations to solve different problems" *Biological Research* **2005**, 38, 315.

- M. Zhang, H. Zhong, C. Vollmer, C. A. Nurse, "Co-release of ATP and ACh mediates hypoxic signalling at rat carotid body chemoreceptors" *Journal of Physiology* **2000**, 525, 143.
- H. Zhong, M. Zhang, C. A. Nurse, "Synapse formation and hypoxic signalling in co-cultures of rat petrosal neurones and carotid body type 1 cells" *Journal of Physiology* **1997**, 503, 599.

Thesen zur Dissertation

1. Trotz intensiver Forschung sind der primäre Sauerstoffsensor und dessen Lokalisation im Glomus caroticum bisher nicht eindeutig identifiziert. Ausgehend vom Mitochondrienmodell der metabolischen Hypothese gelang der Nachweis des Cytochroms a_{592} als einzigartige Komponente der Cytochrom-c-Oxidase des Karotiskörperchens der Ratte, welches als primärer O_2 -Sensor fungieren könnte. Im Glomus caroticum sind zwei Orte denkbar, an denen Mitochondrien vorkommen: die Typ-1-Zelle und die Endigung des Karotissinusnerven, welche die Synapse bildet.
2. In der vorliegenden Arbeit sollten auf Basis der Hämprotein-Hypothese im Gewebe des Glomus caroticum der Ratte Hämproteine (Cytochrom c_{550} , b_{563} , a_{603} , a_{592} und b_{558}) bei hypoxischer Stimulation (50 mmHg, 70 mmHg und 100 mmHg Sauerstoffpartialdruck) und unterschiedlichen Versuchsbedingungen (Versuche in Kontrolllösung, in kalziumfreier magnesiumhaltiger Versuchslösung und nach vorrausgegangener, dauerhafter Denervierung des Karotiskörperchens) analysiert werden. Für die Untersuchung dieser Proteine wurde die analytische Methode der Absorptionsspektroskopie verwendet. Zeitgleich wurde die Karotissinusnervaktivität erfasst.
3. Die Höhe der relativen spektralen Gewichte der mitochondrialen Cytochrome c_{550} , b_{563} , a_{592} und a_{603} aller drei Versuchsreihen ist signifikant abhängig vom Grad der Hypoxie zwischen den Hypoxiestufen 50 mmHg und 70 mmHg Sauerstoffpartialdruck der Superfusionslösung. Für das Cytochrom c_{550} und das sauerstoffsensitive Cytochrom a_{592} der Cytochrom-c-Oxidase konnte sogar eine hoch signifikante Abhängigkeit nachgewiesen werden. Für das Cytochrom c_{550} konnte zusätzlich ein signifikanter Unterschied zwischen den Faktorenstufen 50 mmHg und 100 mmHg Sauerstoffpartialdruck nachgewiesen werden.
4. Die relativen spektralen Anteile der Cytochrome bei Hypoxie sind unbeeinflusst vom Vorhandensein von Kalzium in der Superfusionslösung. Es kann somit auch bei Fehlen von Kalzium in der Superfusionslösung von einer intakten und unverändert funktionierenden Atmungskette im Karotiskörperchen der Ratte im Vergleich zu Normalbedingungen (Versuche in Kontrolllösung) ausgegangen werden.

5. In kalziumfreier Superfusionslösung kommt es zu keiner Zunahme der Spikerate des Karotissinusnerven nach hypoxischer Stimulation. Somit liegt es nahe, dass eine Signalweiterleitung zwischen der Glomuszelle und der Nervendingung durch kalziumabhängige Transmitterausschüttung über die Synapse stattfindet. Eine Kalziumfreisetzung aus den Mitochondrien als erster Schritt hin zur Transmitterfreisetzung und Erregung der afferenten Nervendingung scheint zumindest alleine nicht ausreichend zu sein.
6. Die vorausgegangene dauerhafte Denervierung des Glomus caroticum hat keinen signifikanten Einfluss auf die spektralen Veränderungen der Cytochrome b_{558} , b_{563} , a_{592} und a_{603} im Vergleich zu nicht denervierten Karotiskörperchenpräparaten. Damit ist die Lokalisation des sauerstoffsensitiven Cytochroms a_{592} in den Zellen des Karotiskörperchens, also in den Typ-1-Zellen, wahrscheinlich.
7. Die vorausgegangene dauerhafte Durchtrennung des Karotissinusnerven beeinflusste hoch signifikant die relativen spektralen Anteile von Cytochrom c_{550} . Die genaue Ursache dieses Ergebnisses bleibt unklar.
8. Nach vorausgegangener Durchtrennung des Karotissinusnerven konnten sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei hypoxischer Stimulation keine Impulse des Karotissinusnerven registriert werden.
9. Das nicht-mitochondriale Cytochrom b_{558} der NADPH-Oxidase zeigte keine signifikante Änderung seiner relativen Spektralgewichte in Abhängigkeit vom Grad der Hypoxie. Eine Beteiligung am Sauerstoffsensing-Mechanismus des Glomus caroticum scheint somit unwahrscheinlich zu sein.
10. Ziel weiterführender Untersuchungen sollte es sein, spektroskopische Analysen mit Bestimmung der Cytochrom-a-Komponente a_{592} unter abgestuften Hypoxiegraden und mit verschiedenen Blockern der Proteinkomplexe der Atmungskette durchzuführen, um das Cytochrom a_{592} als möglichen primären Sauerstoffsensor zu bestätigen.

Danksagung

Allen voran danke ich meiner Familie, ohne deren Unterstützung und Geduld diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere danke ich meinem Mann Jan für seine kritische Durchsicht der Unterlagen, seine Hilfe bei der Literaturbeschaffung und seine fachliche Unterstützung in allen Computerfragen. Meinem Vater Klaus danke ich besonders für seine Unterstützung bei der Datenauswertung und zu allen Fragen der Tabellenkalkulation. Meinen Kindern Benjamin und Niclas danke ich für ihre Geduld, wenn ich mal wieder zu lange am Computer gesessen habe, statt mit ihnen zu spielen.

Frau Dr. med. Ch. Huckstorf gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas für diese Arbeit und die langjährige fachliche Begleitung, Diskussionsbereitschaft und die vielen Anregungen. Meinen Doktorvätern, Herrn Professor em. Dr. med. habil. Ch. Pfeiffer und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. R. Köhling, danke ich für die Übernahme und die abschließende Betreuung der Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls allen Mitarbeitern des Institutes für Physiologie der Universität Rostock für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die engagierte Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Marcus Fortriede danke ich für die außerordentlich kritische Durchsicht der Arbeit und die vielen Anmerkungen in allen Belangen der deutschen Sprache.

Außerdem danke ich dem Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung IBIMA der Universität Rostock für die Einführung in das Statistikprogramm und die statistische Beratung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel erstellt worden ist. Die aus fremden Quellen direkt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Rostock, den 27.09.2015

Eva von Langermann und Erlencamp

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.