

**Aus dem Institut für experimentelle und klinische
Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck**

Direktor: Prof. Dr. med. Markus Schwaninger

**Expression der zentralen Opioid-Rezeptoren in spontan hypertensiven Ratten:
Mögliche Beteiligung an der Pathogenese der Hypertonie und
Beeinflussbarkeit durch antihypertensive Medikamente**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von

Stefanie Mai

aus Gießen

Lübeck 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Olaf Jöhren
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Cordula Stamme
Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2016
Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 10.06.2016
-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Das Opioidsystem	5
1.1.1 Wirkmechanismus	7
1.2. Die Verteilung endogener Opioide und ihrer Rezeptoren im Gehirn der Ratte	8
1.3 Die Rolle der Opioide in der Regulation der Kreislauffunktion.....	9
1.4 Hypothese und Fragestellung.....	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Materialien	13
2.2 Methoden	13
2.2.1 Tiermodelle	13
2.2.1.1 Tiermodell der essentiellen Hypertonie	13
2.2.2 Expression von Opioid-Rezeptoren bei unbehandelten Versuchstieren.....	14
2.2.3 Expression von Opioid-Rezeptoren nach chronisch antihypertensiver Therapie.....	14
2.2.4 Plethysmographische Blutdruckmessung.....	15
2.2.5 Gewebeentnahme	16
2.2.6 Vorbereitung der Gewebe für die Western Blot-Analyse	16
2.2.6.1 Homogenisation der Gewebe	16
2.2.6.2 Bestimmung des Gesamtproteins	17
2.2.7 Western Blot-Analyse	17
2.2.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	17
2.2.7.2 Protein-Transfer und Immunodetektion	19
2.2.8 Statistische Auswertung	20
3 Ergebnisse.....	22
3.1 Opioid-Rezeptor-Expression bei SHR vs. WKY-Ratten.....	22
3.1.1 Periphere Parameter	22
3.1.1.1 Körpergewicht.....	22
3.1.1.2 Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz.....	22
3.1.2 Die basale Opioid-Rezeptorexpression auf Proteinebene in zentralen Geweben.....	23
3.1.2.1 Hypothalamus	23
3.1.2.2 Striatum	25

3.1.2.3 Cerebrocortex	29
3.2 Opioid-Rezeptor-Expression nach chronisch antihypertensiver Behandlung	31
3.2.1 Periphere Parameter	31
3.2.1.1 Körpergewicht.....	31
3.2.1.2 Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz.....	32
3.2.2 Opioid-Rezeptor-Expression auf Proteinebene in zentralen Geweben nach antihypertensiver Behandlung.....	33
3.2.2.1 Hypothalamus	33
3.2.2.2 Striatum	37
3.2.2.3 Cerebrocortex.....	38
4 Diskussion	44
4.1 Die basale Opioid-Rezeptor-Expression im Gehirn der SHR ist verändert.....	44
4.2 Auswirkungen der chronischen antihypertensiven Behandlung auf die Expression zentraler Opioid-Rezeptoren.....	47
5 Zusammenfassung	50
6 Literaturverzeichnis	52
7 Anhänge.....	59
7.1 Alphabetische Auflistung der verwendeten Puffer	59
7.2 Gel.....	60
8 Danksagung	61
9 Lebenslauf.....	62

Abkürzungsverzeichnis

ACE	„angiotensin converting enzyme“
ANOVA	Varianzanalyse („analysis of variance“)
AT1	Angiotensin II-Rezeptor, Subtyp 1
A. U.	„arbitrary units“
Biso	Bisoprolol
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Can	Candesartan
DADL	D-Ala ² -D-Leu ⁵ -enkephalin
DAGO	D-Ala ² , MePhe ⁴ , Gly-ol ⁵ -enkephalin
DOR	δ -Opioid-Rezeptor
DPDPE	3H-D-Pen ² -D-Pen ⁵ -enkephalin
Ena	Enalapril
GABA	γ -Aminobuttersäure
G _i -Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein (inhibitorisch)
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
HR	Herzfrequenz („heart rate“)
Hyd	Hydralazin
i.c.v.	intracerebroventrikulär
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KOR	κ -Opioid-Rezeptor
MOR	μ -Opioid-Rezeptor
Ncl.	Nucleus
OR	Opioid-Rezeptor
ORL	“opioid receptor-like”
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (“phosphate buffered saline”)
PKA	Proteinkinase A
PNS	Peripheres Nervensystem
POMC	Proopiomelanocortin
Pro	Propranolol
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SBP	Systolischer Blutdruck (“systolic blood pressure”)

s. c.	subcutan
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes („standard error of the mean“)
SHR	Spontan hypertensive Ratte („spontaneously hypertensive rat“)
Veh	Vehikel
WKY	Wistar Kyoto
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Regulation des Blutdrucks erfolgt durch ein recht komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Mechanismen. So sind endotheliale und hämodynamische Anpassungsvorgänge an der Kreislaufregulation ebenso beteiligt wie die Niere, unterschiedliche Botenstoffe und das zentrale Nervensystem (ZNS). In den letzten Jahrzehnten legten Ergebnisse verschiedener Studien nahe, dass auch endogene Opiode und ihre Rezeptoren im ZNS an der Blutdruckregulation und an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie beteiligt sein könnten (Feuerstein und Siren, 1987). Endogene Opiode werden aus inaktiven Vorläufermolekülen (Proopiomelanocortin, Proenkephalin, Prodynorphin, Pronociceptin und Proendomorphin) gebildet und entfalten ihre Wirkung an der Zielzelle sowohl über Signalvermittlung durch sogenannte „second messenger“ als auch durch Beeinflussung der Genexpression. Die Auswirkungen der endogenen Opiode auf die Zielzelle und den Gesamtorganismus sind bis heute trotz intensiver wissenschaftlicher Bemühungen noch nicht vollständig geklärt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Expression von Opioid-Rezeptoren und deren Rolle in der Pathogenese der essentiellen Hypertonie am Tiermodell der spontan hypertensiven Ratte (SHR).

1.1 Das Opioidsystem

Die in Säugetieren vorkommenden endogenen aktiven Opioid-Peptide umfassen nach dem heutigen Kenntnisstand Endorphine, Enkephaline, Dynorphine, Nociceptin und Endomorphine. Alle Peptide werden aus inaktiven Vorläufermolekülen abgespalten. So ist das Proopiomelanocortin (POMC) Vorläufermolekül des β -Endorphins, Proenkephalin das des (Met)enkephalins und (Leu)enkephalins. Aus Prodynorphin werden Dynorphin A, Dynorphin A (1-8), Dynorphin B sowie α - und β -Neoendorphin abgespalten. Aus Pronociceptin entsteht das aktive Nociceptin, aus Proendomorphin die aktiven Peptide Endomorphin-1 und -2 (Khachaturian et al., 1985).

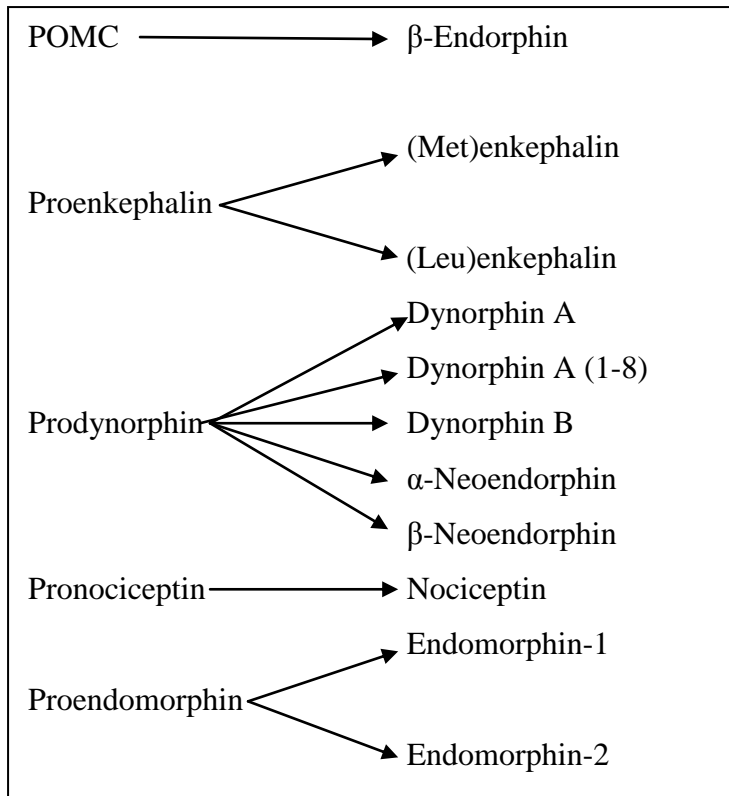


Abb. 1: Vorläufermoleküle und abgespaltene aktive Opioid-Peptide

Bis heute kennt man drei „klassische“ Opioid-Rezeptoren: μ -, δ - und κ -Opioid-Rezeptoren (Lord et al., 1977; Martin, 1979). Später wurde weiterhin ein ORL (opioid receptor-like)-Rezeptor entdeckt, der viele strukturelle Ähnlichkeiten mit den klassischen Opioid-Rezeptoren aufweist (Mollereau et al., 1994). Gemeinsam sind allen Rezeptoren die extrazelluläre N-terminale Region, sieben Transmembrandomänen und eine intrazelluläre C-terminale Region. Anhand ihrer pharmakologischen Eigenschaften lassen sich verschiedene Subtypen der Rezeptoren unterscheiden. Für den μ -Opioid-Rezeptor haben sich bis heute experimentell drei Subtypen zeigen lassen, μ_1 -, μ_2 - und μ_3 -Rezeptoren (Wolozin und Pasternak, 1981; Cadet et al., 2003). Weiterhin scheinen bisher zwei δ -Rezeptor-Subtypen zu existieren (δ_1 und δ_2) (Jiang et al., 1991; Polastron et al., 1994). Auch der κ -Rezeptor lässt sich pharmakologisch in κ_1 -, κ_2 - und κ_3 -Subtypen unterteilen (Attali et al., 1982). Vermutlich existieren auch Subtypen des ORL-Rezeptors; diese sind jedoch bisher noch nicht ausreichend untersucht.

Die endogenen Opiode zeigen eine unterschiedliche Affinität zu den einzelnen Rezeptoren. β -Endorphin zeigt die höchste Affinität zu μ - und κ -Rezeptoren. Enkephaline hingegen besitzen hohe Affinität gegenüber δ -Rezeptoren. Dynorphine binden bevorzugt am κ -Rezeptor. Nociceptin zeigt kaum Affinität gegenüber allen drei Opioid-Rezeptoren.

Endomorphin bindet hoch selektiv am μ -Opioid-Rezeptor. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass am μ -Opioid-Rezeptor überwiegend Endomorphin und β -Endorphin binden. Am δ -Rezeptor zeigen Enkephaline eine hohe Affinität. Der κ -Opioid-Rezeptor ist bevorzugter Bindungsort der Dynorphine (Akil et al., 1981; Kosterlitz und Paterson, 1985; Corbett et al., 1993; Zadina et al, 1997).

1.1.1 Wirkmechanismus

Die Opioid-Rezeptoren gehören zu den Pertussis-Toxin-sensitiven G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt durch Bindung des jeweiligen Liganden (Dhawan et al., 1996). Hieraus resultiert wiederum die Aktivierung eines G_i -Proteins. Die beteiligten G-Proteine sind heterotrimere Proteine, d. h. sie bestehen aus der Dreierkombination der Untereinheiten α_i , β und γ . Es kommt an der Zielzelle zur Inhibition der Adenylatcyclase, wodurch der intrazelluläre cAMP-Spiegel sinkt und die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) reduziert wird. Weiterhin kommt es zur Öffnung von K^+ -Kanälen mit Einstrom von K^+ in die Zelle sowie zur Schließung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle mit nachfolgender Verminderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Es resultiert die Hemmung der Transmitter-Freisetzung im peripheren Nervensystem (PNS) und ZNS. Dies betrifft die Freisetzung der exzitatorischen Neurotransmitter Acetylcholin, Noradrenalin und Glutamat ebenso wie die Freisetzung der inhibitorischen Transmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin.

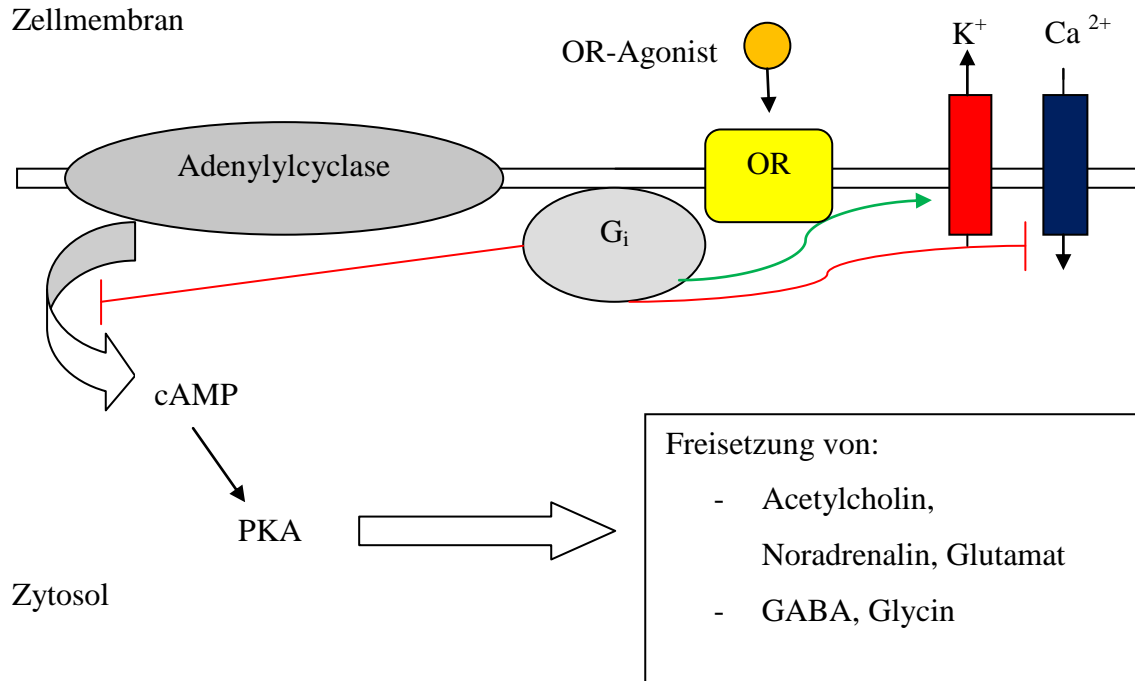


Abb. 2: Wirkungsmechanismus der Opioid-Rezeptoren; G_i: guaninnucleotid-bindendes Protein mit inhibitorischer Wirkung; cAMP: zyklisches Adenosinmonosphat; PKA: Proteinkinase A; OR: Opioid-Rezeptor; GABA: γ -Amino-Buttersäure

1.2. Die Verteilung endogener Opiode und ihrer Rezeptoren im Gehirn der Ratte

Khachaturian et al. fanden in immunozytochemischen Studien Hinweise auf die Lokalisation der endogenen Opiode und ihrer Vorläufer im Rattenhirn. So kam der Vorläufer des β -Endorphins, Proopiomelanocortin (POMC), hauptsächlich im Nucleus arcuatus (zur mittleren Gruppe der Hypothalamuskern gehörend) vor (Khachaturian et al., 1985) Die mittlere Kerngruppe dient vor allem der Produktion von Releasinghormonen für die Adenohypophyse und wird auch als „Steuerzentrale“ der Adenohypophyse bezeichnet. Proenkephalin, aus dem die weiter oben beschriebenen Enkephaline entstehen, fand sich gleichmäßig verteilt über das gesamte zentrale Nervensystem.

Das Vorläufermolekül der Dynorphine, das Prodynorphin, zeigte sich ebenfalls über die gesamte neuronale Achse verteilt.

Die erst später entdeckten Vorläufer Pronociceptin und Proendomorphin waren noch nicht Gegenstand der Studie (Khachaturian et al., 1985).

Durch Rezeptorautoradiographie gelang es, auch die Opioid-Rezeptoren im Gehirn der Ratte zu lokalisieren (Mansour et al., 1986/87).

μ -Opioid-Rezeptoren (MOR) fanden sich in hoher Dichte im Gyrus cinguli, Neocortex, Amygdala, Hippocampus, Gyrus dentatus, Ncl. accumbens, Striatum, Thalamus, Habenula, Ncl. interpeduncularis, Substantia nigra (Pars compacta), Colliculus superior und inferior sowie in den Raphe-Kernen.

δ -Opioid-Rezeptoren (DOR) zeigten sich fast ausschließlich in Gyrus cinguli sowie im Neocortex, der Amygdala, im Tuberculum olfactorium, im Ncl. accumbens und im Striatum.

K-Opioid-Rezeptoren (KOR) wurden schließlich in der Amygdala, im Tuberculum olfactorium, Ncl. accumbens, Striatum, Ncl. preopticus, Hypothalamus, in der Eminentia mediana, im Ncl. periventricularis und Ncl. interpeduncularis detektiert.

1.3 Die Rolle der Opioide in der Regulation der Kreislauffunktion

Seit langem ist bekannt, dass Opioide die Leitung nozizeptiver Signale auf Rückenmarksebene hemmen und zentral die Schmerzwahrnehmung modulieren. Morphin und synthetische Opioidagonisten finden daher Anwendung in der Therapie akuter und chronischer stärkerer Schmerzzustände. Diese wichtige Aufgabe scheint jedoch nicht die einzige des Opioidsystems zu sein. Es gibt einige Hinweise darauf, dass endogene Opioide ebenfalls an der Regulation des Blutdrucks und der Herzfrequenz beteiligt sind. So konnte gezeigt werden, dass μ -Opioid-Rezeptoragonisten in den Blutgefäßen von SHR eine Relaxation bewirken und somit den Blutdruck senken können (Chen et al., 2011).

