Aus der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Adaptive Veränderungen des kardialen Opioidsystems der Ratte im Verlauf einer Herzinsuffizienz induziert durch eine infrarenale, aortokavale Fistel

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Lukas Dehe

aus Köln

Datum der Promotion: 05.06.2016

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	5
2. Einleitung	7
2.1 Opioidrezeptoren und ihre Liganden	7
2.2 Das kardiale Opioidsystem	9
2.2 Die Herzinsuffizienz	
3. Fragestellung	13
4. Material und Methoden	14
4.1 Material	
4.1.1 Chemikalien	
4.1.2 Geräte	17
4.1.3 Verbrauchsmaterialien	
4.1.4 Antikörper	
4.2 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien	
4.2.1 Aufbereitung des Gewebes	
4.2.2 Bestimmung der Proteinmenge	
4.2.3 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien	
4.3 Quantitative Analyse der Radioligand-Bindungsstudien	
4.3.1 Grundlagen der Radioligand-Bindungsstudien	
4.3.2 Bestimmung der maximalen Bindungskapazität und der	
Gleichgewichtsdissoziationskonstanten	
4.4 Modell "Infrarenale, aortokavale Fistel (ACF)"	
4.4.1 Tiere	
4.4.2 Experimentelles Modell	
4.4.3 Operationstechnik der ACF-Induktion	
4.4.4 Hämodynamische Vermessung	
4.5 Immunhistochemie	
4.5.1 Aufbereitung des Gewebes	
4.5.2 Immunfluoreszenz-Färbung	
4.6 Western Blot	
4.6.1 Aufbereitung des Gewebes	
4.6.2 Bestimmung der Proteinmenge	
4.6.3 Vorbereitung der Gelelektrophorese	
4.6.4 Auftrennung der Proteine und Blotting	

4.6.5 Färbungen	
4.6.6 Blocken	
4.6.7 Detektion	
4.7 Statistik	
5. Ergebnisse	39
5.1 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien	
5.1.1 Nachweis von Opioidrezeptoren im Gehirn	
5.1.2 Nachweis von Opioidrezeptoren im Herzen	
5.2 Ergebnisse ACF-Modell	45
5.2.1 Morphometrie	
5.2.2 Hämodynamische Vermessung	
5.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbung	
5.3.1 Kolokalisation von OR und Ca $_v$ 1.2	
5.3.2 Immunhistochemische Anfärbung OR und RyR	51
5.3.3 Densitometrische Auswertung der OR-spezifischen Immunfluoreszenz	
5.4 Ergebnisse Western Blot	56
5.4.1 DOR	
5.4.2 PENK	57
5.4.3 KOR	58
5.4.4 PDYN	
6. Diskussion	60
7. Literaturverzeichnis	68
8. Abbildungsverzeichnis	80
9. Tabellenverzeichnis	82
10. Eidesstattliche Versicherung	83
11. Lebenslauf	84
12. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen	86
13. Danksagung	88

1. Zusammenfassung

Adaptive Veränderungen des kardialen Opioidsystems im Verlauf einer chronischen kongestiven Herzinsuffizienz wurden bisher nur marginal erforscht. In dieser Arbeit sollte daher zunächst die exakte Lokalisation der Opioidrezeptoren δ (DOR) und κ (KOR) im Myokard gesunder und herzinsuffizienter Ratten untersucht werden. Im linken Ventrikel gesunder Ratten konnten Opioidrezeptor-spezifische Membran-Bindungsstellen aller drei Opioidrezeptoren mittels Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien nachgewiesen werden. Im nächsten Schritt wurden DOR und KOR auf Kardiomyozyten des LV immunhistochemisch dargestellt. Es zeigte sich eine Kolokalisation der ORs mit dem plasmamembranständigen Dihydropyridin-Rezeptor (Ca_v1.2) und dem intrazellulären sarkoplasmatischen Ryanodin-Rezeptor. Eine Erweiterung dieser Arbeit stellte die Untersuchung adaptiver Veränderungen des kardialen Opioidsystems im Verlauf einer chronischen kongestiven Herzinsuffizienz dar. Dazu wurde mittels einer infrarenalen, aortokavalen Fistel (ACF) eine biventrikuläre Volumenüberladung induziert. 28 \pm 2 Tage nach der ACF-Induktion zeigten die Tiere eindeutige morphometrische und hämodynamische Charakteristika einer CHF. Anschließend wurden die linken Ventrikel der insuffizienten Herzen erneut immunhistochemisch auf Veränderungen der Opioidrezeptor-Expression untersucht. Dabei konnte eine signifikante relative Zunahme der optisch integrierten Dichte der DOR- und KOR-spezifischen Immunfluoreszenz festgestellt werden. Um eine Modulation des kardialen Opioidsystems im Verlauf einer CHF zu bestätigen, wurden Western Blot Untersuchungen durchgeführt. Darin stellte sich eine Hochregulation der DOR und KOR auf Proteinebene heraus. Außerdem kam es zu einer vermehrten Expression der endogenen Opioidvorläuferpeptide Proenkephalin und Prodynorphin auf Proteinebene. Diese Ergebnisse lassen einen Einfluss des kardialen Delta- und Kappa-Opioidsystems auf pathophysiologische Vorgänge im Rahmen der Progression einer CHF vermuten.

Abstract

Knowledge about changes in the cardiac opioid system in congestive heart failure (CHF) is scarce. As such, this project investigated the cellular localization of the opioid receptors δ (DOR) and κ (KOR) in left ventricular (LV) myocardium. Opioid receptor (OR) binding sites were detected by radioligand binding. In addition, DOR and KOR localization was determined by double immunofluorescence confocal analysis in the left ventricle of male Wistar rats. DOR and KOR were colocalized with L-type Ca2+ channels (Cav 1.2) as well as with intracellular ryanodine receptors (RyR) of the sarcoplasmic reticulum. In each rat an infrarenal aortocaval fistula (ACF) was created, and 28 ± 2 days afterwards the extent of CHF was examined by hemodynamic and morphometric measurements. Adaptive changes in DOR and KOR and its endogenous ligands, the precursor peptides proenkephalin (PENK) and prodynorphin (PDYN) during CHF were examined via RT-PCR and Western blot. Following the ACF severe congestive heart failure developed in all rats and was accompanied by up-regulation of DOR/ KOR and PENK/PDYN on mRNA as well as receptor proteins representing consecutive adaptations. These findings may suggest that the cardiac opioid system possesses the ability to play a regulatory role in the pathophysiological development of heart failure.

2. Einleitung

2.1 Opioidrezeptoren und ihre Liganden

Die Behandlung mit Opium als Schmerz- und Schlafmittel reicht bis in vorchristliche Zeiten zurück (1). Dazu wurde bereits im Altertum mit der Gewinnung von Opium, dem getrockneten Saft des Schlafmohns (Papaver somniferum), begonnen. Das Wort Opium leitet sich von dem griechischen Wort für Mohnsaft "opion" ab. Besonders die Isolierung des Morphins aus dem Schlafmohn durch den Apotheker Sertürner im Jahr 1804 brachte den Durchbruch der Opiate zur Nutzung in der modernen Medizin (2). Heutzutage spielen die Opioide aufgrund Ihrer analgetischen (= schmerzlindernden) Wirkung eine wichtige Rolle in der Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin und der Schmerztherapie (3,4). Unter Opioiden versteht man halb- oder vollsynthetisch hergestellte Liganden von Opioid-Rezeptoren (OR). Als eines der ältesten biologischen Informationsübertragungssysteme existieren ORs und ihre endogenen Liganden in Amphibien und Wirbeltieren bereits seit mehr als 400-500 Millionen Jahren (5).

Bisher konnten 3 OR-Haupttypen durch Klonierungsexperimente in ihrer Aminosäuresequenz eindeutig identifiziert werden (6-12). Sie werden unterteilt in μ - (MOR), κ -(KOR) und δ - (DOR) Rezeptoren. Diese Rezeptoren zeigen eine 57-62-prozentige Homologie ihrer Aminosäuresequenzen (13). Unterschiede ergeben sich vor allem in den extrazellulären Domänen. Darüber hinaus konnte in der Vergangenheit ein vierter OR identifiziert werden. Dieser sogenannte OLR1 (engl. opiate-like receptor) ist zu 48-49% mit den anderen ORs identisch (14,15). Allerdings zeigte sich nur eine geringe Affinität der endogenen Opioidpeptide zu diesem Rezeptor (16). Die Gene, die für ORs kodieren, liegen im Menschen auf verschiedenen Chromosomen: MOR auf Chromosom 6, KOR auf Chromosom 8, DOR auf Chromosom 1 und ORL1 auf Chromosom 20 (17-20).

ORs sind membrangebundene G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (G_i oder G₀) mit sieben transmembranären helikalen Domänen (21). Sie bestehen aus einer mehrere hundert Aminosäuren enthaltenden Kette, mit einem extrazellulären Amino-Terminus und einem intrazellulären Carboxy-Terminus. Die Bindung eines Liganden in der Bindungstasche des OR führt zu einer Konformationsänderung der dreidimensionalen Struktur. Die Konformationsänderung bewirkt die Aktivierung eines intrazellulären heterotrimeren G-Proteins, bestehend aus drei Untereinheiten (α , β , γ) (22). Heterotrimere G-Proteine können GDP oder GTP an der α -Untereinheit binden. Durch die Aktivierung des OR kommt es zu einem Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins. Dies führt zu einer Instabilität des G-Protein-Komplexes, wodurch sich die α -Untereinheit mit dem GTP von der $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins und beide Untereinheiten vom Rezeptor abspalten. Sowohl die α -Untereinheit, als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit dienen als intrazelluläre Botenstoffe. Die Aktivierung eines OR bewirkt unter anderem eine intrazelluläre Inhibition der Adenylatzyklase mit konsekutiver Reduzierung des intrazellulären Botenstoffs cAMP. Dadurch kann es zu einer Verminderung der Ca²⁺-Freisetzung und zur Steigerung des K⁺-Ausstroms kommen. Dies resultiert im Nervensystem unter anderem in einer verminderten neuronalen Erregbarkeit und einer reduzierten Neurotransmittersekretion (23).

ORs befinden sich vor allem entlang der schmerzverarbeitenden Bahnen im Gehirn und Rückenmark (24). Die Aktivierung von ORs bewirkt eine supraspinale und spinale Analgesie. In der Medizin sind eine Vielzahl weiterer Wirkungen bekannt: Atemdepression, Euphorie/Dysphorie, Obstipation, aber auch Hyperalgesie (25). Neben ihrer alltäglichen medizinischen Verwendung, zeigen jüngere Studien zahlreiche weitere Effekte von Opioiden. Zum Bespiel schützen sie den Organismus vor Stress, Tumorwachstum oder Entzündungsvorgängen (26). Neben ihrem zentralnervösen Vorkommen konnte die Existenz von ORs auch im peripheren Nervensystem demonstriert werden (27,28). Neuerdings hat sich gezeigt, dass ORs nicht nur im zentralen und peripheren Nervensystem, sondern auch von verschiedenen weiteren Geweben exprimiert werden. Sie konnten unter anderem lokal im Herzen (29), der Lunge (30) und dem Darm (31) nach-gewiesen werden.

Opioidpeptide sind die endogenen Liganden der ORs. Diese körpereigenen Peptide wurden in den 70er und 80er Jahren des letzten Jahrhunderts aus dem Gehirn und der Hypophyse von Schweinen isoliert (32). Die einzelnen Opioidpeptide stammen als Spaltprodukte von Vorläuferpeptiden ab. Wie bei den ORs gibt es drei verschiedene Haupttypen von Opioidpeptiden, die gewisse Bindungspräferenzen zeigen und aus den Vorläuferpeptiden POMC (Proopiomelanocortin), PENK (Proenkephalin) bzw. PDYN (Prodynorphin) abgespalten werden (33).

8

Das vor allem an MOR bindende Endorphin leitet sich von POMC ab. Das entsprechende Gen liegt auf Chromosom 2 (34). Enkephalin leitet sich von PENK und PDYN ab und bindet an MOR und DOR. Aus Prodynorphin entsteht Dynorphin, welches bevorzugt an KOR bindet. Die Gene für PENK und PDYN liegen auf den Chromosomen 8 und 20 (35). Des Weiteren gibt es ein Opioidpeptid mit einer Bindungspräferenz zu ORL1. Dieses sogenannte Nociceptin leitet sich von Pronociceptin ab, dessen Gen auf Chromosom 8 liegt (36,37). Die Aminosäuresequenzen der endogenen Opioidpeptide sind am N-Terminus identisch: Tyrosin-Glycin-Glycin-Phenylalanin-. In diesen Aminosäuren liegt wahrscheinlich die biologische Wirksamkeit begründet. Die darauffolgenden Aminosäuren bestimmen die OR-Präferenz (38-41).

2.2 Das kardiale Opioidsystem

Bei der Untersuchung des lokalen Opioidsystems des Herzens wurden zunächst ORs in kardialen Nervenendigungen (42) von Hunden und in intraatrialen Ganglien (43) von Ratten identifiziert. Außerdem konnte eine Modulation vagaler Reize auf den Sinusknoten durch die Aktivierung kardialer ORs in Kaninchen und Hunden gezeigt werden (44,45).

Verschiedene Studien konnten darüber hinaus zeigen, dass die Opioidrezeptoren KOR und DOR neben ihrer neuronalen Lokalisation auch im ventrikulären Myokard verschiedener Säugetiere vorkommen (46). Die Expression von MOR wurde hingegen kontrovers diskutiert. Anfänglich wurde zwar die Bildung von MOR im neonatalen Herzen von Ratten angenommen (47), durchgeführte Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien und PCR-Untersuchungen deuten allerdings darauf hin, dass MOR im ventrikulären Myokard nicht exprimiert wird (48,49). Die PET-Darstellung von ORs in menschlichen Ventrikeln unterstützt die bisher angenommene Expression von ORs im Herzen (50).

Kardiomyozyten sind neben der OR-Expression für ihre endogene Opioidpeptidsynthese bekannt. Sie produzieren hohe Mengen der Peptidvorstufen Proenkephalin, Prodynorphin und Proopiomelanocortin (51,52). Ventrikuläre Kardiomyozyten scheinen sogar die höchste intrazelluläre Menge von Präproenkephalin-mRNA im gesamten Körper der Ratte zu bilden, allerdings wird nur ein geringer Anteil zum Peptid umgesetzt (53).

9

Die myokardiale Synthese und Expression von ORs und Opioidpeptiden scheint interessanterweise im Verlauf verschiedener Herzerkrankungen variabel zu sein⁴⁶. Im Verlauf ischämischer Prozesse kam es zum Beispiel zu einer erhöhten Expression von DOR und KOR mRNA in Schweinen (54). Zudem zeigte sich eine Assoziation zwischen den Plasmaspiegeln der Opioidpeptide und einer Ischämie oder Hypoxie (55) im Kaninchen-Tiermodell an. Beim Menschen konnte ein ischämisch induzierter Anstieg von ß-Endorphin im Verlauf einer Koronarangioplastie (56) festgestellt werden. Ebenso stiegen Dynorphin- und Enkephalin-Gewebespiegel im Kaninchenmyokard nach einer Ischämie an (57).