Im zentralen Nervensystem (ZNS) finden sich endogene Opioide und ihre Rezeptoren unter anderem in den Kerngebieten, die an der Steuerung von Blutdruck und Herzfrequenz beteiligt sind (Khachaturian et al., 1985). Zentrale, d. h. intracerebroventrikuläre (i.c.v.-) Applikation von μ -Opioid-Rezeptoragonisten wie DAGO ([D-Ala², MePhe⁴, Gly-

ol5]enkephalin) führt zu einer Vasokonstriktion mit konsekutivem Blutdruckanstieg (Faden et al., 1982; Hassen et al., 1984 und 1985). Zusätzlich scheinen μ -Opioid-Rezeptoren im Hypothalamus zu einer Aktivierung des Sympathikus und des Nebennierenmarks zu führen (Feuerstein et al., 1983). δ -Opioid-Rezeptoragonisten wie DADL ([D-Ala²-D-Leu⁵])Enkephalin zeigen ähnliche vasokonstriktorische Effekte wie μ -Opioid-Rezeptoragonisten, sie besitzen jedoch eine 10fach geringere Potenz (Pfeiffer et al., 1983). κ -Opioid-Rezeptoragonisten führen im Gegensatz dazu zu einer Vasodilatation und Blutdrucksenkung sowie zur Abnahme der Herzfrequenz (Faden et al., 1982; Feuerstein et al., 1984; Hassen et al., 1984 und 1985).

Seit einiger Zeit nimmt man weiterhin an, dass das endogene Opioidsystem auch an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie beteiligt ist. So fand man im Gehirn acht Wochen alter SHR (spontaneously hypertensive rats) eine erhöhte Dichte der Opioid-Rezeptoren im Vergleich mit gleichaltrigen WKY (Wistar Kyoto)-Ratten (Martucci et al., 1979). Einen Hinweis auf ein Zusammenspiel zwischen dem zentralen Opioidsystem und der Kreislauffunktion gab es auch durch Untersuchungen, die eine erniedrigte Schmerzempfindlichkeit bei Versuchstieren mit genetischer oder experimenteller Hypertonie feststellten (Zamir et al., 1986). Zusätzlich zeigten Studien, dass SHR stärker mit einem Blutdruckanstieg auf die i.c.v.-Applikation von Enkephalinen reagierten als WKY-Ratten (Schaz et al., 1980; Rockhold et al., 1980; Yukimura et al., 1981). Auch die Effekte von zentral wirksamen Antihypertensiva können bei hypertensiven Versuchstieren durch Opioide moduliert werden. So hebt der Opioidantagonist Naloxon die blutdrucksenkende Wirkung von Clonidin und α -Methyldopa bei SHR, nicht jedoch bei WKY-Ratten, auf (Farsang et al., 1979). β -Endorphin-Antikörper hemmen nach i.c.v.-Applikation ebenfalls die Blutdrucksenkung durch Clonidin (Ramirez-Gonzalez et al., 1983). Umgekehrt scheinen Clonidin und α -Methyldopa in SHR auch die Freisetzung und die Plasmakonzentration von endogenen Opioiden zu erhöhen und die Dichte an Opioidrezeptoren zu steigern (Kunos et al., 1981; Pettibone et al., 1981; Xie et al., 1986). All diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das endogene Opioidsystem eine Rolle bei der essentiellen Hypertonie spielt und durch veränderte Konzentrationen der Opioid-Peptide sowie der Opioid-Rezeptoren ein Bluthochdruck mit ausgelöst werden könnte. Die Änderungen im zentralen Opioidsystem könnten weiterhin auch Folge der Hypertonie sein. Gleichfalls scheinen Antihypertensiva Wirkungen auf das Opioidsystem zu haben.

1.4 Hypothese und Fragestellung

In SHR sind die Spiegel von Dynorphin A(1-8), β -Endorphin und (Met)enkephalin im Gehirn altersabhängig verändert im Vergleich zu normotensiven Versuchstieren (Li et al., 1992). Durch antihypertensive Behandlung können diese Veränderungen nur teilweise aufgehoben werden (Li et al., 1992). Die bisherigen Ergebnisse zur Rolle des Opioidsystems bei der Hypertonie sind jedoch oft widersprüchlich. So konnte z. B. in anderen Studien keine Wirkung der antihypertensiven Therapie auf Veränderungen im Opioidsystem der SHR nachgewiesen werden (Gaida et al., 1985). Zudem wurden in den letzten Jahren zu diesem Thema nur noch wenige Daten publiziert. Unser Anliegen war es, die Rezeptordichte in Hypothalamus, Striatum und Cortex zum einen bei SHR in der prähypertensiven Phase (3-4 Wochen alt) und zum anderen bei SHR im Stadium der etablierten Hypertonie (12-13 Wochen alt) mittels Western Blot-Technik quantitativ zu messen. Wir untersuchten hierbei den μ -Opioid-Rezeptor 1 (MOR-1), den δ -Opioid-Rezeptor 1 (DOR-1) sowie die κ -Opioid-Rezeptoren 1 und 3 (KOR-1 und KOR-3). Hierdurch wollten wir Aufschluss darüber erhalten, ob und welche Veränderungen bei den Tieren bestehen, die auf eine Beteiligung des Opioidsystems (Khachaturian et al., 1985) an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie hinweisen. Durch weitere quantitative Messung der Rezeptordichte im Gehirn antihypertensiv behandelter SHR wollten wir zudem herausfinden, ob das Opioidsystem durch die blutdrucksenkenden Medikamente beeinflussbar ist. Hierzu verwendeten wir den β_1 -selektiven β -Blocker Bisoprolol, den unselektiven β -Blocker Propranolol, den AT1-Rezeptor-Antagonisten Candesartan, den ACE-Hemmer Enalapril sowie den peripheren Vasodilatator Dihydralazin. Durch die Untersuchungen an behandelten SHR wollten wir weiterhin feststellen, ob die Veränderungen des Rezeptorenstatus im Rahmen der essentiellen Hypertonie Auslöser des Bluthochdrucks sind oder sekundär entstehen.

Wir überprüfen zusammengefasst folgende Fragen:

- Wie ist die basale Expression der Opioid-Rezeptoren in Hypothalamus, Striatum und Cortex im Tiermodell der SHR?
- Beeinflusst die antihypertensive Therapie die Expression von Opioid-Rezeptoren?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die verwendeten Materialien im Materialverzeichnis aufgelistet.

2.2 Methoden

2.2.1 Tiermodelle

Für den tierexperimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wurden Wistar-Kyoto-Ratten (WKY-Ratten) und spontan hypertensive Ratten (SHR) eingesetzt. Bezogen wurden die Versuchstiere von Charles River, Sulzfeld, Deutschland.

Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt und vom Ministerium für Natur, Umwelt und Landesentwicklung des Landes Schleswig-Holstein genehmigt. Die Experimente wurden unter den Tierversuchsprotokollnummern 9/A38/01; 9/1g/02 und 9/A46/03 registriert.

Die Tiere wurden in Käfigen mit jeweils fünf Tieren gehalten. Ihnen wurde eine Eingewöhnungsphase von mindestens drei Tagen zur Adaptation an die Bedingungen des Tierstalles erlaubt. Die Unterbringung erfolgte im klimatisierten Tierstall bei 20 bis 24° C und 65% Luftfeuchtigkeit sowie einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus (7 bis 19 Uhr). Die Tiere erhielten freien Zugang zu Futter (Altromin[®]-Standardfutter für Mäuse und Ratten) und Wasser.

2.2.1.1 Tiermodell der essentiellen Hypertonie

SHR wurden 1963 von Okamoto und Aoki aus WKY-Ratten gezüchtet und entwickeln obligat eine essentielle arterielle Hypertonie.

Untersuchungen haben eindeutige Hinweise auf starke Ähnlichkeiten der essentiellen Hypertonie bei SHR und Mensch gegeben, die SHR zu einem gut geeigneten Tiermodell zur Erforschung der essentiellen Hypertonie machen.

Besonders von Bedeutung sind hierbei die Parallelen in der Entwicklung und den Folgen des Hypertonus. So verläuft die Entwicklung der Hypertonie sowohl bei SHR als auch beim Menschen in charakteristischen Phasen (Zicha und Kunes, 1999). SHR in der prähypertensiven Phase (Alter 0 bis 4 Wochen) zeigen hinsichtlich der systolischen Blutdruckwerte mit etwa 120 bis 124 mmHg keine Unterschiede gegenüber gleichaltrigen normotensiven Kontrolltieren (WKY-Ratten). In der Entwicklungsphase der Hypertonie (Alter ab 5 Wochen) steigt der Blutdruck deutlich an und erreicht im Alter von 12 Wochen systolische Werte von circa 180 bis 200 mmHg oder höher. Anschließend findet ein weiterer Blutdruckanstieg um 10 bis 20 mmHg statt, bis im Alter von etwa 20 Wochen das Stadium der etablierten Hypertonie (Plateauphase) erreicht ist.

Untersucht wurde die Expression von Opioid-Rezeptoren sowohl bei männlichen SHR in der prähypertensiven Phase (Alter 3 bis 4 Wochen) als auch bei männlichen SHR im Stadium der etablierten Hypertonie (Alter 12 bis 13 Wochen). Weiterhin wurde die Opioid-Rezeptor-Expression bei 12 bis 13 Wochen alten SHR nach dreiwöchiger chronisch antihypertensiver Therapie ermittelt.

Als Kontrolltiere dienten bei allen Experimenten normotensive WKY-Ratten jeweils gleichen Alters.

2.2.2 Expression von Opioid-Rezeptoren bei unbehandelten Versuchstieren

Zur Untersuchung der Expression von Opioid-Rezeptoren auf Proteinebene wurden SHR in der prähypertensiven Phase sowie SHR im Stadium der etablierten Hypertonie und gleichaltrige normotensive WKY-Ratten verwendet. Die Dekapitation der Tiere mit anschließender Gewebeentnahme erfolgte zwischen 8.30 und 13 Uhr.

2.2.3 Expression von Opioid-Rezeptoren nach chronisch antihypertensiver Therapie

Die Untersuchung der Expression von Opioid-Rezeptoren auf Proteinebene nach chronisch antihypertensiver Therapie wurde an männlichen SHR und WKY-Ratten im Alter von 12 bis 13 Wochen vorgenommen. Zur Gewöhnung wurde den Tieren sieben Tage lang Leitungswasser (1 mL/kg KG) über eine Schlundsonde appliziert. Im Anschluss wurden

bei allen Tieren der systolische Blutdruck (SBP) und die Herzfrequenz (HR) plethysmographisch ermittelt, wobei die Messungen zwischen 9 und 15 Uhr stattfanden. Die Gruppen wurden alternierend gemessen.

Sieben Tage nach der basalen Blutdruckmessung erfolgte eine randomisierte Zuordnung der SHR in sechs Gruppen:

1. SHR-Vehikel (Gummi arabicum 10 %) 1mL/kg KG/d; n=10
2. Bisoprolol (selektiver β_1 -Blocker) 10 mg/kg KG/d; n=10
3. Propranolol (unspezifischer β -Blocker) 50mg/kg KG/d; n=10
4. Candesartan (AT_1 -Blocker) 3mg/kg KG/d; n=10
5. Enalapril (ACE-Hemmer) 10 mg/kg KG/d; n=10
6. Hydralazin (peripherer Vasodilatator) 3mg/kg KG/d; n=10

Die Medikamente wurden täglich zwischen 9 und 11 Uhr über eine Schlundsonde appliziert. Alle Substanzen wurden in Gummi arabicum Suspension (10 % m/v) gelöst und die Suspension wurde in der Kontrollgruppe verabreicht. Die Tiere wurden jeden Tag gewogen.

Nach einer Behandlungsphase von 20 Tagen wurden wiederum SBP und HR plethysmographisch gemessen. Am 28. Behandlungstag wurden die Tiere zwischen 8.30 und 13 Uhr dekapitiert und es wurden die Gewebe entnommen.

2.2.4 Plethysmographische Blutdruckmessung

Die plethysmographische Blutdruckmessung wurde in Anlehnung an Raasch et al., 2002, durchgeführt. Die wachen Tiere wurden in einer Messbox mit Sauerstoff (0,5L/min.) und Lachgas (2L/min.) sediert. Durch Bestrahlung mittels Rotlichtlampe wurden die Schwanzarterien dilatiert. Der Messvorgang wurde begonnen, sobald mittels Piezo-Kristall ein gleichmäßiges Pulssignal der Schwanzarterie erhalten wurde. Dann erfolgte das Aufpumpen der Blutdruckmanschette, wobei beim Überschreiten des systolischen Blutdruckwertes kein Pulssignal mehr detektiert wurde und somit der systolische Blutdruck ermittelt werden konnte.

2.2.5 Gewebeentnahme

Nach der Dekapitation der Tiere wurde das Gehirn, einschließlich der Hypophyse aus der Sella turcica, in toto entnommen. Die Schnittführung am Gehirn erfolgte koronar durch das Chiasma opticum (tangential zum Bulbus olfactorius) und hinter dem Infundibulum. Aus dieser Gehirnscheibe wurde der Hypothalamus als Block entnommen. Hierfür wurden Schnitte entlang der perihypothalamischen Sulci und horizontal unterhalb der Commissura anterior geführt. In diesem Block sind die wichtigsten hypothalamischen Kerngebiete enthalten (Ncl. anterior, Ncl. paraventricularis, Ncl. supraopticus, Ncl. suprachiasmaticus, Ncl. arcuatus und Teile des lateralen und posterioren Hypothalamus). Cerebrocortex und Hippocampus wurden herauspräpariert. Die erhaltenen Gewebeschnitte wurden in Isopentan (- 40° C) eingefroren und bei - 80° C aufbewahrt.

2.2.6 Vorbereitung der Gewebe für die Western Blot-Analyse

2.2.6.1 Homogenisation der Gewebe

Das zu untersuchende Gewebe wurde in einem 2 ml Glashomogenisator im Verhältnis 1:5 mit Lysationspuffer versetzt und mithilfe des Glasstößels für 60 Sekunden lysiert. Das Lysat wurde sodann 10 min. bei 4° C und 10000×g zentrifugiert. Anschließend wurde der klare Überstand abpipettiert und mit 4-fachem Sodium-Dodecylsulfat-Puffer (SDS-Puffer) und 0,1 mM β-Mercaptoethanol gemischt. Das Gemisch wurde daraufhin zur Denaturierung der Proteine für 10 min. bei 98° C auf dem Heizblock gekocht. Danach wurden die Gewebeproben für 10 min. bei 10000×g zentrifugiert. Der Lipid-Überstand wurde entfernt und die übrig gebliebenen Proteinextrakte portioniert und bei - 80° C gelagert.

2.2.6.2 Bestimmung des Gesamtproteins

Der Gesamtproteingehalt der Proteinextrakte wurde quantitativ mit dem Verfahren von Lowry et al., 1951, bestimmt. Hierzu werden die Extrakte mit alkalischer Cu^{2+} -Lösung versetzt. Anschließend wird Folin-Reagenz hinzugesetzt, welches durch die Verbindung aus Proteinen und Cu^{2+} -Lösung reduziert wird. Hierbei kommt es zur Blaufärbung der Lösung.

2.2.7 Western Blot-Analyse

2.2.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Proteine sichtbar und quantifizierbar zu machen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli et al., 1970, durchgeführt. Durch Zugabe von SDS zu den Proben wurden die darin enthaltenen Proteine denaturiert und unabhängig von ihrer Eigenladung eine hohe negative Nettoladung bewirkt. Dies ermöglicht eine Auftrennung der Proteine einzig nach molarer Masse. Das diskontinuierliche Gelsystem bestand aus einer oberen Schicht 7,5 %igen Sammelgels, in den die Proteinproben konzentriert wurden, was eine höhere Bandenschärfe erlaubte. Die untere Schicht 5%igen Trenngels diente der Auftrennung der Proteine. Die Elektrophorese erfolgte mit konstanter Spannung von 200 V über einen Zeitraum von 30 min., wobei hier eine Auftrennung der SDS-Protein-Verbindungen annähernd nach Molekulargewicht resultierte. Ein gleichzeitig aufgetragener Proteinstandard (Protein-Molecular-Weight-Marker) diente der Abschätzung der Proteinmasse anhand standardisierter Proteinbanden.

Es wurde darauf geachtet, dass der Proteingehalt der aufgetragenen Proben jeweils gleich war.

Als „housekeeping gene“ wurde in allen Versuchsgruppen β -Actin (Molekulargewicht 42 kDa) verwendet, welches konstant und nicht-reguliert exprimiert wird.

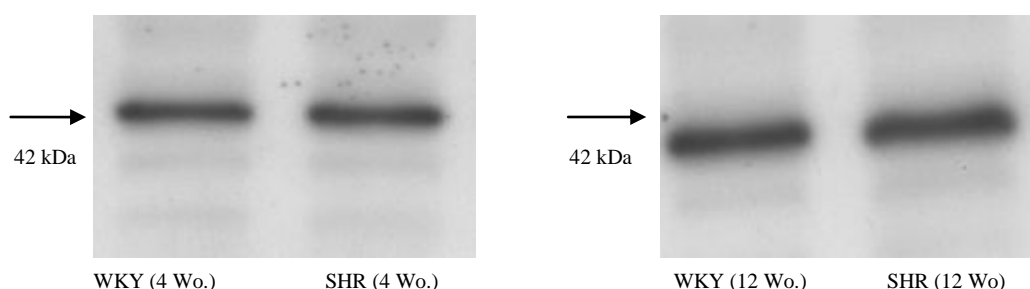


Abb. 3: Expression von β -Actin („housekeeping gene“) im Hypothalamus von 4 bzw. 12 Wochen alten WKY und SHR (Western Blot).

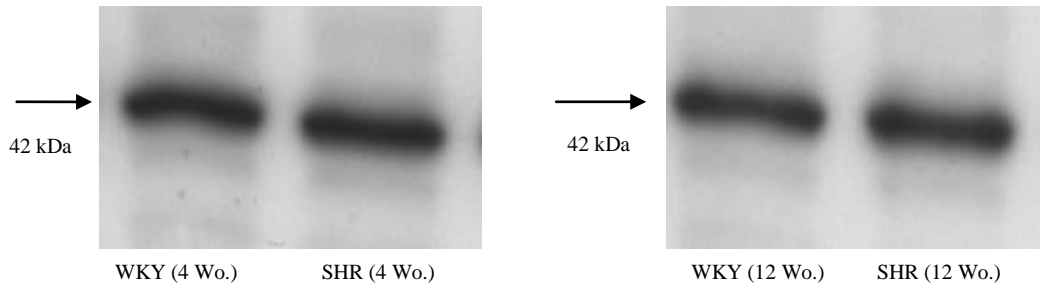


Abb. 4: Expression von β -Actin („housekeeping gene“) im Striatum von 4 bzw. 12 Wochen alten WKY und SHR (Western Blot).

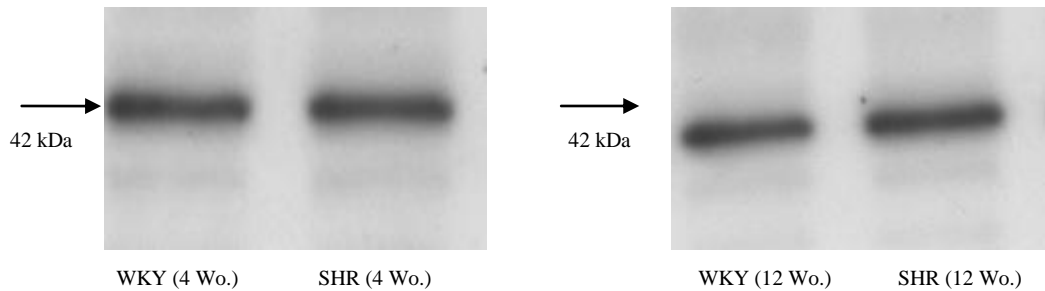


Abb. 5: Expression von β -Actin („housekeeping gene“) im Cortex von 4 bzw. 12 Wochen alten WKY und SHR (Western Blot).

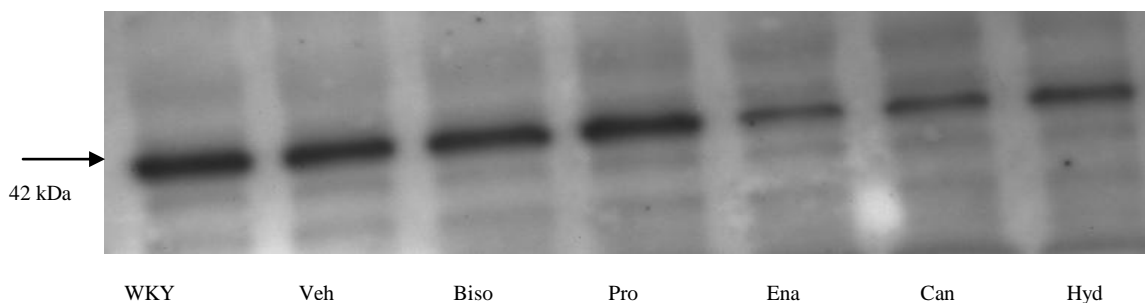


Abb. 6: Expression von β -Actin („housekeeping gene“) im Hypothalamus nach antihypertensiver Therapie der 12-13 Wochen alten Tiere (Western Blot). Veh: Vehikel; Biso: Bisoprolol; Pro: Propranolol; Ena: Enalapril; Can: Candesartan; Hyd: Hydralazin

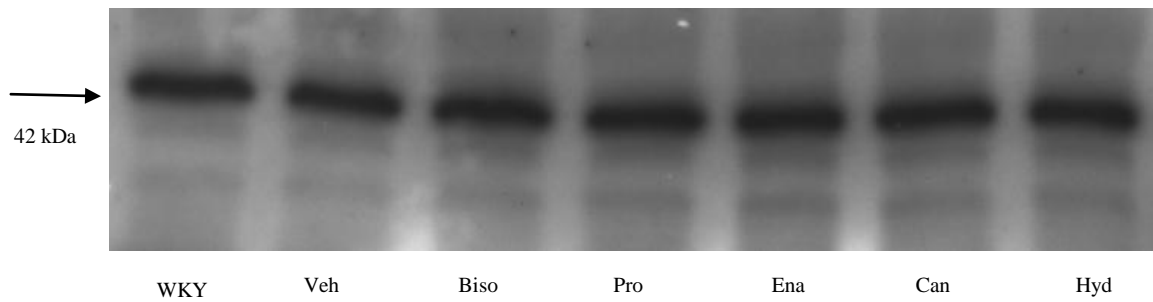


Abb. 7: Expression von β -Actin („housekeeping gene“) im Striatum nach antihypertensiver Therapie der 12-13 Wochen alten Tiere (Western Blot). Veh: Vehikel; Biso: Bisoprolol; Pro: Propranolol, Ena: Enalapril; Can: Candesartan; Hyd: Hydralazin

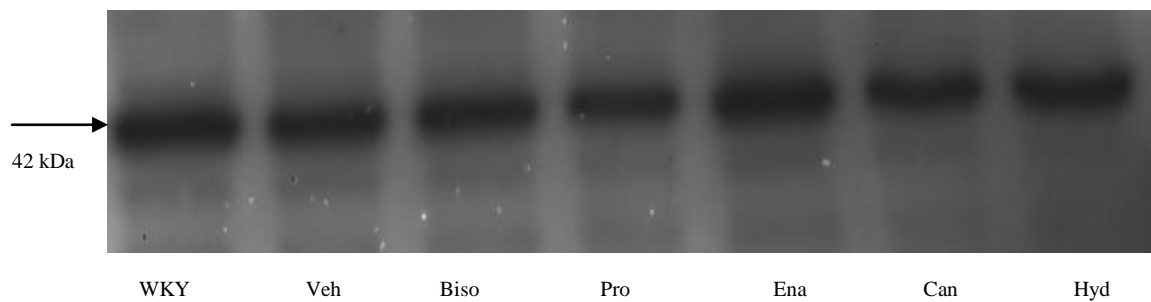


Abb. 8: Expression von β -Actin („housekeeping gene“) im Cortex nach antihypertensiver Therapie der 12-13 Wochen alten Tiere (Western Blot). Veh: Vehikel; Biso: Bisoprolol; Pro: Propranolol; Ena: Enalapril; Can: Candesartan; Hyd: Hydralazin

2.2.7.2 Protein-Transfer und Immunodetektion

Nach Auftrennung der Probenproteine fand der Elektrotransfer (2h, 50V, 50mA, 5W) auf eine Nitrozellulose-Membran (5 × 8 cm) im Semi-Dry-Verfahren statt. Die Proteine wurden somit auf der Membran immobilisiert.

Um unspezifische Antikörper-Bindungen weitgehend zu verhindern, wurden anschließend irrelevante Bindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran mit fettfreiem 5 %igem Milchpuffer geblockt. Zur Immunodetektion der Proteinbanden wurden die

immobilisierten Proteine über Nacht bei 4° C mit den primären Antikörpern (anti-MOR-1, -DOR-1, KOR-1, KOR-3) inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen des 1. und 2. Antikörpers sind in Tabelle 2 dargelegt. Die jeweils optimale Konzentration wurde zuvor ermittelt. Nach 4×10-minütigem Waschen mit PBS und 0,1 % Tween wurden die Membranen mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen zur Entfernung überschüssigen Antikörpers wiederum 4×10 min. mit PBS und Tween 20 gewaschen.

Zum Nachweis der spezifischen Antikörper-Bindung wurde Super Signal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce Biotechnology) verwendet. Das Lumineszenzsignal wurde mithilfe eines Röntgenfilmes detektiert, der zwischen 2 Sek. und 10 min. belichtet und anschließend entwickelt wurde. Die Dichte der Proteinbanden wurde am PC mit dem Programm Scion Image (Scion Imaging Software, Scion Corporation, Maryland, USA) als Integral ermittelt.

2.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe des Programmes „GraphPad Prism 4.0“ (GraphPad Software, San Diego, USA). Bei jedem Versuch wurde aus den Einzelwerten das arithmetische Mittel bestimmt und der Standardfehler berechnet. Beide Werte sowie der Stichprobenumfang n werden in den Tabellen angegeben. Zur Berechnung der Unterschiede zwischen WKY-Ratten und SHR in der prähypertensiven Phase wurde nach erfolgter Varianzanalyse ein t-Test für unverbundene Stichproben (nach Student) durchgeführt. In der Versuchsreihe WKY-Ratten vs. SHR im Stadium der etablierten Hypertonie erfolgte ebenfalls nach der Varianzanalyse ein t-Test für unverbundene Stichproben nach Student.

Die Berechnung der Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nach erfolgter antihypertensiver Therapie (Veh-Biso-Pro sowie Veh-Ena-Can-Hyd) erfolgte jeweils mittels One-Way-ANOVA und wurde anschließend mit Tukey's Post-Hoc-Test überprüft. P-Werte $\leq 0,05$ bedeuten, dass die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verworfen werden kann. Unterschiede mit p-Werten $\leq 0,05$ werden daher als statistisch signifikant bewertet.

Tab. 2: Verwendete Antikörper und deren verwendete Konzentrationen im Western Blot

Gewebe	primärer Antikörper	Firma, Kat.-Nr.	Verdünnung 1. Antikörper	Verdünnung 2. Antikörper	Bandengröße (kDa)
Hypothalamus	MOR-1	SC, Kat. H-80	1:3.000	1:3.000	55
	DOR-1	SC, Kat. H-60	1:1.000	1:3000	42
	KOR-1	SC, Kat. H-70	1:10.000	1:3.000	50
	KOR-3	SC, Kat. H-85	1:1.000	1:3.000	55
Striatum	MOR-1	SC, Kat. H-80	1:3.000	1:3.000	55
	DOR-1	SC, Kat. H-60	1:5.000	1:3000	42
	KOR-1	SC, Kat. H-70	1:10000	1:3.000	50
	KOR-3	SC, Kat. H-85	1:1000	1:3.000	55
Cerebrocortex	MOR-1	SC, Kat. H-80	1:3.000	1:3.000	55
	DOR-1	SC, Kat. H-60	1:1.000	1:3000	42
	KOR-1	SC, Kat. H-70	1:10.000	1:3.000	50
	KOR-3	SC, Kat. H-85	1:1000	1:3.000	55

Alle Antikörper wurden bei Santa Cruz (SC) erworben.

3 Ergebnisse

3.1 Opioid-Rezeptor-Expression bei SHR vs. WKY-Ratten

3.1.1 Periphere Parameter

3.1.1.1 Körpergewicht

Im Alter von 3 bis 4 Wochen konnte hinsichtlich des Körpergewichtes kein signifikanter Unterschied zwischen SHR und WKY-Ratten festgestellt werden. Im Verlauf zeigte sich eine signifikant geringere Zunahme des Körpergewichtes der SHR. Im Alter von 12 bis 13 Wochen betrug das Gewicht der SHR 261 ± 3 g, die WKY-Ratten wogen im Vergleich dazu 334 ± 2 g ($p < 0,001$; Tab. 3).

3.1.1.2 Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz

Die 3 bis 4 Wochen alten SHR in der prähypertensiven Phase zeigten im Vergleich zu gleichaltrigen WKY-Ratten keine signifikante Erhöhung des systolischen Blutdrucks (SBP). Im Alter von 12 bis 13 Wochen (Phase der etablierten Hypertonie) war der SBP bei SHR gegenüber gleichaltrigen WKY-Ratten signifikant erhöht ($p < 0,001$; Tab. 3).

Die Herzfrequenz (HR) unterschied sich bei 12 bis 13 Wochen alten SHR signifikant von der HR der WKY-Ratten gleichen Alters ($p < 0,05$; Tab. 3).

Tab. 3: Periphere Parameter der Versuchstiere

Alter (Wochen)	Körpergewicht (g)		SBP (mmHg)		HR (min^{-1})	
	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR
3-4 ^{a)}	73 ± 1	74 ± 2	120 ± 4	124 ± 6	426 ± 4	438 ± 6
12-13	334 ± 2	261 ± 3 ***	125 ± 1	184 ± 4 ***	353 ± 7	327 ± 3 *

Körpergewicht in Gramm (g), systolischer Blutdruck (SBP) in mmHg und Herzfrequenz (HR) in Herzschlägen pro Minute (min^{-1}) bei 3-4 und 12-13 Wochen alten SHR gegenüber gleichaltrigen WKY-Ratten. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben (n=4 bis 6 pro Gruppe und Alter). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. WKY-Ratten

^{a)}Die Daten für 3 bis 4 Wochen alte SHR und WKY-Ratten wurden dankenswerterweise von Charles River, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Die basale Opioid-Rezeptorexpression auf Proteinebene in zentralen Geweben

3.1.2.1 Hypothalamus

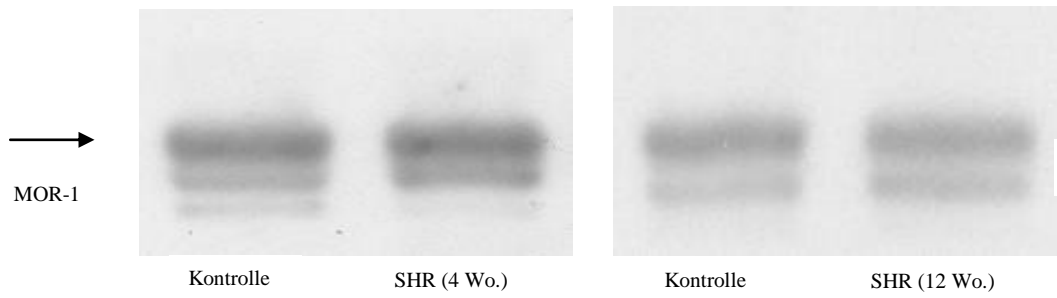
Im Hypothalamus zeigte sich bei 3 bis 4 Wochen alten SHR auf Proteinebene eine signifikante Erhöhung der MOR-1-Expression im Vergleich zu gleichaltrigen WKY-Ratten ($p < 0,01$). Im Alter von 12 bis 13 Wochen hingegen waren keine signifikanten Unterschiede der MOR-1-Expression zwischen den beiden Versuchsgruppen festzustellen. (Abb. 9A und Abb. 10A)

Die MOR-1 Expression war sowohl bei 3 bis 4 Wochen alten SHR als auch 12 bis 13 Wochen alten SHR gegenüber gleichaltrigen WKY-Ratten signifikant erniedrigt ($p < 0,05$). (Abb. 9B und Abb. 10B)

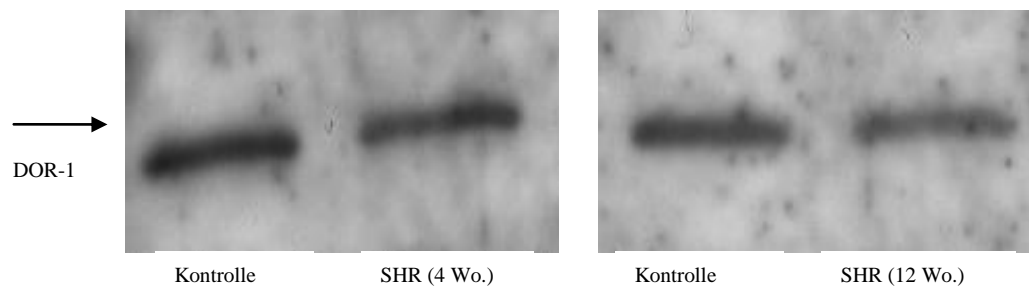
Bei 12 bis 13 Wochen alten SHR zeigte sich eine signifikante Erhöhung der KOR-1-Expression gegenüber WKY-Ratten gleichen Alters ($p < 0,01$). Im Alter von 3 bis 4 Wochen waren keine Unterschiede in der KOR-1-Expression zwischen SHR und WKY-Ratten auszumachen. (Abb. 9C und Abb. 10C)

Die Expression des KOR-3 zeigte bei beiden Versuchsgruppen im Alter von 3 bis 4 Wochen und 12 bis 13 Wochen keine signifikanten Unterschiede. (Abb. 9D und Abb. 10D)

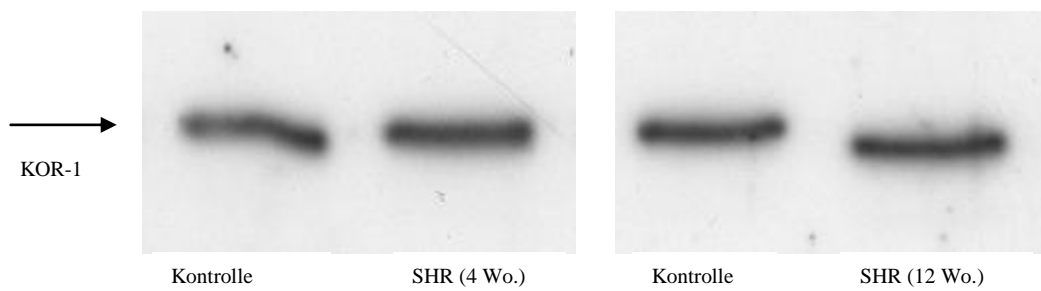
A



B



C



D

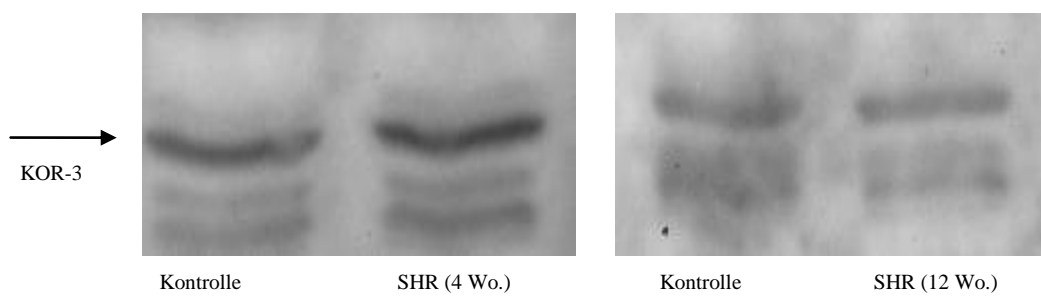


Abb. 9A-9D: Expression von MOR-1, DOR-1, KOR-1 und KOR-3 im Hypothalamus bei 4 bzw. 12 Wochen alten SHR vs. Kontrolle (Western Blot).