Das kardiale Opioidsystem scheint zudem eine kardioprotektive Rolle im Rahmen ischämischer Ereignisse inne zu haben (58). Dabei zeigte die Aktivierung von DOR, KOR und MOR über verschiedene Modelle und Spezies hinweg kardioprotektive Effekte im Sinne einer Prä- oder Postkonditionierung des Herzens. Unter Präkonditionierung versteht man dabei eine Resistenzentwicklung des Herzens gegenüber ischämischen Ereignissen. Die Resistenz des Myokards wird durch transiente ischämische Reize erreicht und führt bei einer fulminaten Ischämie zu einem verkleinerten Infarktareal (59,60). Bei einer kardioprotektiven Resistenzentwicklung durch kurze ischämische Reize nach einem bereits stattgehabten ischämischen Ereignis spricht man von Postkonditionierung (61). In diesem Zusammenhang scheint das kardiale Opioidsystem zum Beispiel Einfluss auf verschiedene Komplikationen nach ischämischen Ereignissen zu haben, wie Arrhythmien, kontraktile Dysfunktion, Entzündung und Apoptose (46). Gross et al. entdeckten beispielsweise einen Einfluss von Opioidrezeptoren auf die Präkonditionierung in Herzen von Hunden (62). In einer Studie von Peart et al., 2006 zeigte sich durch Aktivierung von DOR ein verringertes Infarktareal nach Okklusion des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie in Hunden (63). Auch die Aktivierung von KOR zeigte kardioprotektive Effekte in neonatalen Rattenmyozyten (64). Eine Studie von Wang et al ergab, dass sich sowohl die Infarktgröße, als auch Herzrhythmusstörungen durch die Aktivierung von KOR reduzieren ließen (65). Eine weitere Studie zeigte eine Reduktion der myokardialen Apoptose und des ischämischen Areals im Ischämie-Reperfusions-Experiment (I/R) in Ratten durch die Aktivierung von KOR (66). Außerdem ließen sich kardioprotektive Effekte durch die Antagonisierung von DOR in Ratten aufheben (67). Zatta et al. zeigten eine Erhöhung des kardialen Proenkephalin im Rahmen der ischämischen Postkonditionierung in Ratten (68).

2.2 Die Herzinsuffizienz

Unter einer Herzinsuffizienz (engl. heart failure; HF) versteht man eine abnormale kardiale Funktion oder Struktur, aufgrund derer das Herz nicht mehr in der Lage ist, den Sauerstoffbedarf der metabolisierenden Gewebe adäquat zu decken (69). In Industrieländern leiden circa ein bis zwei Prozent der Bevölkerung an einer Herzinsuffizienz (70). Die Prävalenz liegt bei ≥10% bei über 70-jährigen. Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom unterschiedlicher Ätiologie. Besonders häufig bilden die Volkskrankheiten Koronare Herzkrankheit, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus die Grundlage für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (71).

Die Einteilung erfolgt anhand verschiedener Kriterien. Nach der betroffenen Herzkammer kann eine Links-, Rechts- oder Globalherzinsuffizienz unterschieden werden. Des Weiteren erfolgt eine Einteilung nach der betroffenen Phase der Herzaktion. Daher können eine systolische, eine diastolische und eine kombinierte Herzinsuffizienz beschrieben werden. Nach dem Herz-Zeit-Volumen (HZV) kann in ein sogenanntes lowoutput- und ein high-output-failure unterteilt werden. Unter einem low-output-failure versteht man ein Vorwärtsversagen mit Verminderung des HZV (72). Das high-outputfailure beschreibt eine mangelhafte Versorgung der Peripherie trotz erhöhtem HZV, zum Beispiel bei einer arterio-venösen Fistel (73). Letztendlich enden alle Formen in einem low-output-failure.

Neben dem HZV wird die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) zur klinischen Beschreibung der kardialen systolischen Funktionseinschränkung herangezogen (74). Unter der LVEF versteht man den prozentuellen Anteil des enddiastolischen Volumens des linken Ventrikels (LV), der während einer Herzaktion als Schlagvolumen (SV) ausgeworfen wird. Aus klinischer Sicht werden Patienten mit einer LVEF \leq 35% (HF-REF = Heart failure with reduced ejection fraction) von solchen mit einer LVEF \geq 35 – 50% (HF-PEF = Heart failure with preserved ejection fraction) unterschieden (73,75). Als Normalbefund bezeichnet man eine LVEF \geq 50%.

Das klinische Syndrom der Herzinsuffizienz äußert sich in verschiedenen Symptomen. Durch das Vorwärtsversagen kommt es zur einer Verminderung des HZV mit inadäquatem Blutdruck, gesteigerter Ermüdbarkeit und Synkopen. Das Rückwärtsversagen bewirkt eine Stauung des venösen Blutes vor dem Herzen. Dies führt bei einer Stauung vor dem rechten Herzen zu Ödemen und zu einer Lungenstauung vor dem linken Herzen mit Entwicklung einer kongestiven Herzinsuffizienz (engl. congestive heart failure, CHF) (76).

Im Verlauf einer chronischen Herzinsuffizienz kommt es zur Aktivierung verschiedener Kompensationsmechanismen. Ein akuter Abfall des HZV kann kurzfristig mittels Frank-Starling-Mechanismus durch Erhöhung des enddiastolischen Füllungsdrucks behoben werden (77). Neben der kurzfristigen Erhöhung des HZV kommt es bei Fortbestehen der Herzinsuffizienz zu verschiedenen mittel-/langfristigen Anpassungsvorgängen. Einerseits kommt es zur vermehrten Aktivierung des sympathischen Nervensystems mit erhöhter Katecholaminausschüttung (78). Dies resultiert in einer Erhöhung des systemischen Widerstands (Nachlast) zur Sicherstellung eines ausreichenden Perfusionsdrucks (79). Zwar kommt es dadurch zu einer kurzfristigen Verbesserung der Symptome, ein dauerhaft erhöhter Noradrenalinspiegel korreliert aber mit einer Prognoseverschlechterung (80). Durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) kommt es zu einer vermehrten Natrium- und Wasserretention mit Blutdrucksteigerung sowie einer Erhöhung des systemischen Widerstands (81,82). Durch die Ausschüttung von Vasopressin (ADH) kommt es ebenfalls zur Wasserretention (82). Dies führt gemeinsam zur Erhöhung der Vorlast und der Nachlast.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Veränderungen kommt es zum sogenannten kardialen Remodeling (83). Dabei entstehen direkte zelluläre und molekulare Veränderungen des Myokards. Dadurch kann die Struktur und die Funktion des Herzmuskels beeinträchtigt werden. Außerdem kommt es im Rahmen einer chronischen Herzinsuffizienz zu einer myokardialen Anpassungsreaktion auf eine erhöhte Volumen- oder Druckbelastung (84). Das erhöhte zirkulierende Volumen führt zu einer exzentrischen Hypertrophie des Herzens (Hypertrophie + Dilatation). Die konzentrische Hypertrophie (Hypertrophie ohne Dilatation) entsteht als Antwort auf eine erhöhte Druckbelastung.

Diese zunächst sinnvollen Kompensationsmechanismen führen auf Dauer zu einer Verschlechterung der Herzinsuffizienz und der hämodynamischen Situation (85). Durch die Zunahme der kardialen Belastung und des kardialen Sauerstoffverbrauchs kommt es zu einer rezidivierenden, selbstverstärkenden Aktivierung der Kompensationsmechanismen ("circulus vitiosus") (86). Dies resultiert schlussendlich in einer Reduktion des Schlagvolumens im Sinne einer Dekompensation.

3. Fragestellung

OR-spezifische Membran-Bindungsstellen am Herzen wurden bisher kaum untersucht. Nur vereinzelte Beiträge über ORs und ihre Liganden am Herzen wurden veröffentlicht. Trotzdem ist der aktuelle Wissenstand über die exakte anatomische Lokalisation der Opioidrezeptoren am Herzen gering. In dieser Arbeit sollten daher Opioid-Bindungsstellen mittels Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien pharmakologisch charakterisiert und anschließend die exakte Lokalisation der ORs im Myokard der Ratte immunhistochemisch ermittelt werden.

Die genaue Bedeutung des Opioidsystems im Rahmen einer kongestiven Herzinsuffizienz ist ebenfalls bislang nur marginal erforscht. Deshalb sollten mögliche Veränderungen des kardialen Opioidsystems im Verlauf einer chronischen kongestiven Herzinsuffizienz induziert durch eine infrarenale, aortokavale Fistel mit einhergehender Volumenüberladung in der Ratte analysiert werden.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Acrylamid 40:1 Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany Sigma, Taufkirchen, Germany Agarose Albumin (Rinderserum) Sigma, Taufkirchen, Germany Ammoniumpersulfat (APS) Sigma, Taufkirchen, Germany Aprotinin Sigma Taufkirchen, Germany **Bromophenol Blau** Sigma, Taufkirchen, Germany DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol) Sigma, Taufkirchen, Germany Dextran 500 GE Healthcare, Freiburg, Germany Dithiothreitol (DTT) Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA ECL detection reagent GE Healthcare, Freiburg, Germany Essigsäure Carl Roth, Karlsruhe, Germany Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Sigma, Taufkirchen, Germany Fixier und Entwickler Lösung AGFA Fischer Solution Medical Imaging Glycerol Sigma, Taufkirchen, Germany Glycin Sigma, Taufkirchen, Germany Isopropanol Sigma, Taufkirchen, Germany Kaliumchlorid (KCI) Sigma, Taufkirchen, Germany Kaliumdihydrogenphosphat (KH2PO4) Sigma, Taufkirchen, Germany Meerrettichperoxidase (HRP) Sigma, Taufkirchen, Germany Mercaptoethanol Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany Metabisulfit Sigma, Taufkirchen, Germany Methanol Carl Roth, Karlsruhe, Germany Milchpuvler Carl Roth, Karlsruhe Deutschland Natriumchlorid (NaCl) Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany Natriumdodecylsulfat (SDS) Sigma, Taufkirchen, Germany Natriumphosphat (Na2HPO4) Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany Paraformaldehyd (PFA) Sigma, Taufkirchen, Germany Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland

Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pikrinsäure	Sigma, Taufkirchen, Germany
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen, Germany
Protein-Banden Marker	Thermo Scientific, Waltham, USA
RIPA Lysis Buffer	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Sucrose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Thiorphan	Sigma, Taufkirchen, Germany
Tissue-Tek compound	OCT, Miles, Elkhart, Indiana, USA
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma, Taufkirchen, Germany
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen, Germany
Trypan blue Stain (0.4%)	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Germany
Tween-20	Sigma, Taufkirchen, Germany
Wasserstoffperoxid (H2O2)	Sigma, Taufkirchen, Germany
Xylencyanol FF	Sigma, Taufkirchen, Germany

Puffer

PBS	NaCl 140 mM
	KCI 30 mM
	Na2HPO4 6.5 mM
	KH2PO4 1.4 mM
TBE	Tris 100 mM

Tris 100 mM Borsäure 100 mM EDTA 2.5 mM

TBS-T	NaCl 0.15 mM
	Tris-HCl pH 8 10 mM
	Tween 20 0.05% (v/v)
Tris-EDTA	Tris-HCl pH 7.4 10 mM
	EDTA pH 8.0 1 mM

HBSS	Calciumchloride 0.1396 g.L-1
	Magnesiumsulfat 0.09767 g.L-1
	Kaliumchlorid 0.4 g.L-1
	Kaliumphosphat 0.06 g.L-1
	Natriumchlorid 8 g.L-1
	Natriumphosphat 0.04788 g. L-1
Tail buffer	Tris pH 8.5 100 mM
	EDTA pH 8.0 5 mM
	SDS 2% (w/v)
	NaCl 200 mM
Tris-EDTA	Tris-HCl pH 7.4 10 mM
	EDTA pH 8.0 1 mM
Dimethylarsinsäure Puffer	Dimethylarsinsäure-Natrium salt 85,6 g.L-1
Stripping Puffer	Tris pH 6.7 62,6 mM
	SDS 2% (w/v)
	ß-mercaptoethanol 100 mM
PBS 0.1 M (pH 7.4)	NaCl 1.37 M
	KCI 27 mM
	Na2HPO4 100 mM
	KH2PO4 20 mM
Medikamente	
Forene	Abbott, Abbott Park, USA
Naloxon	Sigma, St. Louis, USA
Zoletil	Virbac, Glattbrugg, Switzerland

Radioaktiv markierte Substanzen

[³H]DAMGO Perkin Elmer, Boston, USA [³H]Naltrindole Perkin Elmer, Boston, USA [³H]-U69,593 American Radiolabeled Chemicals, USA

4.1.2 Geräte

Fluostar Optima Elektophorese-Set Cryostat Fluoreszenz Microskop Gel casting trays PHmeter MP220 Power Pac300 Spectrophotometer (UV 1601) Thermomixer Transilluminator Ultrapure (Direct-QTM5) UV-light (Macro Vue UV25) Vacuum System Sonicator 3000 Centrifuge Rotixa 50 RS Ultra-Turrax T10 Zentrifuge (Sorvalll RC 5C Plus) Vortex Genius 3 Zell-Filtergerät (M24R) Flüssigszintillationszähler Vakuumpumpe MZ 2 NT VacuuBrand, Wertheim, Germany

BMG Labtech, Ortenberg, Germany Bio-Rad Laboratories, München, Germany Microm International GmbH, Walldorf, Germany Carl Zeiss Microlmaging GmbH, Germany Bio-Rad Laboratories, München, Germany Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Germany Bio-Rad Laboratories, München, Germany Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany Eppendorf AG, Hamburg, Germany Herolab GmbH, Wiesloch, Germany Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.,Germany Hoefer, Inc. Holliston, MA, USA Eppendorf AG, Hamburg, Germany Giltron, INC, Massachussetts, USA Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany IKA, Staufen, Deutschland Sorvall, Waltham, USA IKA, Staufen, Germany Brandel, Gaithersburg, USA PerkinElmer, Turku, Finnland

4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Filter (microcon YM10) Nitrocellulosemembran Mini-Pumpe Model 2001 Pipetten (1-25 ml, one-way) Polyethylen PE10 Katheter Objektträger Reaktionsgefäße 0.5, 1.5, 2ml Schwamm Spritzen 1, 2,10 ml Transfer Kassette Transfer Tank Röhrchen (15 and 50 ml) Gelatine-umhüllte Objektträger Skalpell Microtest Tissue Kultur Platte Röntgenfilme Nitrocellulose-Membran 0,2 µm Petrischale Combitips Multipette

Millipore GmbH, Schwalbach, Germany Bio-Rad Laboratories, München, Germany Alzet, Coopertino, CA, USA SARSTEDT AG & Co. Nümbrecht, Germany Portex Ltd, Hythe, UK Menzel, Braunschweig, Germany Eppendorf AG, Hamburg, Germany Bio-Rad Laboratories, München, Germany Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany Bio-Rad Laboratories, München, Germany Bio-Rad Laboratories, München, Germany Falkner GmbH, Gräfelfing-Lochham, Germany Tekdon, INC, Florida, USA BD Bioscience, New Jersey, USA Becton Dickinson, New Jersey, USA GE Healthcare, Buckinghamshire, UK Carl Roth, Karlsruhe Deutschland BD Bioscience, New Jersey, USA Eppendorf, Hamburg, Germany Eppendorf, Hamburg, Germany

4.1.4 Antikörper (87,88) **Primärantikörper**

Western Blot

Kaninchen-Anti-DOR-AK	Gramsch Laboratories, Germany; 1:1000
Kaninchen-Anti- KOR-AK	Acris Antibodies, Germany; 1:1000
Maus-Anti-PENK-AK	LifeSpan Biosciences, USA; 1:1000
Kaninchen-Anti-PDYN-AK	Abcam, UK; 1:1000

Kaninchen-Anti-GAPDH-A	Santa Cruz, Germany; 1:1000	
Immunhistochemie		
Polyklonaler Kaninchen-Anti-DOR-AK	Dr. R. Elde, USA; 1:2000	
Polyklonaler Kaninchen-Anti-KOR-AK	Dr. S.J. Watson, USA; 1:1000	
Monoklonaler Maus-Anti- Dihydropyridin-Rezeptor-AK	Sigma, Germany; 1:1000	
Monoklonaler Maus-Anti-Inositol- 1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor- TypIII-AK	BD Biosciences, USA; 1:600	
Sekundärantikörper		
Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper	Vector Laboratories, UK, 1:200	
(Texas Red konjugiert)		
Affe-Anti-Maus-AK	Vector Laboratories, UK, 1:200	
(FITC konjugiert)		
Anti-Kaninchen-AK	Jackson ImmunoResearch, USA; 1:2000	
Anti-Maus-AK	Abcam, United Kingdom; 1:7500	

4.2 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien

Der Nachweis OR-spezifischer Membranbindungsstellen von DOR, KOR und MOR erfolgte durch Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien (87,88). Unter Anwendung dieser Methode ließen sich Aussagen über die Anzahl der Opioidrezeptoren und das Bindungsverhalten der Liganden treffen. Durch mathematische Extrapolation der Sättigungskurve wurde die maximale Bindungskapazität (B_{max}) und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_d) bestimmt. Dabei dienten die in Tab. 1 dargestellten radioaktiv markierten Agonisten bzw. Antagonisten als Liganden für spezifische und unspezifische Ligand-Rezeptor-Bindungen.