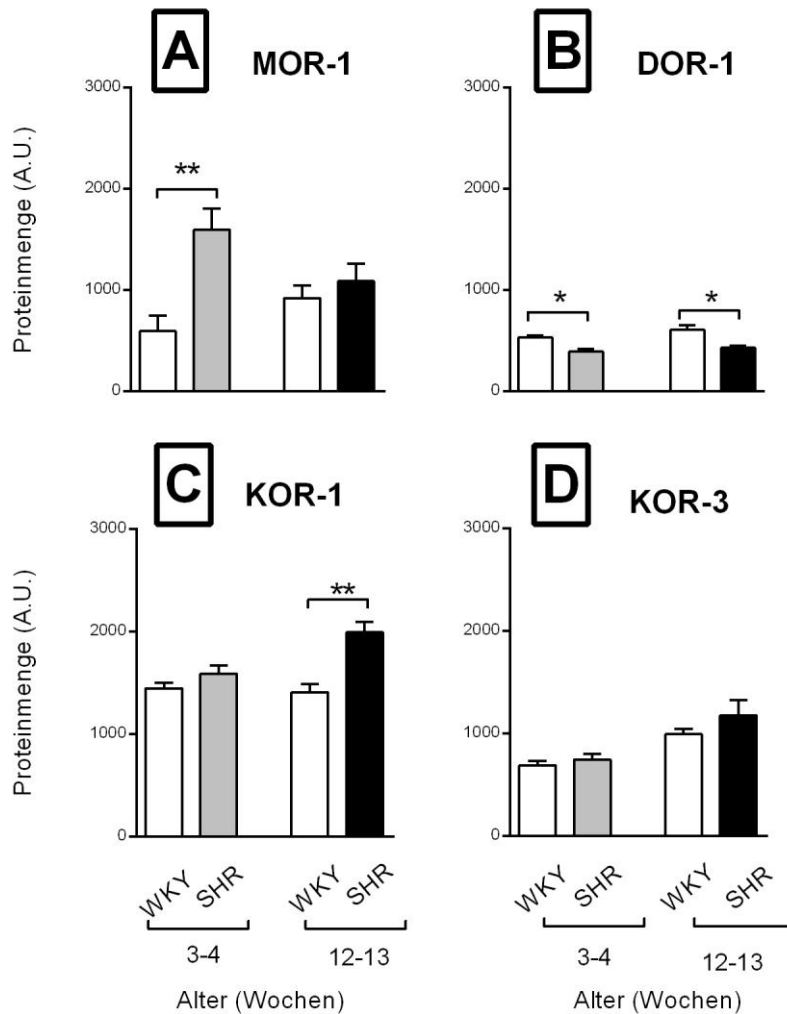


Abb. 10A-10D: Bestimmung der basalen Opioid-Rezeptor-Proteinexpression im Hypothalamus von SHR und WKY-Ratten im Alter von 3 bis 4 bzw. 12 bis 13 Wochen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n=4 bis 6 Ratten pro Versuchsgruppe und Alter). *p<0,05; **p<0,01 vs. gleichaltrige WKY-Ratten; A.U. arbitrary unit

3.1.2.2 Striatum

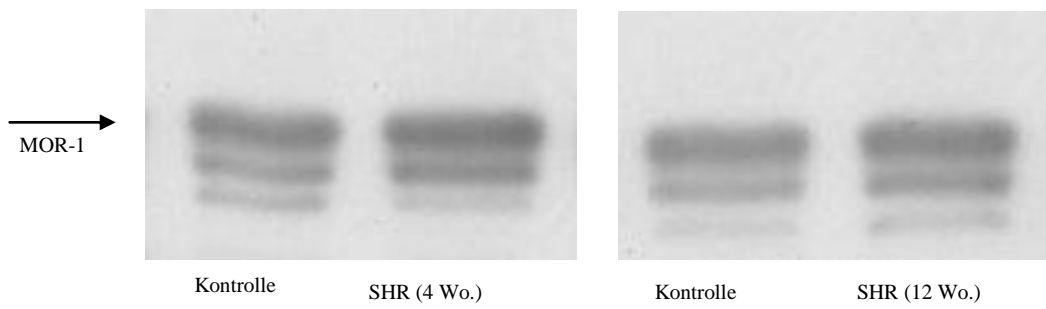
Im Striatum (Ncl. caudatus und Putamen) fand sich eine signifikant erhöhte MOR-1-Expression bei 3 bis 4 Wochen sowie 12 bis 13 Wochen alten SHR gegenüber WKY-Ratten (p<0,01). (Abb. 11A und Abb. 12A)

Hinsichtlich der DOR-1-Expression gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen SHR und WKY-Ratten in beiden Altersgruppen. (Abb. 11B und Abb. 12B)

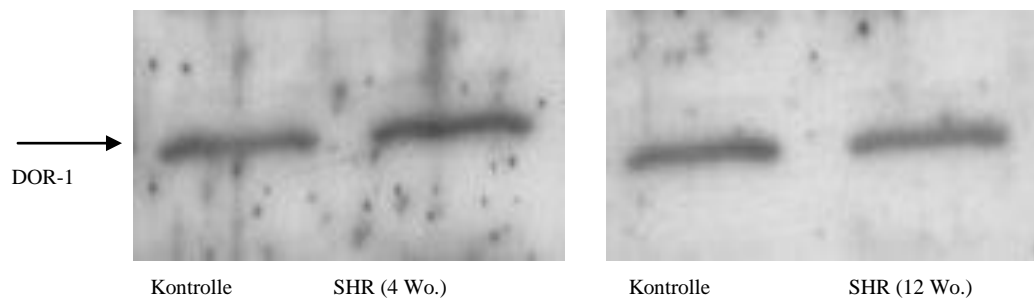
Die KOR-1-Levels waren bei SHR in beiden Altersgruppen gegenüber WKY-Ratten gleichen Alters signifikant erhöht (3 bis 4 Wochen $p < 0,01$; 12 bis 13 Wochen $p < 0,05$). (Abb. 11C und Abb. 12C)

Die Bestimmung der KOR-3-Expression zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen SHR und WKY-Ratten beider Altersstufen. (Abb. 11D und Abb. 12D).

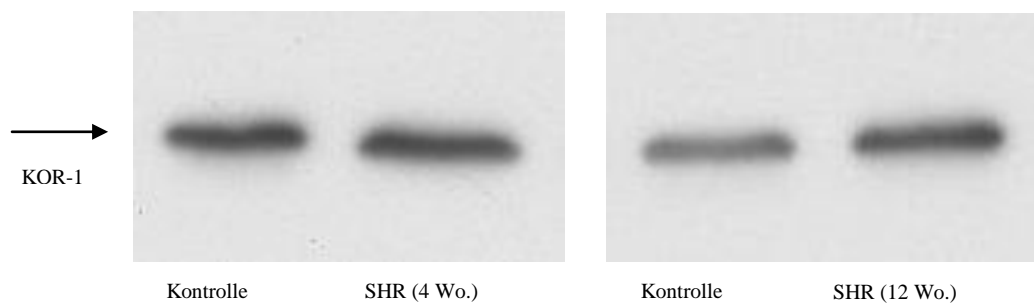
A



B



C



D

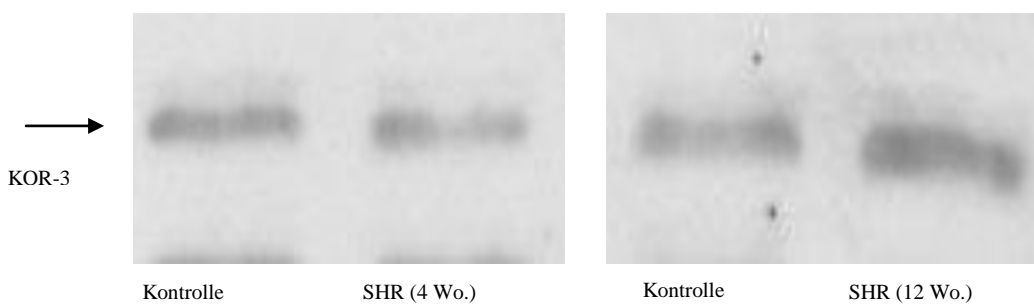


Abb. 11A-11D: Expression von MOR-1, DOR-1, KOR1 und KOR-3 im Striatum bei 4 bzw. 12 Wochen alten SHR vs. Kontrolle (Western Blot).

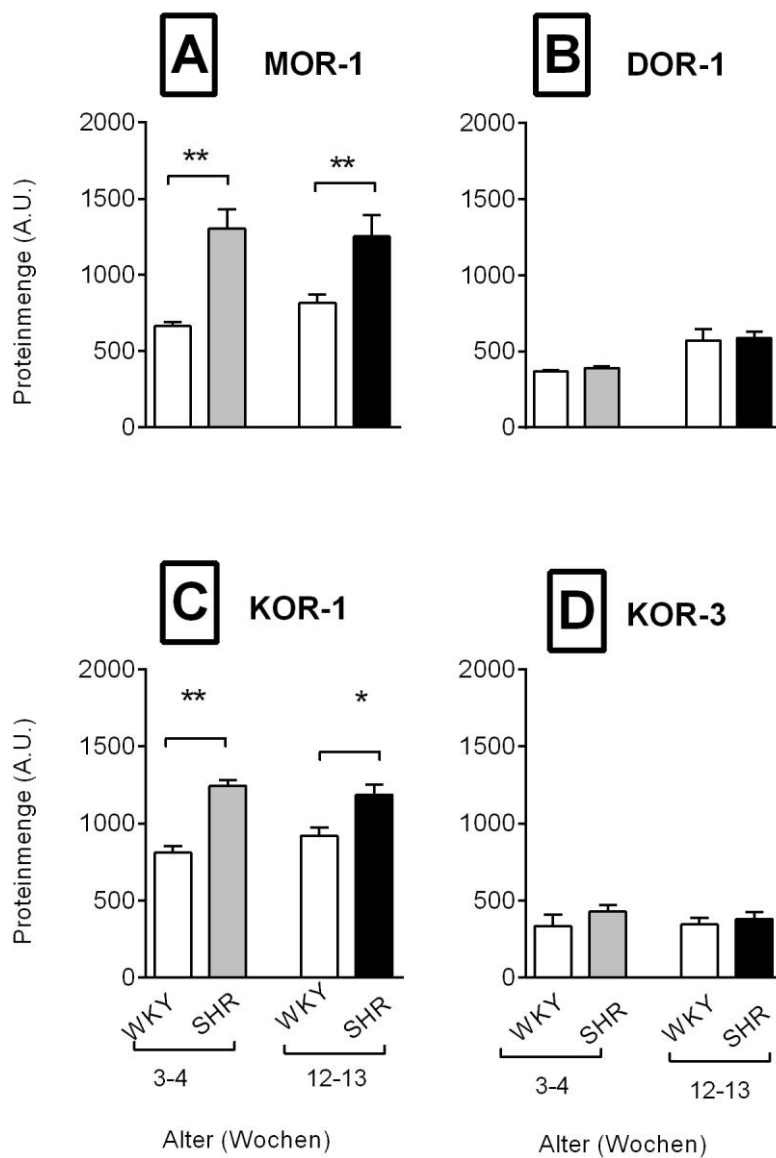


Abb. 12A-12D: Bestimmung der basalen Opioid-Rezeptor-Proteinexpression im Striatum von 3 bis 4 bzw. 12 bis 13 Wochen alten SHR und WKY-Ratten. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n=4 bis 6 Ratten pro Versuchsgruppe und Alter). *p<0,05; **p<0,01 vs. gleichaltrige WKY-Ratten; A.U. arbitrary unit

3.1.2.3 Cerebrocortex

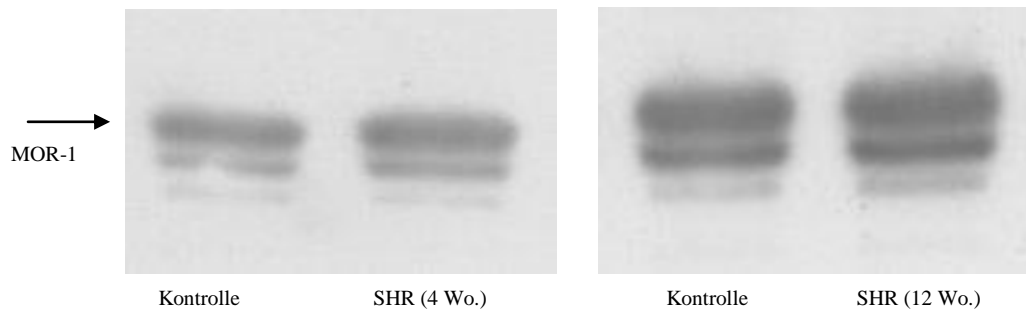
Im Cortex zeigte sich eine signifikante Erhöhung der MOR-1-Expression bei 12-13 Wochen alten SHR gegenüber WKY-Ratten ($p < 0,01$). (Abb. 13A und Abb. 14A)

Die DOR-1-Expression war in SHR nicht signifikant gegenüber WKY-Ratten verändert. (Abb. 13B und Abb. 14B)

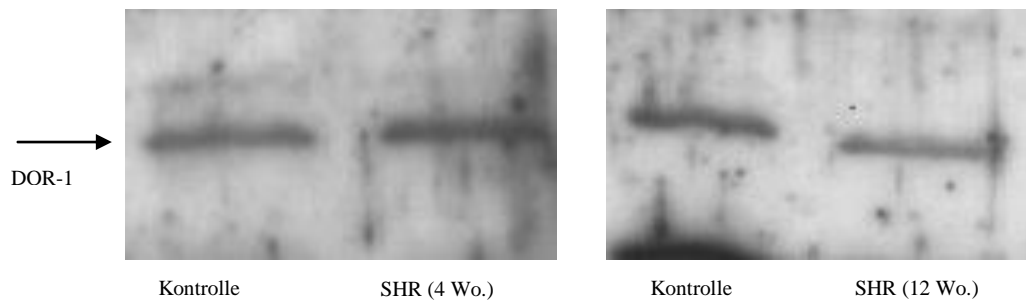
In SHR zeigte sich in beiden Altersstufen eine signifikante Erniedrigung der KOR-1-Expression im Vergleich zu WKY-Ratten ($p < 0,01$). (Abb. 13C und Abb. 14C)

Die KOR-3-Expression zeigte sich nicht signifikant verändert bei SHR gegenüber WKY-Ratten in beiden Altersgruppen. (Abb. 13D und Abb. 14D).

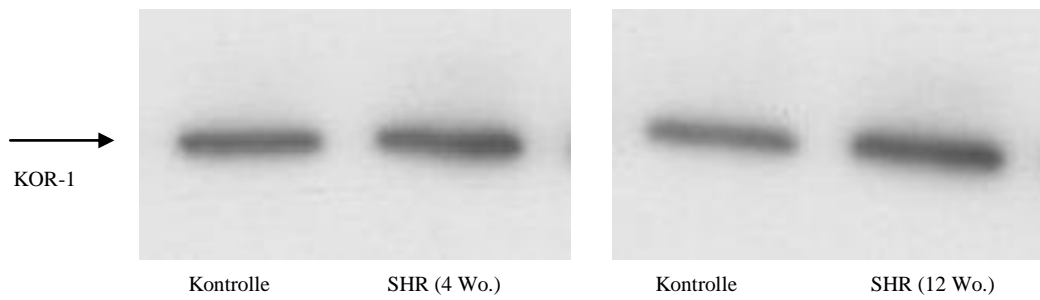
A



B



C



D

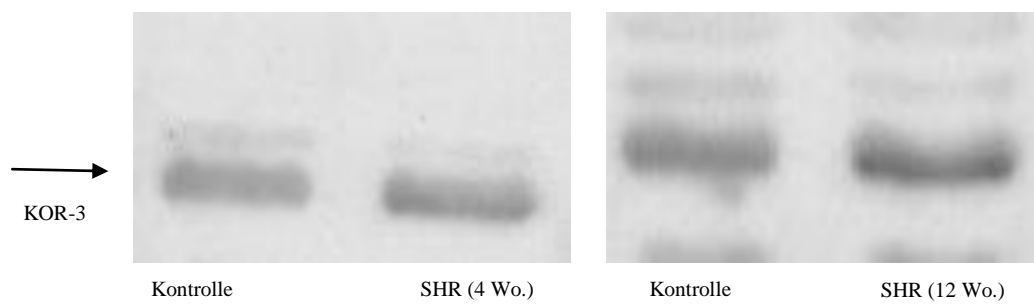


Abb. 13A-13D: Expression des MOR-1, DOR-1, KOR-1 und KOR-3 im Cortex bei 4 bzw. 12 Wochen alten SHR vs. Kontrolle (Western Blot).