Die Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien wurden unter Supervision von Herrn Dr. rer. nat. Mohammed Shaqura entsprechend der Arbeitsprotokolle von Mousa et al., 2010 und Shaqura et al., 2004 durchgeführt.

4.2.1 Aufbereitung des Gewebes

Das konservierte tiefgefrorene Gehirn oder Rattenmyokard wurde in eisgekühlter Pufferlösung (50 mM Tris/HCl, pH 7,4) für 3 x 20 Sekunden mit einem Ultra-Turrax[®] homogenisiert. Es wurde Myokard- oder Hirngewebe pro OR für die Bindungsstudien verwendet. Das Homogenisat wurde für 20 Minuten bei 4°C und 48000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die bodenständige Membranfraktion wurde in eisgekühlter Pufferlösung (50 mM Tris/HCl, pH 7,4) resuspendiert und für 10 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert, um endogene Liganden zu entfernen. Unter den vorher beschriebenen Bedingungen wurde die Gewebesuspension erneut zwei Mal bei 4°C und 48000 g zentrifugiert und resuspendiert. Anschließend wurde die Proteinmenge wie unten beschrieben bestimmt, das Homogenisat aliquotiert und bei -80°C eingelagert.

4.2.2 Bestimmung der Proteinmenge

Für die Berechnung der Bezugsgröße für die Anzahl der Bindungsstellen in fmol/mg Protein, war die Bestimmung der Proteinmenge der Membransuspension erforderlich. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde die Methode nach Bradford, 1976 verwendet. Dazu wurden 200 µl BIO-RAD-Reagens, 790 µl Aqua bidest. und 10 µl der Membranfraktion für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei einer Wellenlänge von 595 nm konnte nun der Proteingehalt photometrisch ermittelt werden. Der Leerwert wurde mittels einer Lösung bestehend aus 800 µl Aqua bidest. und 200 µl BIO-RAD-Reagens bestimmt. Zur Kalibrierung des Standardwertes wurde Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt. Die Proteinmenge wurde anhand einer linearen Standardkurve bestimmt.

4.2.3 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien

Zur Durchführung der Sättigungsbindungsstudien wurden die Membranfraktion des Herz- oder Hirngewebes aufgetaut und nochmals bei 4°C und 48000 g für 20 Minuten zentrifugiert, anschließend homogenisiert und mit eisgekühltem Tris-Puffer (50 mM, pH 7,4) resuspendiert. 200 µl der Membransuspension (100 µg Protein) wurden mit 25µl verschiedener Konzentrationen von 0,25nM bis 16nM eines [³H]-Opioidrezeptor-Liganden (Tab. 1) und 25 µl Tris-Puffer in einem Volumen von 250 µl für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die rezeptorgebunden Liganden mittels eines Zell-Filtergeräts durch Filtration unter Vakuum auf GF/C-Filterpapiere übertragen, die ungebunden Liganden wurden ausgewaschen. Die Filterpapiere wurden über Nacht in 3 ml Szintillationsflüssigkeit inkubiert. Die radioaktiv markierten Liganden konnten nun im Flüssigszintillationszähler nachgewiesen werden. Über die gemessene Radioaktivität der gebundenen Liganden konnten Rückschlüsse auf die Anzahl der Rezeptoren gezogen werden (siehe Kapitel Quantitative Analyse der Radioligand-Bindungsstudien). Es wurden jeweils mindestens fünf unabhängige Experimente in Zweifachbestimmung durchgeführt. Zur Bestimmung des unspezifischen Bindungsverhaltens des gewählten radioaktiven Liganden wurde 10 µM nicht-radioaktiv-markiertes Naloxon, Naltrindole oder U-69,593, anstatt des Tris-Puffers zum Versuchsansatz zugegeben und die Radioaktivität gemessen. Auf diese Weise wurden alle drei oben beschriebenen Opioidrezeptoren im Gehirn oder Myokard der Ratten nachgewiesen.

Tabelle 1: Radioaktiv und nicht-radioaktiv markierte Liganden der Bindungsstudien. Darstellung der Liganden, die in den Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien zur Darstellung Opioid-spezifischer Membranbindungsstellen im Gehirn und Im Herzen von Ratten eingesetzt wurden, aufgeteilt nach Opioidrezeptoren.

Opioidrezeptor	Ligand	Ligand
	radioaktiv markiert	nicht radioaktiv markiert
MOR	³ [H]DAMGO	Naloxon
DOR	³ [H]Naltrindole	Naltrindole
KOR	³ [H]U-69,593	U-69,593

4.3 Quantitative Analyse der Radioligand-Bindungsstudien

4.3.1 Grundlagen der Radioligand-Bindungsstudien

Die experimentell nachgewiesene Radioaktivität stellt die Gesamtheit aller gebundenen radioaktiv markierten Liganden dar. Diese Gesamtbindung bildet sich aus der spezifischen und der unspezifischen Bindung. Von spezifischer Bindung spricht man, wenn ein Ligand nur an bestimmte Rezeptoren bindet. Unspezifische Bindungen geht der Ligand mit künstlichem Material oder rezeptorfremden biologischen Strukturen ein.

Die Gesamtbindung zeigt eine Sättigungskinetik. Das heißt, dass mit zunehmender Ligandenkonzentration ein Maximalwert erreicht wird. Die unspezifische Bindung folgt hingegen einem linearen Verlauf ohne Maximalwert. Um eine quantitative Aussage über die Anzahl der Rezeptoren treffen zu können, muss die spezifische Bindung des Radioliganden an die Rezeptoren ermittelt werden. Da die spezifische Bindung experimentell nicht messbar ist, muss sie durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung errechnet werden.

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wird ein Kompetitor des radioaktiv markierten Liganden in einer 100 bis 1000-facher Überschusskonzentration eingesetzt. Dadurch werden vor allem die ligandenspezifischen Rezeptoren im Versuchsansatz besetzt, beziehungsweise spezifische Liganden aus ihrer Bindung kompetitiv gelöst. Der radioaktiv markierte Ligand geht daher die vorliegenden unspezifischen Bindungen ein. Die gemessene Radioaktivität entspricht in diesem Versuchsansatz folglich der unspezifischen Bindung. Die errechnete spezifische Bindung unterliegt ebenfalls einer Sättigungskinetik. Sie erreicht bei zunehmender Konzentration des Radioliganden einen Maximalwert (Abb. 1).



Abb. 1: Spezifische und unspezifische Bindung. Darstellung des Bindungsverhaltens von Liganden in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien. A: Graphische Darstellung der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung. Auf der x-Achse wird die Konzentration des freien Radioliganden, auf der y-Achse die Menge des spezifisch gebundenen Radioliganden dargestellt. B: Graphische Darstellung der spezifischen Bindung nach Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung. Auf der x-Achse wird die Konzentration des freien Radioliganden, auf der y-Achse die Spezifischen Bindung nach Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung. Auf der x-Achse wird die Konzentration des freien Radioliganden, auf der y-Achse die Menge des spezifisch gebundenen Radioliganden dargestellt. Modifiziert nach User's Guide GraphPad Prism 4.

4.3.2 Bestimmung der maximalen Bindungskapazität und der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten

Wie bereits erwähnt kann die Anzahl der Opioidrezeptoren und das Bindungsverhalten der Liganden durch die Bestimmung der Bindungsparameter K_d und B_{max} genauer charakterisiert werden. Die Dissoziationskonstante (K_d) stellt ein Maß für die Affinität der Bindungsstelle des Liganden zum entsprechenden Rezeptor dar.

Die maximale Bindungskapazität (B_{max}) beschreibt die maximal durch Liganden zu besetzende Rezeptoranzahl.

Die folgende chemische Gleichung zeigt die Interaktion eines Liganden (L) mit der Bindungsstelle einen Rezeptors (R) (89):

$$L + R \xrightarrow{K^{+1}} RL$$

Die maximale Bindungskapazität B_{max} , auch totale Rezeptoranzahl (R_T) genannt, ergibt sich aus der Anzahl der freien Rezeptoren (L) und der Anzahl der Rezeptor-Liganden-Komplexe (RL).

$$R_T = B_{\max}$$
$$[R_T] = [R] + [RL]$$

Die Gleichgewichtsdissozationskonstante (K_d) leitet sich vom Massenwirkungsgesetz ab.

$$K_{d} = \frac{[R] \times [L]}{[RL]} = \frac{K^{-1}}{K^{+1}}$$

Kombiniert man das Massenwirkungsgesetz mit der Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand und löst diese nach [RL] auf, erhält man folgende Gleichung:

$$[RL] = \frac{[B_{\max}] \times [L]}{K_d + [L]}$$

Diese Gleichung zeigt die Abhängigkeit der Menge des Rezeptor-Liganden-Komplexes [RL] von der Konzentration des Liganden [L]. Da die maximale Bindungskapazität B_{max} und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_d aus der Sättigungskurve nicht ermittelt werden können, muss diese linearisiert gebracht werden. Dazu wird das Verfahren der linearen Regression nach Scatchard (90) angewandt.

Die Scatchard-Gleichung lautet:

$$\frac{[RL]}{[L]} = \frac{B_{\max}}{K_d} - \frac{1}{K_d} \times [RL]$$

Die graphische Darstellung der Scatchard-Gleichung erfolgt in einem Koordinatensystem mit folgenden Achsen: Die x-Achse stellt den gebundenen Liganden [RL] (Bound) dar, während auf der y-Achse der Quotient aus gebundenem und freiem Liganden [RL]/[L] (Bound/Free) aufgetragen wird. Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse ergibt sich die maximale Bindungskapazität B_{max}. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ermittelt man aus dem negativen reziproken Wert (-1/K_d) der Neigung der Geraden (Abb. 2).



Abb. 2: Ermittlung der maximalen Bindungskapazität (Bmax) und der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (Kd). A: Graphische Darstellung der Sättigungskurve. Auf der x-Achse wird die Konzentration des freien Radioliganden (Free), auf der y-Achse die Menge des spezifisch gebundenen Radioliganden (Bound) dargestellt. B: Graphische Darstellung der Scatchard-Gleichung. Auf der x-Achse wird die Konzentration des gebundenen Radioliganden (Bound), auf der y-Achse der Quotient aus gebundenem und freiem Radioliganden (Bound/Free) dargestellt. Modifiziert nach User's Guide GraphPad Prism 4.

Zur Ermittlung der Bindungsparameter Affinitätskonstante (K_d) und maximale Rezeptoranzahl (B_{max}) wurde das Programm Graph-Pad Prism (GraphPad[®] Software, San Diego, CA) eingesetzt.

4.4 Modell "Infrarenale, aortokavale Fistel (ACF)"

Die folgenden Experimente wurden gemeinsam mit Herrn Dr. med. Sascha Treskatsch aus der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

4.4.1 Tiere

Die Experimente wurden an 280-300 g schweren männlichen Wistar-Ratten (Harlan Winkelmann, Borchen, Deutschland) durchgeführt. Die Haltung erfolgte in der Tierhaltung der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, bei einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus in einem klimatisierten Raum mit konstanter Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 23 Grad Celsius (°C). Trinkwasser und Nahrung wurde den Tieren zu jeder Zeit zur freien Verfügung gestellt. Die Experimente wurden von der lokalen Tierschutzbehörde, dem Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, genehmigt (Genehmigung des Tierantrags G 0144/12 vom 25.03.2012).

4.4.2 Experimentelles Modell

Zum Nachweis von qualitativen und quantitativen Veränderungen der Opioidrezeptoren und ihrer endogenen Peptide im insuffizienten Herz der Ratte wurde ein etabliertes Modell nach Treskatsch et al. Angewandt (91). Dieses Modell diente zur reproduzierbaren Entwicklung einer chronischen, kongestiven Herzinsuffizienz aufgrund einer biventrikulären Volumenüberladung, induziert durch eine infrarenale, aortokavale Fistel (ACF).

4.4.3 Operationstechnik der ACF-Induktion

Die ACF-Induktion wurde nach einer modifizierten Operationstechnik von Garcia und Diebold (92) durchgeführt. Dazu wurde in Isofluran-Narkose zunächst das Bauchfell der Tiere rasiert und das Operationsgebiet mit einer 70%-igen Ethanollösung desinfiziert. Die Bauchhöhle wurde durch einen Medianschnitt eröffnet und die Aorta abdominalis mit der Vena cava inferior in ihrer gemeinsamen Bindegewebsscheide dargestellt. Anschließend wurde die Aorta abdominalis oberhalb der Nierengefäßabgänge kurzzeitig mit einer Bulldock-Klemme abgeklemmt. Mittels einer 16G-Kanüle (Durchmesser 1.291 mm) wurde die Aorta punktiert, und die Kanüle anschließend in die Vena cava inferior vorgeschoben (91). Dabei entstand eine reproduzierbare Kurzschlussverbindung (ACF) zwischen beiden Gefäßen analog der Kanülengröße (Abb. 3). Um die Aorta und die Vena cava blutleer zu halten, wurden die Gefäße vor dem Herausziehen der Kanüle manuell komprimiert. Im Anschluss wurde die Punktionsstelle mit einem Zyanoakrylkleber (Sekundenkleber, UHU, Deutschland) verschlossen. Die proximal liegende Klemme wurde nach ungefähr 30 Sekunden (Trocknungszeit des Klebstoffes) gelöst und die Perfusion der Aorta wieder freigegeben.



Abb. 3: Schematische Darstellung der Induktion einer infrarenalen, aortokavalen Fistel. Links: Darstellung des Blutflusses (Pfeile) durch die Aorta und die Vena cava inferior vor der Operation; Rechts: Darstellung des Blutflusses (Pfeile) durch die Aorta und die Vena cava inf. nach der Operation.

Eine qualitative Beurteilung der Fistelgröße konnte nun visuell durch ein pulsatiles Anschwellen und eine hellrote Verfärbung der Vena cava inferior aufgrund der Zumischung von arteriellem Blut vorgenommen werden. Danach wurde die Bauchhöhle schichtweise mit sterilen Einzelknopfnähten verschlossen. Die Kontrolltiere wurden bis auf die Punktion der Aorta identisch operiert. Zur postoperativen Schmerztherapie wurde Metamizol 40mg/kg KG s.c. unmittelbar intraoperativ sowie an den ersten beiden postoperativen Tagen verabreicht.