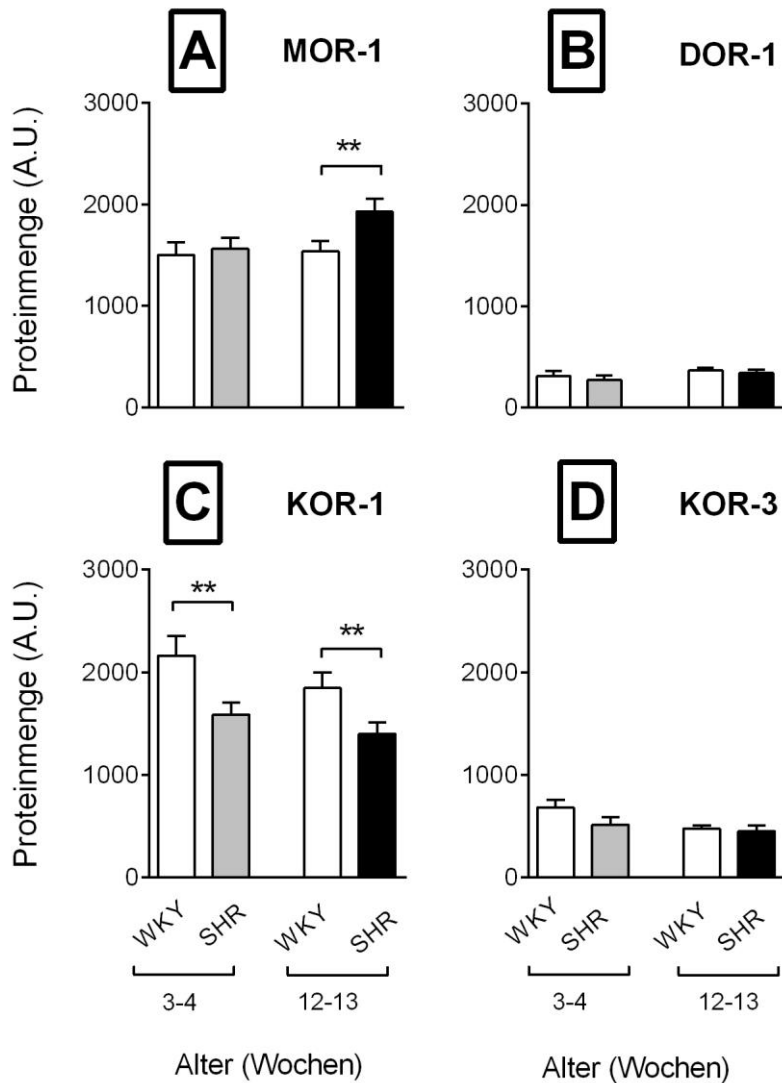


Abb. 14A-14D: Bestimmung der basalen Opioid-Rezeptor-Proteinexpression im Cortex von 3 bis 4 bzw. 12 bis 13 Wochen alten SHR und WKY-Ratten. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (n=4 bis 6 Ratten pro Versuchsgruppe und Alter). **p<0,01 vs. gleichaltrige WKY-Ratten; A.U. arbitrary unit

3.2 Opioid-Rezeptor-Expression nach chronisch antihypertensiver Behandlung

3.2.1 Periphere Parameter

3.2.1.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht der SHR wurde am 7. Tag vor Beginn der antihypertensiven Therapie sowie am 20. Tag der Therapie bestimmt. Vor Therapiebeginn unterschieden sich die SHR hinsichtlich des Körpergewichtes nicht signifikant voneinander, sodass alle Versuchstiere mit ähnlichem Gewicht die Therapie begannen. Die Messung des Körpergewichtes am 20.

Behandlungstag zeigte eine ähnliche Gewichtszunahme aller SHR. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den SHR unterschiedlicher Behandlungsgruppen.

3.2.1.2 Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz

SBP und HR wurden ebenfalls am 7. Tag vor Therapiebeginn und am 20. Tag der Therapie gemessen.

Vor Beginn der antihypertensiven Therapie zeigten sich bei den SHR der verschiedenen Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des SBP. Am 20. Tag der Therapie war der SBP in allen Behandlungsgruppen (Bisoprolol, Propranolol, Enalapril, Candesartan, Hydralazin) signifikant gesunken ($p < 0,001$), während sich in der Vehikelgruppe keine signifikante Änderung des SBP ergab.

Die HR der einzelnen Versuchstiere unterschieden sich in den sieben Tagen vor Therapiebeginn nicht signifikant voneinander. Am 20. Tag der Behandlung war die HR der Tiere, die Bisoprolol und Propranolol erhielten, signifikant gesunken ($p < 0,0001$). In den übrigen Behandlungsgruppen sowie in der Vehikelgruppe zeigten sich keine signifikanten Änderungen der HR (Tab. 4).

Tab. 4: Periphere Parameter der Versuchstiere vor und nach antihypertensiver Behandlung

Behandlung	Körpergewicht (g)		SBP (mmHg)		HR (min ⁻¹)	
	vor	nach	vor	nach	vor	nach
Vehikel (1mL/kg KG/d)	264±3	286±4	184±3	194±3	327±3	348±6
Bisoprolol (10mg/kgKG/d)	260±2	287±2	182±2	164±2***	336±5	296±4***
Propranolol (50mg/kgKG/d)	258±3	281±3	188±2	171±2***	350±7	304±5***
Enalapril (10mg/kgKG/d)	261±4	277±4	180±3	152±2***	334±4	345±7
Candesartan (3mg/kg KG/d)	259±4	280±5	182±3	148±1***	326±5	339±7
Hydralazin (3mg/kg KG/d)	260±4	280±4	179±3	148±2***	331±5	372±8

Körpergewicht in Gramm (g), systolischer Blutdruck (SBP) in mmHg und Herzfrequenz (HR) in Herzschlägen pro Minute (min⁻¹). Die Daten wurden jeweils sieben Tage (d) vor Beginn der antihypertensiven Therapie (vor) und am 20. Tag der Therapie (nach) ermittelt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM angegeben (n= 10 Ratten pro Gruppe). ***p<0,001 vs. Vehikel

3.2.2 Opioid-Rezeptor-Expression auf Proteinebene in zentralen Geweben nach antihypertensiver Behandlung

3.2.2.1 Hypothalamus

Nach Applikation des β_1 -selektiven Blockers Bisoprolol zeigte sich im Hypothalamus eine unveränderte Expression des MOR-1 sowie des KOR-1 und KOR-3. Eine signifikante Erhöhung ($p<0,001$) zeigte sich hingegen bei der DOR-1-Expression.

Nach Behandlung mit dem nicht-selektiven β -Blocker Propranolol zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung der DOR-1-Expression ($p<0,001$) bei unveränderter Expression des MOR-1, KOR-1 und KOR-3.

In der mit Enalapril therapierten Gruppe zeigte sich eine signifikante Erhöhung der DOR-1-Expression ($p < 0,01$) und KOR-1-Expression ($p < 0,01$). Auch nach Candesartan-Therapie zeigte sich eine signifikante DOR-1-Erhöhung ($p < 0,001$) und KOR-1-Erhöhung ($p < 0,01$). Unverändert zeigte sich die Expression des MOR-1 und KOR-3 nach antihypertensiver Therapie mit beiden RAAS-Blockern.

Der periphere Vasodilatator Hydralazin bewirkte einen Anstieg der DOR-1-Expression ($p < 0,001$) sowie der KOR-1-Expression ($p < 0,01$). Eine Auswirkung auf die Expression des MOR-1 sowie KOR-3 war nicht zu zeigen (Abb. 15A-15D und Abb. 16A-16D).

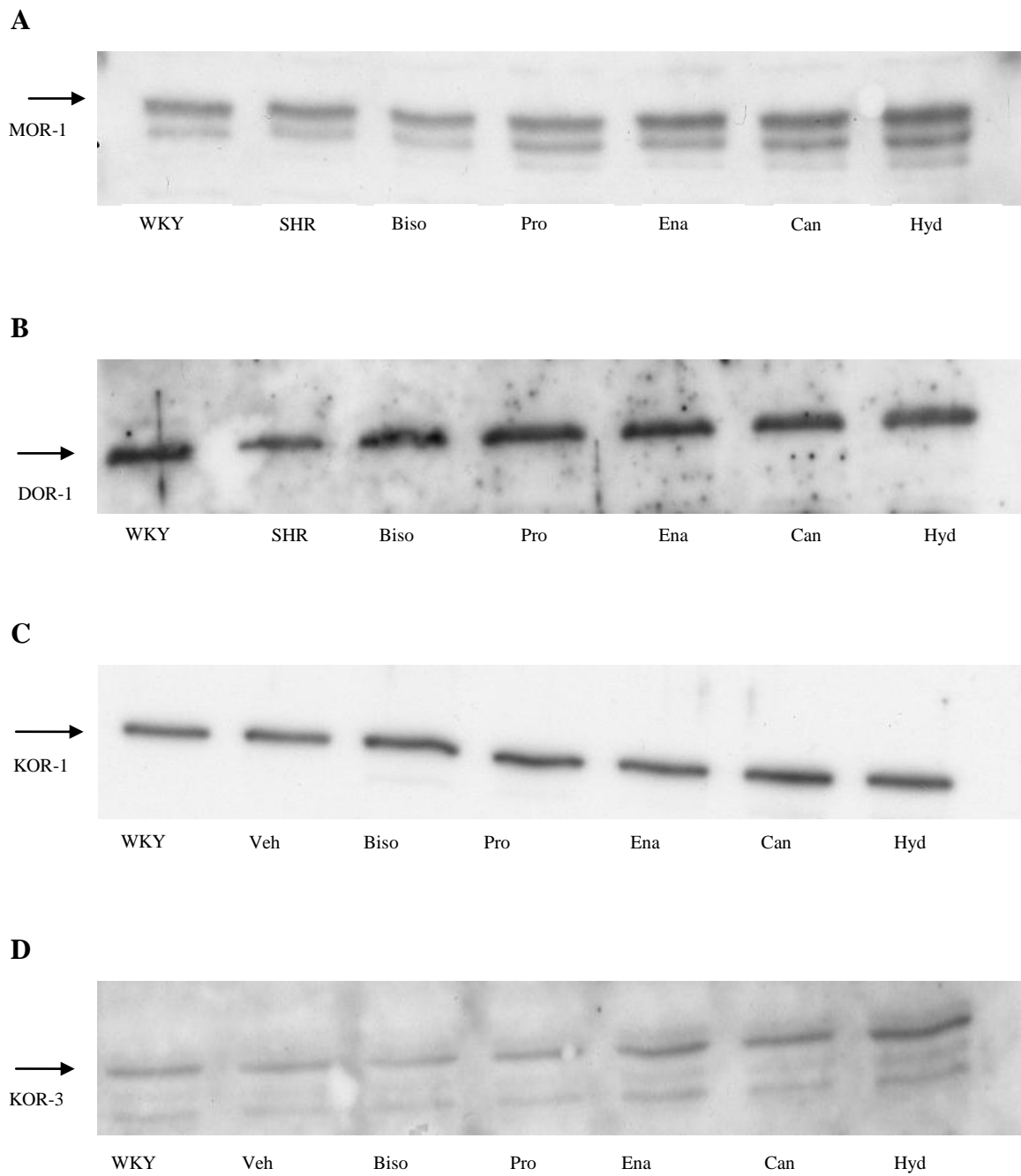


Abb. 15A-15D: Expression des MOR-1, DOR-1, KOR-1 und KOR-3 im Hypothalamus nach antihypertensiver Behandlung der 12-13 Wochen alten Tiere (Western Blot). Veh: Vehikel; Biso: Bisoprolol; Pro: Propranolol; Ena: Enalapril; Can: Candesartan; Hyd: Hydralazin

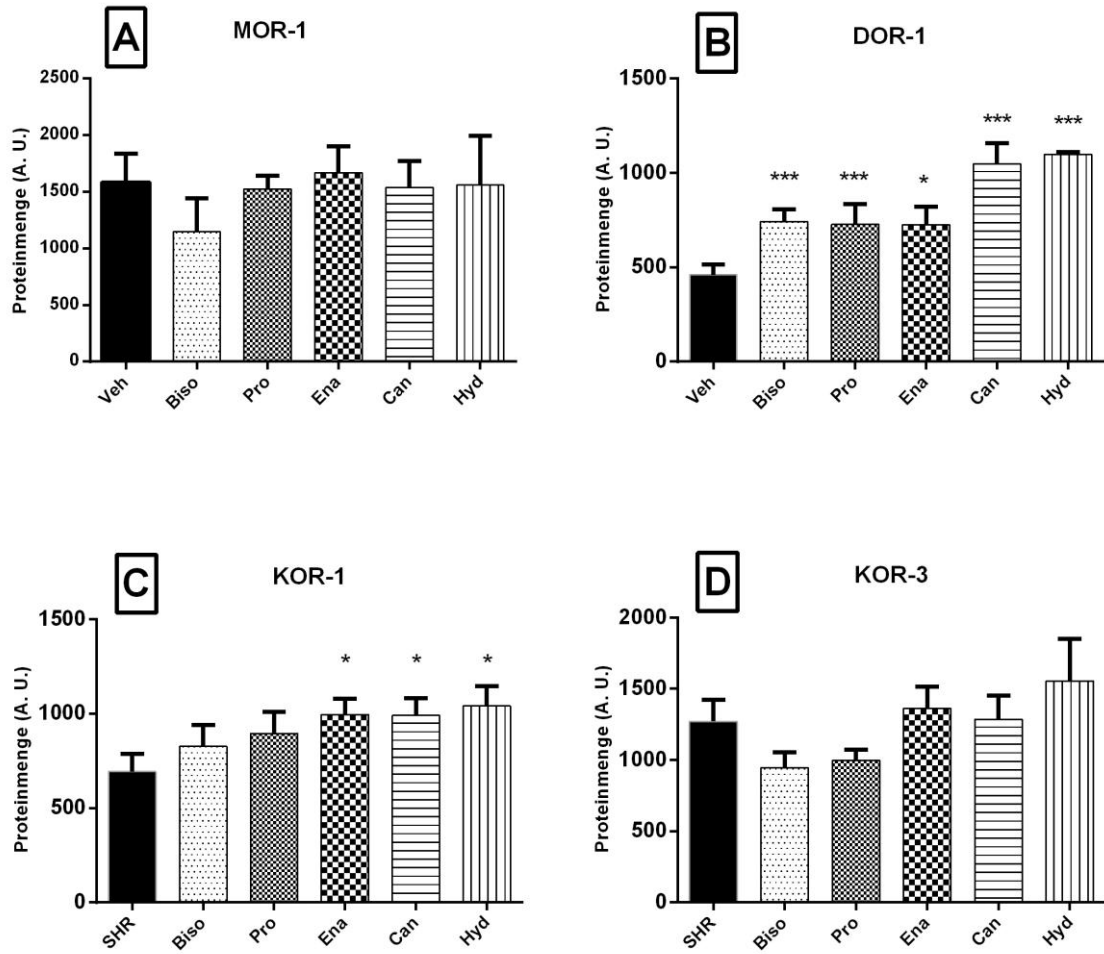
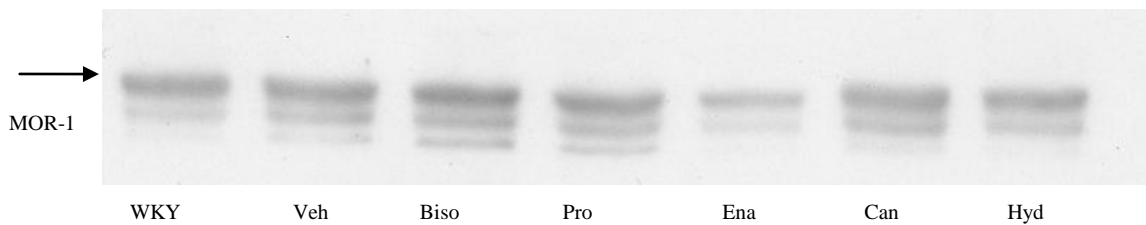


Abb. 16A-16D: Opioid-Rezeptor-Expression im Hypothalamus von 12 bis 13 Wochen alten SHR nach 4-wöchiger antihypertensiver Therapie mit Bisoprolol (Biso), Propranolol (Pro), Enalapril (Ena), Candesartan (Can) und Hydralazin (Hyd). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben (n=10 Ratten pro Versuchsgruppe). ***p<0,001 vs. Vehikel (Veh), A. U. arbitrary units

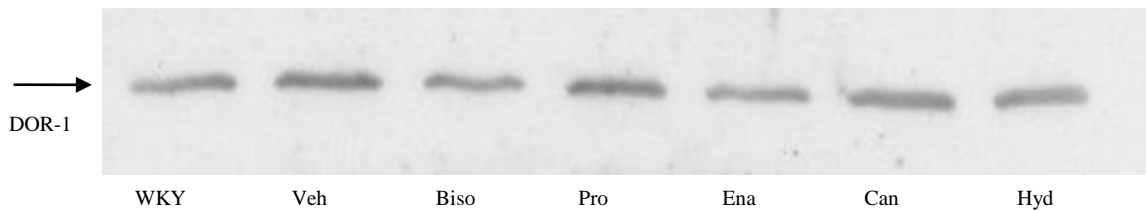
3.2.2.2 Striatum

Im Striatum zeigte sich bei allen untersuchten Opioid-Rezeptoren (MOR-1, DOR-1, KOR-1, KOR-3) keine signifikant veränderte Expression durch die verschiedenen chronisch verabreichten Antihypertensiva (Abb. 17A-17D und Abb. 18A-18D).