4.4.4 Hämodynamische Vermessung

Der Nachweis einer volumenbedingten Herzinsuffizienz gelang anhand verschiedener Parameter (siehe unten) (91). Diese Experimente wurden unter Tiletamin/Zolazepam-Anästhesie (Zoletil[®], 10mg/kg s.c. initial und anschließender Vertiefung durch 50mg/kg i.m.) 28 ± 2 Tage nach der ACF-Induktion durchgeführt (93). Um eine Hypothermie der Tiere zu verhindern, wurden diese während der hämodynamischen Vermessung auf eine Heizplatte gelegt. Das Elektrokardiogramm (EKG) wurde über externe Elektroden mit Ableitung der Herzfrequenz erfasst. Nach Überprüfung einer ausreichenden Narkosetiefe durch äußere Reize wurde eine Tracheotomie (Kunststoff-Katheter, OD 2,42 mm) durchgeführt, über welche die Tiere spontan atmeten. Anschließend wurde zur Messung des zentralvenösen Drucks (ZVD) ein PE-50-Katheter (OD 0,96 mm) in die rechte Vena jugularis eingeführt (Abb. 4). Zur Bestimmung des arteriellen Blutdruckes wurde ein Druck-Volumen-Katheter (Mikro-Tip Pressure-Volume Catheter (SPR-838NR; Millar^{®)} nach Darstellung und Inzision in die rechte Arteria carotis communis eingeführt (Abb. 5). Im Anschluss wurde der Katheter vorsichtig durch die Aortenklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben. So konnten folgende Parameter gemessen werden: SV = Schlagvolumen; LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; LVEDP = Linksventrikulärer enddiastolischer Druck; SBD = Systolischer Blutdruck; DBD = Diastolischer Blutdruck; ZVD = Zentralvenöser Druck; dP/dt max.= maximale systolische Druckveränderung pro Sekunde im linken Ventrikel; LVEDV= Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen; LVESV= Linksventrikuläres endsystolisches Volumen. Außerdem konnten Druck-Volumen-Kurven aufgezeichnet werden. Alle Messungen wurden mit dem PowerLab[®]-Programm (AD Instruments, New Zeeland) registriert⁹¹. Nach der vollständigen Katheterisierung der Tiere wurde ein 10 minütige Ruhezeit eingehalten, bevor die Messungen begonnen wurden. Nach Abschluss der Messungen erhielt jedes Tier bei Bedarf eine Repetitionsdosis Zoletil® und die frühere OP-Narbe wurde erneut eröffnet, um die Fistel visuell zu evaluieren. Zur Organentnahme wurde das Tier durch eine finale Blutentnahme getötet und das Herzgewebe wie in den Kapiteln 2.4 und 2.6 beschrieben zur Untersuchung des kardialen Opioidsystems verwendet.

28

4.5 Immunhistochemie

Die Darstellung der Opioidrezeptoren (DOR, KOR) wurde mittels immunhistochemischer Anfärbung mit fluoreszierenden Antikörpern durchgeführt (87,88). Zur Bestimmung der Lokalisation der Opioidrezeptoren im Myokard wurden die Calciumkanäle Dihydropyridin- (DiR,Cav1.2) und Ryanodin-Rezeptor (RyR) angefärbt.

Die Immunhistochemie beschreibt eine Methode mit der bestimmte proteinartige Zielstrukturen in histologischen Schnitten auf zellulärer und subzellulärer Ebene mit Hilfe von Antikörpern unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden.

Die Darstellung erfolgt in einer Antigen-Antikörper-Reaktion durch Antikörper, die spezifisch für bestimmte Bereiche, sogenannte Epitope, sind. Nach der Anzahl der verwendeten Antikörper werden verschiedene Formen der Immunhistochemie unterschieden. Bei der direkten Methode sind die spezifischen Antikörper direkt mit einem Enzym konjugiert. Dieses setzt ein hinzugefügtes chromogenes Substrat in einer immunchemischen Reaktion um und die gewünschte Zielregion wird deutlich hervorgehoben. Bei Erweiterung der Methode um fluoreszierende Antikörper spricht man von Immunfluoreszenz. Für die Detektion mit Hilfe der in dieser Arbeit angewandten indirekten Methode sind zwei Antikörper notwendig. Zunächst bindet der immunogenspezifische Primärantikörper an der Zielregion. Nun wird ein Sekundärantikörper verwendet der wiederum spezifisch für das Fc-Segment des Primärantikörpers ist. Der Sekundärantikörper ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert, der die mikroskopische Darstellung der Zielregion ermöglicht.

Der immunhistochemische Nachweis der Opioidrezeptoren DOR und KOR und der Calciumkanäle DiR und RyR erfolgte unter Supervision von Herrn Dr. Shaaban Mousa entsprechend der Arbeitsprotokolle von Treskatsch et al., 2014 und Mousa et al., 2011.

4.5.1 Aufbereitung des Gewebes

Zur Gewinnung des ACF- und Kontrollmyokards des linken Ventrikels wurden die männlichen Wistar-Ratten (siehe unten) in tiefer Tiletamin/Zolazepam (Zoletil[®])-Narkose zunächst mit 100ml warmer NaCl-Lösung (pH 7,4) transkardial perfundiert.

Anschließend wurde die transkardiale Perfusion mit einer Fixationslösung (300 ml 4%-Paraformaldehyd in 0,16 M Phosphat-Puffer, pH 7,4) fortgeführt. Nach der Perfusion wurden die Herzen entnommen und erneut in der oben genannten Fixationslösung für 90 Minuten inkubiert. Die Konservierung erfolgte bei 4° Celsius über Nacht mit einer Konservierungslösung (PBS: Phosphat-Puffer, NaC,I pH 7,4 10% Sucrose). Zur Herstellung histologischer Gewebeschnitte wurde das Myokard zunächst in einer Tissue-Tek-Lösung (OCT; Miles, Elkhart, USA) eingebettet und bei -80°C tiefgefroren. Mittels eines Cryostat (Microm International GmbH, Walldorf, Germany) ließen sich 10

Mikrometer dünne Schnitte herstellen, die in PBS gelagert wurden. Anschließend wurden die Gewebeschnitte auf Objektträgern in Gelatine eingefasst.

4.5.2 Immunfluoreszenz-Färbung

Die in Gelatine gefassten Gewebeschnitte wurden zum Schutz vor unspezifischen Bindungen der Antikörper für 60 Minuten in einer Lösung (PBS, 0.3% Triton X-100, 1% BSA, 10% Ziegen-Serum, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) inkubiert. Die Schnitte wurden dann über Nacht den folgenden spezifischen Primärantikörpern (Tab. 2) ausgesetzt: polyklonaler Kaninchen-Anti-DOR-Antikörper oder polyklonaler Kaninchen-Anti-KOR-Antikörper. Zur Identifizierung des spannungsabhängigen L-Typ-Dihydropyridin-Rezeptor wurde ein Calciumkanals monoklonaler Maus-Anti-Dihydropyridin-Rezeptor-Antikörper (Anti-Cav1.2) hinzugefügt. Der Ryanodin-Rezeptor im Sarkoplasmatischen Retikulum wurde mittels eines monoklonalen Maus-Anti-Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor-Antikörpers Typ III dargestellt. Anschließend wurden die überschüssigen Primärantikörper wie unten beschrieben mit PBS ausgewaschen. Die Gewebeschnitte wurden nun mit folgenden Sekundärantikörpern (Tab. 3) inkubiert: Texas Red konjugierte Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper: spezifisch für die Anti-OR-Antikörper oder FITC konjugierte Affe-Anti-Maus-Sekundärantikörper: spezifisch für die Anti-Calciumkanal-Antikörper. Das Auswaschen der überschüssigen Sekundärantikörper erfolgte ebenfalls mit PBS. Die blaue Anfärbung der Kerne erfolgte mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, 0,1µg/ml in PBS) (Sigma, USA). Es folgte ein erneuter Auswaschvorgang mit PBS. Alle Antikörperreaktionen fanden bei Raumtemperatur statt. Die Waschvorgänge mit PBS erfolgten jeweils drei Mal für 10 Minuten. Die Gewebeschnitte wurden anschließend mittels Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) auf Objektträgern befestigt.

30

Schlussendlich konnten die Zielstrukturen mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) sichtbar gemacht werden. Zur Sicherstellung der Spezifität der Primärantikörper-Reaktion wurden Kontrollversuche mittels Inkubation mit 5lg/ml des synthetischen Peptides für DOR (Gramsch Laboratories) und KOR (Dr. S.J. Watson) durchgeführt.

Die quantitative densitometrische Auswertung der spezifischen Immunfluoreszenz erfolgte mit Hilfe des Programms Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health). Zunächst wurde der Hintergrund des Bildes gleich 0 gesetzt und zur Erzeugung der gegenteiligen Farbe des jeweiligen Farbraumes das Bild invertiert. Anschließend wurden das Areal und die Dichte der Pixel der spezifischen Immunfluoreszenz gemessen. Daraus wurde die optisch integrierte Dichte (OID) mit Hilfe des Programms errechnet. Zur Bearbeitung der Bilder wurde das Programm Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems, San Jose, USA) verwendet.

Tabelle 2: Primärantikörper zur immunhistochemischen Anfärbung von Opioidrezeptoren und Calciumkanälen. Auflistung der Primärantikörper zur immunhistochemischen Anfärbung der Opioidrezeptoren (DOR,KOR) und der Calciumkanäle (DiR,RyR) im Myokard von Ratten 28 ± 2 Tage nach Induktion einer infrarenalen, aortokavalen Fistel mit konsekutiver chronischer kongestiver Herzinsuffizienz, sowie im Myokard gesunder Ratten.