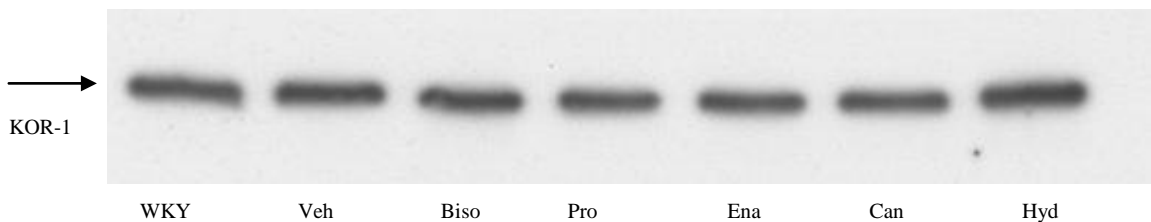
A



B



C



D

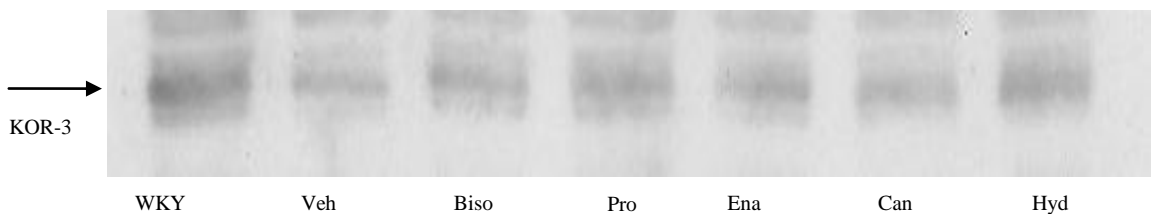


Abb. 17A-17D: Expression des MOR-1, DOR-1, KOR-1 und KOR-3 im Striatum nach antihypertensiver Therapie der 12-13 Wochen alten Tiere (Western Blot). Veh: Vehikel; Biso: Bisoprolol; Pro: Propranolol; Ena: Enalapril; Can: Candesartan; Hyd: Hydralazin

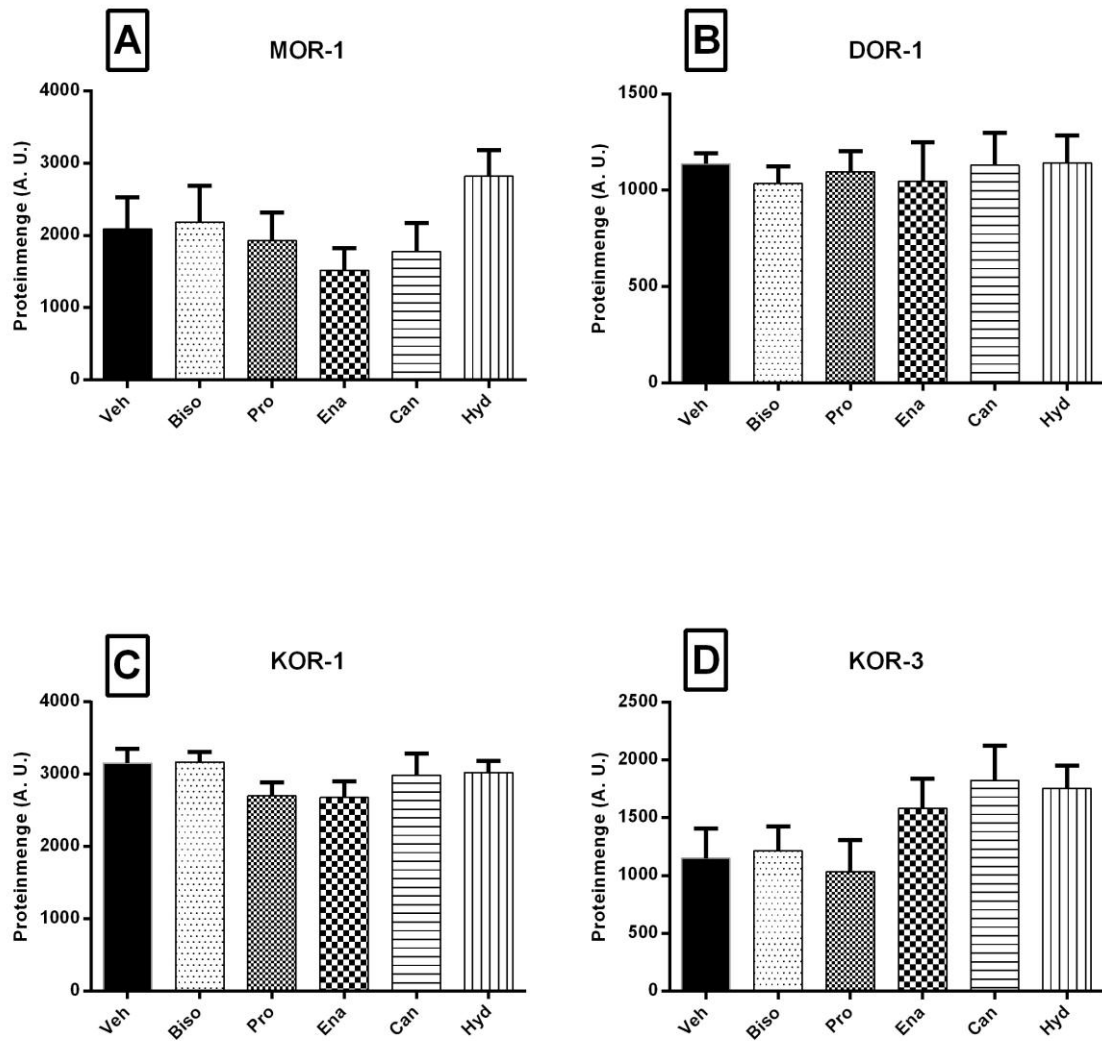


Abb. 18A-18D: Opioid-Rezeptor-Expression im Striatum von 12 bis 13 Wochen alten SHR nach 4-wöchiger antihypertensiver Therapie mit Bisoprolol (Biso), Propranolol (Pro), Enalapril (Ena), Candesartan (Can) und Hydralazin (Hyd). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben (n=10 Ratten pro Versuchsgruppe). A. U. arbitrary units

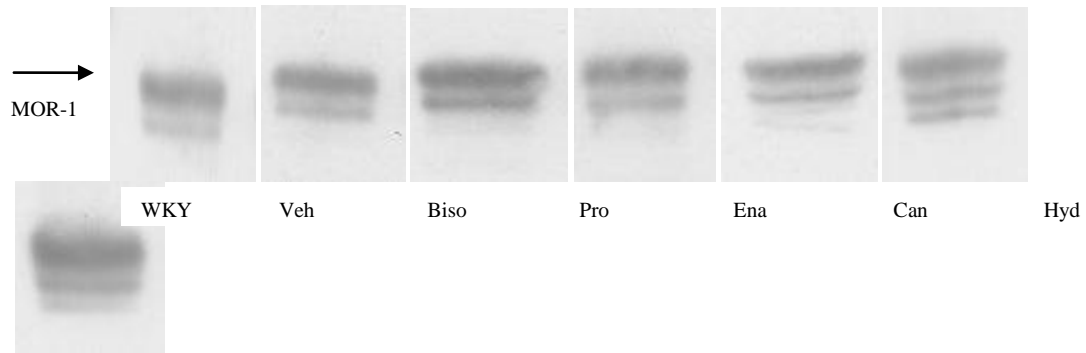
3.2.2.3 Cerebrocortex

Die β -Blocker Bisoprolol und Propranolol führten in der Therapiegruppe zu einer vermehrten Expression von DOR-1 (Bisoprolol $p < 0,001$ vs. Vehikel; Propranolol $p < 0,001$ vs. Vehikel).

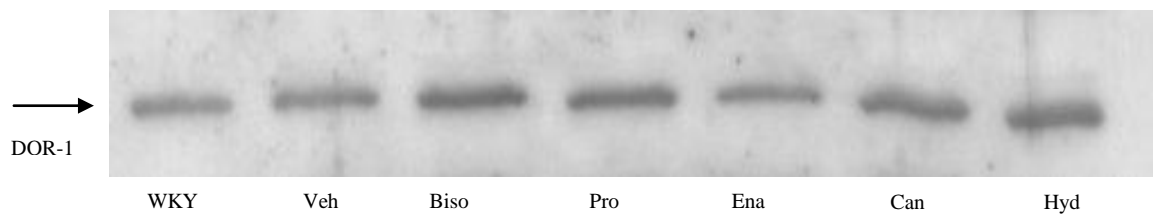
In der mit dem peripheren Vasodilatator Hydralazin behandelten Gruppe zeigte sich eine verminderte Expression des MOR-1 ($P < 0,001$ vs. Vehikel).

Alle anderen eingesetzten Antihypertensiva führten zu keiner signifikanten Änderung der Expression von MOR-1, DOR-1, KOR-1 oder KOR-3 (Abb. 19A-19D und Abb. 20A-20D).

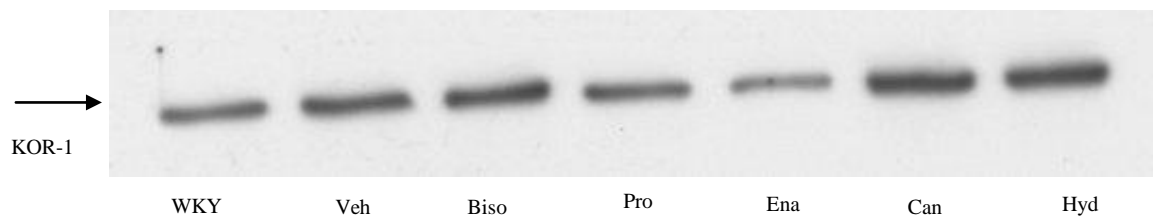
A



B



C



D

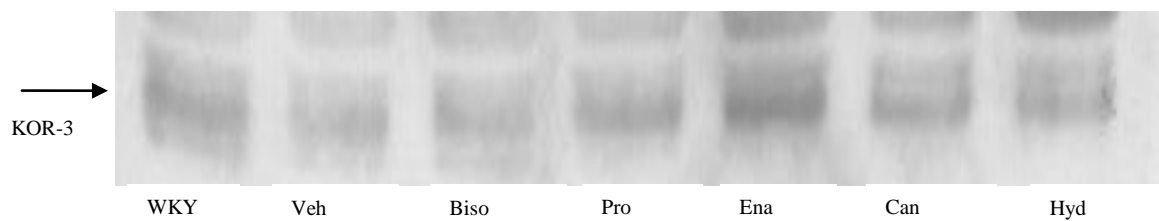


Abb. 19A-19D: Expression des MOR-1, DOR-1, KOR-1 und KOR-3 im Cortex nach antihypertensiver Therapie der 12-13 Wochen alten Tiere (Western Blot). Veh: Vehikel, Biso: Bisoprolol; Pro: Propranolol; Ena: Enalapril; Can: Candesartan; Hyd: Hydralazin

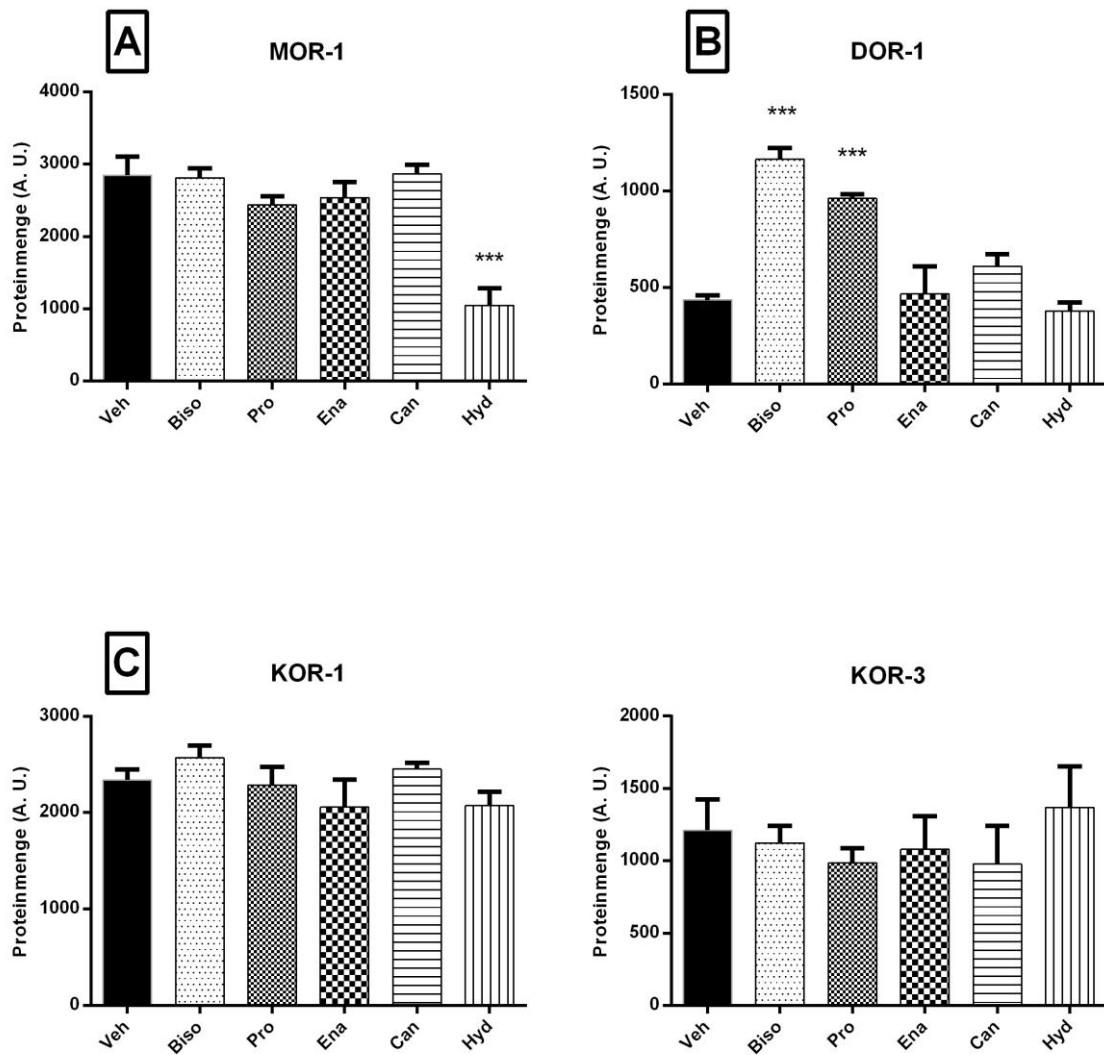


Abb. 20A-20D: Opioid-Rezeptor-Expression im Cerebrocortex von 12 bis 13 Wochen alten SHR nach 4-wöchiger antihypertensiver Therapie mit Bisoprolol (Biso), Propranolol (Pro), Enalapril (Ena), Candesartan (Can) und Hydralazin (Hyd). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM angegeben (n=10 Ratten pro Versuchsgruppe). ***p<0,001 vs. Vehikel, A. U. arbitrary units

Zusammenfassung der Ergebnisse:

1. SHR zeigen sowohl in der prähypertensiven als auch in der hypertensiven Phase eine geringere Gewichtszunahme als gleichaltrige WKY-Ratten.
2. SHR zeigen im Alter von 12-13 Wochen eine etablierte Hypertonie sowie eine erhöhte Herzfrequenz im Vergleich zu WKY-Ratten.
3. Die basale Expression von MOR-1, DOR-1 und KOR-1 ist in zentralen Geweben (Hypothalamus, Striatum, Cortex) der SHR verändert. In der prähypertensiven Phase ist die basale Expression des MOR-1 in Hypothalamus und Striatum signifikant erhöht. Die DOR-1-Expression zeigte sich in der prähypertensiven Phase im Hypothalamus erniedrigt. Die KOR-1-Expression ist in der prähypertensiven Phase im Striatum signifikant erhöht, im Cortex hingegen signifikant erniedrigt. Die Expression von KOR-3 zeigte keine signifikanten Unterschiede in beiden Tiermodellen. (Tab. 5)

In der hypertensiven Phase ist die basale MOR-1-Expression im Striatum sowie im Cortex signifikant erhöht. Die DOR-1-Expression ist im Hypothalamus signifikant erniedrigt. Die Expression des KOR-1 ist im Hypothalamus sowie im Striatum signifikant erhöht, im Cortex signifikant erniedrigt. Die KOR-3-Expression zeigte auch im hypertensiven Stadium keine signifikanten Unterschiede. (Tab. 6)

4. Alle eingesetzten Antihypertensiva (Propranolol, Bisoprolol, Enalapril, Candesartan und Hydralazin) senkten den systolischen Blutdruck der SHR signifikant zwischen minimal 17 mmHg und maximal 34 mmHg. Unter Behandlung mit Propranolol und Bisoprolol ließ sich zudem die Herzfrequenz der SHR signifikant senken.
5. In antihypertensiv behandelten SHR zeigte sich im Hypothalamus eine signifikante Erhöhung der DOR-1-Expression in allen Behandlungsgruppen. Zudem ist die KOR-1-Expression bei den mit Enalapril, Candesartan und Hydralazin behandelten

Tieren signifikant erhöht (Tab. 7). Im Cortex fanden wir nach Behandlung mit Bisoprolol und Propranolol eine erhöhte Expression des DOR-1 sowie eine verminderte Expression von MOR-1 (Tab. 9).

Im Striatum trat in keiner Behandlungsgruppe eine signifikante Änderung der Rezeptorexpression auf (Tab. 8).

Tab. 5: OR-Expression in der prähypertensiven Phase

Prähypertensive Phase	Hypothalamus	Striatum	Cortex
MOR-1	↑	↑	—
DOR-1	↓	—	—
KOR-1	—	↑	↓
KOR-3	—	—	—

Expression der untersuchten Opioid-Rezeptoren in Hypothalamus, Striatum und Cortex 3 bis 4 Wochen alter SHR (prähypertensive Phase) verglichen mit gleichaltrigen WKY-Ratten.

Tab. 6: OR-Expression in der Phase der etablierten Hypertonie

Hypertensive Phase	Hypothalamus	Striatum	Cortex
MOR-1	—	↑	↑
DOR-1	↓	—	—
KOR-1	↑	↑	↓
KOR-3	—	—	—

Expression der untersuchten Opioid-Rezeptoren in Hypothalamus, Striatum und Cortex 12 bis 13 Wochen alter SHR (Phase der etablierten Hypertonie) verglichen mit gleichaltrigen WKY-Ratten.

Tab. 7: OR-Expression im Hypothalamus nach antihypertensiver Therapie

Hypothalamus	Bisoprolol	Propranolol	Enalapril	Candesartan	Hydralazin
MOR-1	-	-	-	-	-
DOR-1	↑	↑	↑	↑	↑
KOR-1		-	↑	↑	↑
KOR-3	-	-	-	-	-

Tab. 8: OR-Expression im Striatum nach antihypertensiver Therapie

Striatum	Bisoprolol	Propranolol	Enalapril	Candesartan	Hydralazin
MOR-1	–	–	–	–	–
DOR-1	–	–	–	–	–
KOR-1	–	–	–	–	–
KOR-3	–	–	–	–	–

Tab. 9: OR-Expression im Cortex nach antihypertensiver Therapie

Cortex	Bisoprolol	Propranolol	Enalapril	Candesartan	Hydralazin
MOR-1	–	–	–	–	↓
DOR-1	↑	↑	–	–	–
KOR-1	–	–	–	–	–
KOR-3	–	–	–	–	–

4 Diskussion

4.1 Die basale Opioid-Rezeptor-Expression im Gehirn der SHR ist verändert

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Studie zeigen signifikante Änderungen der Menge der Opioid-Rezeptoren insbesondere im Hypothalamus, aber ebenfalls in Striatum und Cortex der SHR im Vergleich mit WKY-Ratten, die zum Teil altersabhängig zu sein scheinen.

So fanden wir im Hypothalamus eine Erhöhung der MOR-1-Menge bei 3 bis 4 Wochen alten SHR im prähypertensiven Stadium, während im Alter von 12 bis 13 Wochen bei etablierter Hypertonie keine signifikanten Unterschiede zwischen SHR und normotensiven WKY-Ratten festgestellt werden konnten. Im Striatum war die basale Expression des MOR-1 sowohl bei SHR im prähypertensiven Stadium als auch im Stadium der etablierten Hypertonie erhöht; im Cortex wiederum konnten wir eine signifikante Erhöhung der MOR-1-Menge bei 12 bis 13 Wochen alten, hypertensiven Ratten nachweisen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Gulati et al., 1990, die bei zehn Wochen alten SHR eine höhere Dichte an MOR im Hypothalamus sowie im Mittelhirn fanden.

Besonders interessant ist hierbei sicherlich die signifikante Erhöhung der MOR-1-Menge im Hypothalamus bei prähypertensiven SHR, da der Hypothalamus eine wichtige Rolle in der Regulation des Blutdrucks spielt (Adair et al., 1975; Akine et al. 2003; Buijs et al., 2014).

Der MOR-1 kommt nahezu ausschließlich im Gehirn vor (Pasternak, 1986). In Studien ließ sich zeigen, dass über MOR-Agonisten eine Zunahme des Blutdrucks sowie der Herzfrequenz vermittelt wird. Auffällig ist hierbei, dass der Blutdruck bei zentraler Applikation von MOR-Agonisten bei SHR deutlicher stieg als bei den WKY-Kontrolltieren (Feuerstein et al., 1983; Jin et al., 1991). Zudem konnten Feuerstein et al., 1983, zeigen, dass die Plasmakonzentration der blutdruckerhöhenden Katecholamine Adrenalin sowie Noradrenalin nach zentraler Applikation des MOR-Agonisten DAGO anstieg. In einer Studie von Jin et al., 1991, fand sich sogar auch eine signifikant erhöhte Plasmakonzentration von Adrenalin und Noradrenalin nach zentraler Applikation des MOR-Agonisten β -Endorphin bei SHR gegenüber WKY-Ratten.

Eine Beteiligung der hypothalamischen MOR an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie ist durch die erhöhte Expression der Rezeptoren mit konsekutiv erhöhter Plasmakonzentration der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin und stärkerer sympathikusvermittelter Blutdrucksteigerung bei SHR gegenüber WKY-Ratten zu erklären.

Signifikant erniedrigt hingegen zeigten sich bei unserer Untersuchung die DOR-1-Spiegel im Hypothalamus der SHR, und zwar sowohl bei jungen Ratten in der prähypertensiven Phase als auch bei älteren Ratten mit manifester Hypertonie. DOR-Agonisten wie DADL rufen nach zentraler Gabe ebenfalls einen Blutdruck- und Frequenzanstieg hervor (Pfeiffer et al., 1983). Die Abnahme der Rezeptordichte könnte daher kompensatorisch erfolgen, d. h., durch die Down-Regulation der DOR im Hypothalamus wird dem erhöhten Blutdruck versucht entgegenzuwirken. Eine Down-Regulation von DOR bei gleichzeitiger Erhöhung des hauptsächlichen Liganden am DOR, dem (Leu)Enkephalin, im Herzen der SHR wurde von Dumont et al. 1988 bereits beschrieben. Hierzu passen auch die Studienergebnisse von Hoegler et al., 1989, sowie Boone et al., 1994, die erhöhte Preproenkephalin- bzw. Proenkephalin-mRNA-Spiegel im Hypothalamus der SHR zeigten. Ähnlich wie beim MOR-1 fand sich auch bei zentraler Gabe von Enkephalinen in einer experimentellen Studie von Schaz et al., 1980, eine stärkere Zunahme des Blutdrucks bei SHR im Vergleich zu WKY-Ratten.

Gegensätzlich zu unseren Untersuchungen zeigten sich Ergebnisse von Yin et al., 1996, welche bei SHR in der hypertensiven Phase (Alter 16 Wochen) eine höhere Dichte an DOR im Hypothalamus im Vergleich mit normotensiven WKY-Ratten nachwiesen.

Bhargava et al. fanden 1993 experimentell keine signifikanten Unterschiede im Bindungsverhalten des selektiven DOR-Agonisten 3H-D-Pen2-D-Pen5-enkephalin (DPDPE) im Hypothalamus sowie auch in Cortex und Striatum von SHR und WKY-Ratten. Hier ist die Datenlage sicherlich widersprüchlich und eine Beteiligung v. a. hypothalamischer DOR an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie bleibt ungewiss.

Keine signifikanten Unterschiede konnten wir bei der Expression striataler und kortikaler DOR-1 zeigen. Bedacht werden sollte hierbei jedoch, dass gerade die Expression von DOR-1, ebenso wie von MOR-1, im Hypothalamus deutlich weniger ausgeprägt ist, als in Striatum und Cortex, wie sich durch autoradiographische Studien zeigen ließ (Mansour et

al., 1986/87). Bei niedrigerer Rezeptorendichte fallen sicherlich kleinere Unterschiede stärker ins Gewicht als bei der Untersuchung von Hirnregionen mit deutlich höherer Rezeptorendichte.

Auf der anderen Seite ist dem Hypothalamus mit seinen Kerngebieten, insbesondere dem Ncl. paraventricularis (Freisetzung von Noradrenalin) sowie dem Ncl. supraopticus (Freisetzung von Vasopressin), in der Bedeutung der Blutdruckregulation eine maßgebliche Rolle zuzuschreiben. Somit ist hier sicherlich eher mit Unterschieden zwischen hyper- und normotensiven Ratten hinsichtlich der Verteilung der Opioid-Rezeptoren zu rechnen.

Die KOR-1-Expression zeigte sich in der vorliegenden Studie im Hypothalamus von 12 bis 13 Wochen alten SHR sowie im Striatum der SHR jeden Alters erhöht. Im Gegensatz hierzu fand sich im Cortex der SHR eine geringere Expression an KOR-1 verglichen mit gleichaltrigen WKY-Ratten. Diese Ergebnisse ähneln teilweise den Beobachtungen von Bhargava et al., 1986, die im Hypothalamus und allerdings auch im Cortex der SHR eine signifikant erhöhte Dichte an KOR, verglichen mit gleichaltrigen normotensiven WKY-Ratten, fanden. Bhargava et al. konnten 1988 weiterhin zeigen, dass auch die über selektive KOR-Agonisten vermittelte analgetische und diuretische Wirkung bei SHR im Vergleich zu WKY-Ratten stärker ausgeprägt ist. Der hauptsächliche Ligand am KOR, Dynorphin, war in entsprechenden Studien im Hypothalamus der SHR verringert (Feuerstein et al., 1983). Weiterhin ließ sich durch introhippocampale Applikation von Dynorphinen eine anxiolytische sowie blutdrucksenkende Wirkung bei SHR zeigen (Wright und Ingenito, 2001). Somit wäre eine indirekte Beteiligung des KOR an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie möglich. Durch Studien weiß man, dass über KOR eine Blutdrucksenkung und Abnahme der Herzfrequenz vermittelt wird (Faden et al., 1982; Feuerstein et al., 1984; Hassen et al., 1984; Hassen, 1985). So ließe sich einerseits ein möglicher Zusammenhang im Sinne einer kompensatorischen Up-Regulation der KOR bei essentieller Hypertonie herstellen; andererseits könnte die erhöhte Expression der KOR jedoch auch als Folge einer niedrigeren Dynorphin-Konzentration bei SHR mit essentieller Hypertonie auftreten. Insgesamt scheint der KOR nach der vorliegenden sowie weiteren Studien nicht direkt an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie beteiligt zu sein, allenfalls indirekt durch erhöhte Expression bei möglicherweise ursächlicher Dynorphin-Erniedrigung. Erklärbar wäre auch, dass durch Up-Regulation von KOR eine - zumindest teilweise - Kompensationsmöglichkeit bei essentieller Hypertonie zur Verfügung steht.

Hinsichtlich der KOR-3-Expression konnten wir in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen SHR und WKY-Ratten zeigen. In der Literatur lassen sich bisher keine Studien finden, in denen speziell der KOR-3 im ZNS von SHR und WKY-Ratten untersucht wurde. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich nicht auf eine Beteiligung an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie schließen.

4.2 Auswirkungen der chronischen antihypertensiven Behandlung auf die Expression zentraler Opioid-Rezeptoren

Wie erwartet, fand sich nach der 4-wöchigen antihypertensiven Therapie in allen Behandlungsgruppen eine signifikante Blutdrucksenkung im Gegensatz zur Vehikelgruppe.

Im Hypothalamus der SHR zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression von DOR-1 unabhängig von dem eingesetzten antihypertensiven Wirkstoff. Auch im Cerebrocortex zeigte sich nach erfolgter antihypertensiver Therapie mit den β -Blockern Propranolol und Bisoprolol ein signifikanter Anstieg der DOR-1-Konzentration.

Der unselektive β -Rezeptorenblocker Propranolol zeigte in einem Experiment von Neil-Dwyer et al., 1981, aufgrund seiner Lipophilie und damit guter Penetration der Blut-Hirn-Schranke eine hohe Konzentration im Hirngewebe. Gegenüber dem unselektiven β -Blocker Propranolol zeigt Bisoprolol nur eine geringe Penetration der Blut-Hirn-Schranke (Bühning et al., 1986).

Für die Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Systems, Enalapril und Candesartan, gibt es Hinweise, dass sie die Blut-Hirn-Schranke durchdringen und somit auch zentrale Wirkungen verursachen können (Fanciullacci et al., 1993; Gohlke et al., 2002). Auch eine Interaktion von Angiotensin II mit dem zentralen Opioidsystem wurde bereits 1996 von Takai et al. diskutiert, da einige ACE-Hemmer eine antinozizeptive Wirkung zeigten, welche sich durch Naloxon aufheben ließ. Möglich wäre hier also ein Antagonismus zum endogenen Opioidsystem im ZNS.

Das Antihypertensivum Dihydralazin entfaltet seine Hauptwirkung peripher an der glatten Muskulatur der Arteriolen und führt zur Vasodilatation. Neben dieser peripheren Wirkung gibt es weiterhin Hinweise auf eine zentrale Wirkung des Dihydralazins. Schmitt et al. konnten 1993 einen Anstieg der Tyrosinhydroxylase im Hirnstamm der Ratte nach s.c.-Gabe von Dihydralazin nachweisen. Beteiligt hieran sind vermutlich Barorezeptoren im Bereich des Hirnstammes. Eine direkte Interaktion mit metenkephalinergen Neuronen sowie Metenkephalin-Rezeptoren in an der Blutdruckregulation beteiligten Hirnnervenkernen der Ratte ließ sich für Hydralazin von Nakamura et al., 1985, zeigen. Eine alleinige periphere Wirkung des Vasodilatators erscheint unsicher. Für eine zusätzliche zentrale Wirkung des Hydralazins sprechen auch unsere Ergebnisse, welche eine signifikante Erhöhung der KOR-1-Expression im Hypothalamus der SHR nach antihypertensiver Therapie mit Hydralazin zeigen.

Alle eingesetzten Antihypertensiva scheinen – wenn auch im Falle des β_1 -selektiven Bisoprolols nur in geringem Ausmaß – die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen und könnten somit auch direkt mit zentralen Opioid-Rezeptoren interagieren.

Über DOR-1 wird eine Vasokonstriktion vermittelt, die als Folge zum Blutdruckanstieg führt. Wir vermuten, dass der Anstieg der DOR-1 im Hypothalamus der SHR nach antihypertensiver Behandlung als Folge der niedrigeren Blutdruckwerte zu sehen ist; die bei den SHR auffällige Down-Regulation der DOR wird aufgehoben. Da im Hypothalamusgewebe in allen Behandlungsgruppen die DOR-1-Konzentration anstieg - bei den ZNS-gängigen Antihypertensiva wie bei den eher „peripher“ wirksamen - erscheint eine direkte Interaktion mit zentralen DOR-1 unwahrscheinlich. Vielmehr handelt es sich wohl um einen indirekten Effekt durch die ausgelöste Blutdrucksenkung.

Die KOR-1-Expression im Hypothalamus der SHR zeigte sich signifikant erhöht nach chronischer Behandlung mit dem ACE-Inhibitor Enalapril und dem AT_1 -Blocker Candesartan sowie dem Vasodilatator Dihydralazin. Die Gabe der β -Rezeptorenblocker Propranolol und Bisoprolol hingegen führte zu keiner nachweisbaren Veränderung der KOR-1-Expression. Über den κ -Opioid-Rezeptor wird eine Vasodilatation mit resultierender Senkung des Blutdrucks vermittelt, ebenso wie die Abnahme der Herzfrequenz. Eine gesteigerte Expression der κ -Rezeptoren im Hypothalamus fiel bereits, wie oben beschrieben, bei SHR im Stadium der etablierten Hypertonie auf. Die mögliche

kompensatorische Up-Regulation wurde bereits diskutiert. Unter antihypertensiver Therapie hätte man folglich eine Down-Regulation der κ -Rezeptoren erwartet. Hier sind die Ergebnisse widersprüchlich. Eine direkte Interaktion mit dem Opioidsystem durch die Inhibitoren des RAS und Dihydralazin wäre denkbar, zumal unter diesen Substanzen auch eine stärkere Blutdrucksenkung erreicht wurde.

Die Bestimmung der KOR-3-Expression im Hypothalamus nach antihypertensiver Behandlung ergab in allen Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den bereits vorbeschriebenen Resultaten und scheint auf eine fehlende Beteiligung des KOR-3 an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie hinzuweisen.

5 Zusammenfassung

Die essentielle Hypertonie ist eine multifaktorielle Erkrankung, die neben begünstigenden äußeren Einflüssen, wie zum Beispiel Übergewicht oder kochsalzreiche Ernährung, auch endogene Ursachen zu haben scheint. Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung des endogenen Opioidsystems im ZNS an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie.

Die vorliegende Arbeit untersuchte am Tiermodell der spontan hypertensiven Ratte die Expression vier verschiedener Opioid-Rezeptoren (MOR-1, DOR-1, KOR-1 und KOR-3) in Hypothalamus, Striatum und Cortex mittels Western Blot-Analyse. Als Kontrolltiere dienten gleichaltrige normotensive Wistar Kyoto-Ratten. Weiterhin wurde die Expression zentraler Opioid-Rezeptoren nach 4-wöchiger antihypertensiver Therapie ebenfalls mittels Western Blot-Analyse untersucht. Eingesetzt wurden die Antihypertensiva Propranolol, Bisoprolol, Enalapril, Candesartan und Hydralazin.

Bei den SHR zeigte sich eine vermehrte Expression des MOR-1 sowohl in Hypothalamus als auch in Cortex und Striatum. Über diesen Opioid-Rezeptor erfolgt eine Aktivierung des Sympathikus mit konsekutiver Erhöhung des Blutdrucks. Somit scheint die erhöhte MOR-1-Expression in der prähypertensiven Phase zur Entstehung der essentiellen Hypertonie beizutragen.

Im Hypothalamus konnten wir zudem eine Erniedrigung der DOR-1-Expression feststellen. Da über δ -Opioid-Rezeptoren ein Blutdruckanstieg vermittelt wird, erfolgt möglicherweise bei essentieller Hypertonie eine kompensatorische Down-Regulation der δ -Rezeptoren im Hypothalamus.

Die KOR-1-Expression war im Hypothalamus sowie im Striatum der SHR erhöht. Aktivierung dieses Rezeptors bewirkt eine Blutdrucksenkung, somit wäre eine kompensatorische Up-Regulation der κ -Rezeptoren bei Hypertonie möglich.

Nach erfolgter, 4-wöchiger antihypertensiver Therapie konnte im Hypothalamus in allen Behandlungsgruppen und auch im Cortex nach Gabe der β -Blocker Propranolol und Bisoprolol eine Zunahme der DOR-1-Expression beobachtet werden. Unter Therapie scheint die kompensatorische Down-Regulation also rückläufig zu sein.

Die KOR-1-Expression nahm unter Therapie mit RAAS-Blockern und Hydralazin im Hypothalamus der SHR weiterhin zu. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine direkte Interaktion der Antihypertensiva mit dem KOR-1.

Für eine Beteiligung des KOR-3 an der Pathogenese der essentiellen Hypertonie ergaben sich keine Hinweise.

Zusammenfassend lässt sich eine mögliche Beteiligung der zentralen Opioid-Rezeptoren an der Entstehung der Hypertonie anhand der vorliegenden Daten vermuten. Durch veränderte Expressionsmuster nach antihypertensiver Behandlung wird diese Vermutung zusätzlich erhärtet. Hauptsächlich findet man die veränderten Expressionsmuster im Hypothalamus.

So ist in der prähypertensiven Phase insbesondere im Hypothalamus eine signifikante Erhöhung der basalen Expression des MOR-1 sowie des DOR-1 bei 3-4 Wochen alten SHR zu beobachten.

In der hypertensiven Phase ist im Hypothalamus der SHR (Alter 12-13 Wochen) die basale DOR-1-Expression erniedrigt sowie die basale KOR-1-Expression erhöht.

Nach antihypertensiver Therapie ist im Hypothalamus der SHR in allen Behandlungsgruppen (Bisoprolol, Propranolol, Enalapril, Candesartan, Hydralazin) ein signifikanter Anstieg der DOR-1-Expression zu beobachten. Zusätzlich findet man eine signifikante Erhöhung der Expression des KOR-1 im Hypothalamus der SHR nach antihypertensiver Therapie mit Enalapril, Candesartan und Hydralazin.

In Cortex und Striatum hingegen lassen sich nach antihypertensiver Therapie keine spezifischen Veränderungen der Opioid-Rezeptorexpression nachweisen.

6 Literaturverzeichnis

Adair JR, Manning JW: Hypothalamic modulation of baroreceptor afferent unit activity. *Am J Physiol.* 229, 1357-1364 (1975)

Akil H, Young E, Watson SJ, Coy DH: Opiate binding properties of naturally occurring N- and C-terminus modified beta-endorphins. *Peptides* 2, 289-292 (1981)

Akine A, Montanaro M, Allen AM: Hypothalamic paraventricular nucleus inhibition decreases renal sympathetic nerve activity in hypertensive and normotensive rats. *Auton Neurosci.* 108, 17-21 (2003)

Attali B, Gouardères C, Mazarguil H, Audigier Y, Cros J: Evidence for multiple "Kappa" binding sites by use of opioid peptides in the guinea-pig lumbo-sacral spinal cord. *Neuropeptides* 3, 53-64 (1982)

Bhargava HN, Das S: Selective proliferation of brain kappa opiate receptors in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 39, 2593-2600 (1986)

Bhargava HN, Gulati A: Kappa opioid receptor activity in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 245, 460-465 (1988)

Bhargava HN, Rahmani NH: Binding of 3H-D-Pen2-D-Pen5-enkephalin to brain regions and spinal cord membranes of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Pharmacology* 46, 1993: 75-81 (1993)

Boone JB Jr, McMillen D: Proenkephalin gene expression is altered in the brain of spontaneously hypertensive rats during the development of hypertension. *Mol Brain Res* 24, 320-326 (1994)

Bühning KU, Sailer H, Faro HP, Leopold G, Pabst J, Garbe A: Pharmacokinetics and metabolism of bisoprolol-14C in three animal species and in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 11, 21-28 (1986)

Buijs FN, Cazarez F, Basualdo MC, Scheer FA, Perusquia M, Centurion D, Buijs RM: The suprachiasmatic nucleus is part of a neural feedback circuit adapting blood pressure response. *Neuroscience* 266, 197-207 (2014)

Cadet P, Mantione KJ, Stefano GB: Molecular identification and functional expression of mu3, a novel alternatively spliced variant of the human mu opiate receptor gene. *J Immunol.*, 5118-5123 (2003)

Chen CZ, Shieh JP, Chung HH, Hung CH, Lin HJ, Cheng JT: Activation of peripheral opioid μ -receptors in blood vessel may lower blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology* 87, 257-64 (2011)

Corbett AD, Paterson SJ, Kosterlitz HW: Selectivity of ligands for opioid receptors. In: Herz A (Hrsg.): *Opioids I. Handbook Exp. Pharmacol*, 645-679, Springer, Berlin/Heidelberg (1993)

Dhawan BN, Cesselin F, Raghurir R, Reisine T, Bradley PB, Porthogese PS, Hamon M: Classification of opioid receptors. In: *International Union of Pharmacology. XII. Pharmacological Reviews* 48 (4), 567-592 (1996)

Dumont M, Lemaire S: Increased content of immunoreactive Leu-enkephalin and alteration of delta-opioid receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett* 94, 114-118 (1988)

Faden AI, Feuerstein G: Hypothalamic regulation of the cardiovascular and respiratory system: role of specific opiate receptors. *Br Journal Pharmacol* 79, 997-1002 (1982)

Fanciullacci M, Alessandri M, Nicolodi M, Michelacci S, Sicuteri F: Possible long-lasting inhibition of converting enzyme by enalapril in human cerebrospinal fluid. *Clin Sci (Lond.)* 84, 313-317 (1993)

Farsang C, Kunos G: Naloxone reverses the antihypertensive effect of clonidine. *Br J Pharmacol* 67, 16-64 (1979)

Feuerstein G, Faden AI: Cardiovascular effects of dynorphin A-(1-8), dynorphin A-(1-13) and dynorphin A-(1-17) microinjected into the preoptic medialis nucleus of the rat. *Neuropeptides* 5, 295-298 (1984)

Feuerstein G, Molineaux CJ, Rosenberger JG, Faden AI, Cox BM: Dynorphins and Leu-enkephalin in brain nuclei and pituitary of WKY and SHR rats. *Peptides* 4, 225-229 (1983)

Feuerstein G, Zerbe RL, Faden AI: Opiate receptors and cardiovascular control in conscious SHR and WKY rats. *Hypertension* 5, 663-671 (1983)

Gaida W, Lang RE, Kraft K, Unger T, Ganten D: Altered neuropeptide concentrations in spontaneously hypertensive rats: cause or consequence? *Clin Sci (Lond)* 68, 35-43 (1985)

Gohlke P, Kox T, Jürgensen T, von Kügelgen S, Rascher W, Unger T, Culman J: Peripherally applied candesartan inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 36, 477-483 (2002)

Gulati A, Bhargava HN: Characteristics of central binding sites for [3H] DAMGO in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 47, 159-166 (1990)

Hassen AH, Feuerstein G, Faden AI: Kappa opioid receptors modulate cardiorespiratory function in hindbrain nuclei of rat. *K Neurosci* 4, 2213-2221 (1984)

Hassen, AH: Dorsal motor nucleus of the vagus: selective mu- and kappa-opioid receptor mediated cardiovascular responses. *Proceedings of the 15th annual meeting of the Society for Neuroscience*, 191 (1985)

Hoegler DB, Sole MJ, Liew CC: Rat brain regional preproenkephalin A messenger RNA levels are altered in genetic hypertension. *Am J Hypertension* 2, 524-548 (1989)

Jiang Q, Takemori AE, Sultana M, Portoghese PS, Bowen WD, Mosberg HI, Porreca F: Differential antagonism of opioid delta antinociception by [D-Ala²,Leu⁵,Cys⁶]enkephalin and naltrindole 5'-isothiocyante: evidence for delta receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 257, 1069-1075 (1991)

Jin CB, Rockhold RW: Sympathoadrenal control by paraventricular hypothalamic beta-endorphin in hypertension. *Hypertension* 18, 503-515 (1991)

Khachaturian H, Lewis ME, Schafer MKH, Watson SJ: Anatomy of the CNS opioid systems. *Trends in Neurosciences* 8, 111-119 (1985)

Kosterlitz HW, Paterson SJ: Types of opioid receptors: relation to antinociception. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 308, 291-297 (1985)

Koyama S, Manugian V, Ammons WS, Santiesteban HL: Effect of naloxone on baroreflex, sympathetic tone and blood pressure in the cat. *Eur J Pharmacol* 90, 367-376 (1983)

Kunos G, Farsang C, Ramirez-Gonzalez MD: Beta-endorphin: possible involvement in the antihypertensive effect of central alpha-receptor activation. *Science* 211, 82-84 (1981)

Laemmli, UK.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)

Li SC, Wong SC, Hong JS, Ingenito AJ: Age-related changes in opioid peptide concentrations in brain and pituitary of spontaneously hypertensive rats. Effect of antihypertensive drugs and comparison with deoxycorticosterone acetate and salt hypertension. *Pharmacology* 44, 245-56 (1992)

Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW: Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267, 495-499 (1977)

Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275 (1951)

Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ: Autoradiographic differentiation of mu, delta and kappa opioid receptors in the rat forebrain and hindbrain. *J Neurosci* 7, 2445-2464 (1987)

Martin, WR: History and development of mixed opioid agonists, partial agonists and antagonists. *Br J Clin Pharmacol Suppl.* 3, 273-279 (1979)

Martucci CP, Hahn EF: Brain opiate receptor concentrations are increased in adult spontaneously hypertensive rats. *Endocr Res Commun* 6, 291-297 (1979)

Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisaud C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meurier JL: ORL 1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.* 341, 33-38 (1994)

Nakamura K, Hayashi T, Nakajima T: Effects of clonidine, alpha-methyldopa and hydralazine on met-enkephalinergic neurons in cerebral nuclei of spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol*, 49-63 (1985)

Naranjo JR, Fernandez-Roman M, Urdin MC, Fuentes JA: Beta-endorphin: a common factor in the antihypertensive action of clonidine type imidazolines in spontaneously hypertensive rats. *Gen Pharmacol* 16, 287-290 (1985)

Neil-Dwyer G, Bartlett J, McAinsh J, Cruickshank JM: Beta-adrenoceptor blockers and the blood-brain barrier. *Br J Clin Pharmacol* 11, 549-553 (1981)

Okamoto K, Aoki K: Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27, 282-293 (1963)

Pasternak, GW: Multiple mu opiate receptors: Biochemical and pharmacological evidence for multiplicity. *Biochem Pharmacol* 35, 361-364 (1986)

Pettibone DJ, Mueller GP. Alpha-adrenergic stimulation by clonidine increases plasma concentration of immunoreactive beta-endorphin in rats. *Endocrinology* 109, 798-802 (1981)

Pfeiffer A, Feuerstein G, Kopin IJ, Faden AI: Cardiovascular and respiratory effects of mu, delta and kappa-opiate agonists microinjected into the anterior hypothalamic brain area of awake rats. *J Pharmacol Exp Ther* 225, 735-741 (1983)

Pfeiffer A, Feuerstein G, Zerbe RL, Faden AI, Kopin IJ: Mu-receptors mediate opioid cardiovascular effects at anterior hypothalamic pathways. *Endocrinology* 113, 929-938 (1983)

Polastron J, Mur M, Mazarguil H, Puget A, Meunier JC, Jauzac P: SK-N-BE: a human neuroblastoma cell line containing two subtypes of delta-opioid receptors. *J Neurochem* 62, 898-906 (1994)

Raasch W, Bartels T, Schwartz C, Häuser W, Rütten H, Dominiak P: Regression of ventricular and vascular hypertrophy: are there differences between structurally different angiotensin-converting enzyme inhibitors? *J Hypertens* 20, 2495-2504 (2002)

Ramirez-Gonzalez MD, Tchakarov L, Garcia RM: Beta-endorphin acting on the brainstem is involved in the antihypertensive action of clonidine and α -methyldopa in rats. *Circ Res* 53, 150-157 (1983)

Rockhold RW, Crofton JT, Share L: Increased pressor responsiveness to enkephalin in spontaneously hypertensive rats: the role of vasopressin. *Clin Sci* 59, 235-237 (1980)

Schaz K, Stock G, Simon W: Enkephalin effects on blood pressure, heart rate, and baroreceptor reflex. *Hypertension* 2, 395-407 (1980)

Schmitt P, Pequignot J, Hanchin F, Pujol JF, Pequignot JM: Regional specificity of long-term regulation of tyrosine hydroxylase in some catecholaminergic rat brainstem areas. II. Effect of a chronic dihydralazine treatment. *Brain Res* 611, 61-66 (1993)

Takai S, Song K, Tanaka T, Okunishi H, Miyazaki M: Antinociceptive effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and an angiotensin II receptor antagonist in mice. *Life Sci.* 59, 331-336 (1996)

Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350-4354 (1979)

Wright RC, Ingenito AJ: Prevention of isolation-induced hypertension by intrahippocampal administration of a nonpeptide kappa-opioid receptor agonist. *Hippocampus* 11, 445-451 (2001)

Wolozin BL, Pasternak GW: Classification of multiple morphine and enkephalin binding sites in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 6181-6185 (1981)

Xie CW, Tang J, Han JS: Clonidine stimulated release of dynorphin in the spinal cord of the rat: a possible mechanism for its depressor effects. *Neurosci Lett* 65, 224-228 (1986)

Yin X, Zhu YH, Xu SF: Distributions of mu and delta opioid receptors in central nervous system of SHR rats and normotensive WKY rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 17, 28-31 1996.

Yukimura T, Unger T, Rascher W, Lang RE, Ganten D: Central peptiergic stimulation in blood pressure control: role of enkephalins in rats. *Clin Sci* 61, 347-350 (1981)

Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ: A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386, 499-502 (1997)

Zamir N, Maixner W: The relationship between cardiovascular and pain regulatory systems. *Ann NY Acad Sci* 467, 371-384 (1986)

Zamir N, Segal M, Simantov R: Opiate receptor binding in the brain of the hypertensive rat. *Brain Res* 231, 217-222 (1980)

Zicha J, Kunes J: Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev* 79, 1227-1282 (1999)

7 Anhänge

7.1 Alphabetische Auflistung der verwendeten Puffer

Blockpuffer 5 %:

5g Milchpulver ad 100 mL Waschpuffer

Elektrophorese-Puffer:

25 mM Tris-HCl

0,5 mM Glycin

SDS (0,1 %), ad 5 L Aqua dest.

Homogenisationspuffer (Western Blot):

50 mM Tris-HCl, pH 7,4

0,1 mM EDTA

150 mM NaCl

Triton-X (1 %)

0,1 μ M Aprotinin

β -Mercaptoethanol (0,1 %)

0,1 mM PMSF, ad 100 mL Aqua dest.

Sammelgelpuffer:

0,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 mit HCl einstellen, ad 50 mL Aqua dest.

SDS-PAGE-Puffer:

100 mM Tris-HCl, pH 6,8

SDS (4 %)

Glycerin (20 %)

200 mM DTT

Bromphenolblau (0,2 %), ad 10 mL Aqua dest.

Trenngelpuffer (1,5 M, pH 8,8):

36,3 g Tris-HCl, ad 150 mL Aqua dest., pH 8,8 mit HCl einstellen, ad 200 mL Aqua dest.

Towbin Blot Puffer:

50 mM Tris-HCl

0,2 M Glycin

SDS (0,037 %), ad 0,8 L Aqua dest., pH 8,2-8,4

MeOH (20 %)

PBS-Waschpuffer:

Na₂HPO₄ 57,5 g

Na H₂PO₄ 14,8 g

NaCl 29,2 g

Tween 20 5,0 mL

ad 5 L Aqua dest., mit NaOH pH 7,5 einstellen

7.2 Gel

Tab.10: Angaben zur Herstellung eines 7,5%igen SDS-Gels

	Sammelgel (mL)	Trenngel (mL)
Aqua dest.	3,05	4,85
Tris-Puffer, 1,5 M, pH 8,8	---	2,5
Tris-Puffer, 0,5 M, pH 6,8	1,25	---
SDS (Sodium-Dodecylsulfat)	50	100
Acrylamid	0,67	2,5
APS (Ammoniumpersulfat)	25	50
TEMED (Tetramethylethylendiamid)	10	5

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Dominiak für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der Materialien.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Fatimunnisa Qadri für die Konzipierung des Themas und Betreuung des experimentellen Teils der Arbeit sowie die geduldige Unterstützung bei der schriftlichen Ausarbeitung.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Olaf Jöhren für die wertvollen Hilfestellungen zur Korrektur der Arbeit.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Sabine Lipinski und Frau Dr. Nina Jungclas für die Einarbeitung in die Western Blot-Technik sowie die arterielle Blutdruckmessung bei den Versuchstieren und für die Unterstützung bei methodischen Fragen und Problemen.

Mein Dank gilt auch Frau Cornelia Magnussen, Frau Gudrun Vierke und Herrn Klaus Tempel, die mir bei Fragen zur praktischen Durchführung der Laborarbeiten eine große Hilfe waren.

Ein herzliches Dankeschön gebührt außerdem meiner Schwägerin Britta Mai für das gewissenhafte Korrekturlesen der Arbeit.

Schließlich danke ich ganz herzlich meinen Eltern, die mir Studium und Dissertation erst ermöglicht haben und stets mit Interesse und Geduld begleitet haben, und meinem Ehemann Dr. Thomas Mai für die konstruktiven Anmerkungen und die Aufmunterungen während der Erstellung der Dissertation.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Stefanie Mai geb. Christe
Geburtsdatum: 20.10.1981



Ausbildung:

07/2001 Abitur am Alexander-von-Humboldt-Gymnasium Lauterbach
10/2001-09/2003 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
09/2003 Ärztliche Vorprüfung
10/2003-12/2007 Klinischer Studienabschnitt, Universität zu Lübeck
12/2007 2. Ärztliche Prüfung/Approbation

Praktisches Jahr:

08/2006-12/2006 Pädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
12/2006-04/2007 Innere Medizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
04/2006-08/2007 Chirurgie, Sana Kliniken Ostholstein, Eutin

Beruf:

02/2008-04/2008: Eichhof-Krankenhaus Lauterbach, Chirurgische Abteilung
04/2008-03/2009 Klinikum Bad Hersfeld, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
04/2009-5/2013 Klinikum Fulda, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
10/2009-07/2010 Elternzeit
09/2011-09/2012 Elternzeit
seit 06/2013 Eichhof-Krankenhaus Lauterbach, Psychiatrische Abteilung

Dissertation:

2004-2007 experimenteller Teil am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Lübeck

Veröffentlichung:

04/2006

Christe S., Qadri F., Wasilewski N., Dominiak P.
“Effekt von Antihypertensiva-Behandlung auf die Expression von
Opioidrezeptoren im Hypothalamus spontan hypertensiver Ratten“
(Poster auf der 47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für
Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie,
Mainz 2006)