Zielstruktur	Immunogen	Primärantikörper	
DOR	Aminosäure 3-17 ab N-Terminus	Polyklonaler Kaninchen-Anti-DOR-	
	des DOR der Ratte	Antikörper	
KOR	Aminosäure 384-398 ab N-	Polyklonaler Kaninchen-Anti-KOR-	
	Terminus des KOR der Ratte	Antikörper	
DiR	α2 Untereinheit des DiR des	Monoklonaler Maus-Anti-	
	Kaninchens	Dihydropyridin-Rezeptor-Antikörper	
RyR	Inositol-1,4,5-Trisphosphat-	Monoklonaler Maus-Anti-Inositol-	
	Rezeptor Typ III des Menschen,	1,4,5-Trisphosphat- Typ III -	
	Aminosäure 22-230	Rezeptor-Antikörper	

Tabelle 3: Sekundärantikörper zur immunhistochemischen Darstellung der spezifischenPrimärantikörper.Auflistung der Sekundärantikörper zur immunhistochemischen Darstellungder Opioidrezeptor- und Calciumkanal-spezifischen Primärantikörper im Myokard von Ratten.

Zielstruktur		Sekund	däranti	körper	
Polyklonaler Kan	inchen-Anti-DOR	Texas	Red	konjugier	te Ziege-Anti-
		Kaninchen-Antikörper			
Polyklonaler Kaninchen-Anti-KOR		Texas	Red	konjugier	te Ziege-Anti-
		Kanincl	hen-An	tikörper	
Monoklonaler	Maus-Anti-Dihydropyridin-	FITC	konju	ugierte	Affe-Anti-Maus-
Rezeptor		Sekund	lärantik	örper	
Monoklonaler	Maus-Anti-Inositol-1,4,5-	FITC	konju	ugierte	Affe-Anti-Maus-
Trisphosphat-Re	zeptor Typ III	Sekundärantikörper			

4.6 Western Blot

Der semiquantitative Nachweis der Opioidrezeptoren (DOR, KOR) und ihrer endogenen Liganden erfolgte durch die Western Blot-Methode mit Hilfe von markierten Antikörpern (87,88,94). Zuerst wurden die Rezeptor- und Ligandenproteine unter Einwirkung von SDS denaturiert und erhielten eine einheitlich negative Ladung. Zur Linearisierung durch Auflösung der Disulfidbrücken wurde eine Reduktion mit b-Mercaptoethanol durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proteine mittels Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt und anschließend durch "Blotten" auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Die Detektion der Proteine gelang mit Hilfe spezifischer Antikörper. Die Methode wurde erstmals 1979 im Labor von George R. Stark an der Universität Stanford entwickelt (95). Zur Detektion wurden zwei unterschiedliche Antikörper verwendet. Der erste Antikörper ging eine spezifische Bindung mit den Epitopen der zu detektierenden Proteine ein. Der Sekundärantikörper konnte nun die Primärantikörper über eine HRP (Meerrettich-Peroxidase) Reaktion darstellen. Das zugesetzte Peroxidase-Substrat ermöglichte die Reduktion von H2O2 zu H2O, katalysiert durch die HRP. Das Substrat setzte sich aus 2 Lösungen zusammen, welche erst kurz vor dem Gebrauch gemischt wurden (ca. 24h stabil): eine Peroxid-Lösung und eine Luminol-Lösung. Das Luminol wurde oxidiert und setzte dadurch Energie in Form von Licht frei (=Chemilumineszenz). Dieses Chemilumineszenzsignal konnte nun detektiert werden.

Die Erstellung der Western Blots wurde entsprechend der Arbeitsprotokolle von Mousa et al., 2015 unter Supervision von Frau Petra von Kwiatkowski durchgeführt.

4.6.1 Aufbereitung des Gewebes

Das bei -80° Celsius gelagerte Herzgewebe wurde zunächst mit einem Skalpell zerkleinert. Anschließend wurde es in ca. 300 µl Pufferlösung bestehend aus RIPA-Puffer (Santa Cruz) und Protease-Inhibitoren aufgenommen und mittels des Ultra-Turrax→ homogenisiert. Die Gewebesuspension wurde nun bei 4° Celsius ca. 30 Minuten inkubiert und schließlich bei 16000 G und 4° Celsius für 20 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand verwendet oder alternativ zum späteren Gebrauch bei -80° Celsius Grad eingefroren.

4.6.2 Bestimmung der Proteinmenge

Zur Vergleichbarkeit verschiedener Western Blots ist es nötig, stets gleiche Proteinmengen auf das Gel aufzutragen. Deshalb wurde zunächst die genaue Bestimmung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben durchgeführt. Im Vorfeld aller Western Blot Experimente wurden die Proteinkonzentrationen nach Pierce bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine colorimetrische Bestimmung und Quantifizierung der Gesamtproteinmenge durch Komplexbildung von Proteinen mit Kupfer. Das Kupfer-Ion Cu²⁺ reagiert in alkalischem Milieu mit Proteinen zu Cu¹⁺. Anschließend entsteht durch Komplexbildung von zwei BCA-Molekülen (Bichinonsäure) mit einem Cu1+-lon ein wasserlösliches, violettes Reaktionsprodukt. Das Absorptionsmaximum dieses Komplexes liegt bei 562 nm. Da der Anteil des Reaktionskomplexes direkt proportional zur Proteinmenge ist, konnte durch photometrische Quantifizierung auf die Proteinmenge geschlossen werden. Die Wells der Mikrotiterplatte wurden mit jeweils 10 µl des Proteinstandards bzw. der unbekannten Probe befüllt. Dazu wurden 200 µl Reaktionslösung (siehe Kapitel Material) hinzugegeben, die sich aus dem alkalischen Reagenz A (enthält Bichinonsäure), und dem Reagenz B (enthält Kupfersulfat) im Verhältnis 50:1 zusammensetzte. Jeder Wert wurde doppelt bestimmt. Die Mikrotiterplatte wurde zunächst ca. 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Schließlich wurde die Extinktion gemessen, wodurch die Proteinkonzentration berechnet werden konnte. Als Referenz zu den Proben wurde eine Eichkurve mit Rinderalbumin in den Konzentrationen von 0µg/ml bis 2000µg/ml hergestellt. Mit dem im Kit enthaltenen Rinderalbuminstandard mit der Konzentration 2mg/ml wurde eine Verdünnungsreihe mit RIPA-Puffer in den oben angegebenen Konzentrationen angefertigt. Die Proben wurden doppelt bestimmt und aus den ermittelten eine Eichkurve berechnet. Durch die Linearität (Extinktionskoeffizient/ Proteinmenge) konnte die effektive Proteinmenge der unbekannten Proben quantifiziert werden.

4.6.3 Vorbereitung der Gelelektrophorese

Die Lösungen der einzelnen Gele sind im Materialteil aufgelistet. Die Komponenten für das Trenngel wurden gemischt und in eine vorbereitete Gelkassette gegeben. Diese besteht aus zwei Glasplatten, von denen eine einen integrierten Abstandhalter enthält. Anschließend wurde die Trenngel-Lösung bis 10mm unterhalb der Probentaschen gegossen und mit ca. 1 ml Isopropanol zur Glättung überschichtet. Daraufhin wurde das Gel zur Polymerisation für 30 Minuten stehen gelassen.

Mit einem Filterpapier wurden die Isopropanolreste aufgenommen, dann die Sammelgellösung bis zum oberen Rand der Glasplatten dazugegeben. Der Kamm wurde luftblasenfrei eingesteckt und das Gel schließlich über einige Stunden (über Nacht) ausgehärtet. Aus den Konzentrationsbestimmungen der Proteinsuspensionen wurde die Größe des einzusetzenden Probenvolumens ermittelt, sodass 20-80 µg Protein (abhängig vom Vorhandensein des gesuchten Proteins) eingesetzt wurden. Die Probensuspension wurde mit RIPA-Puffer und einer SDS-Lösung vermischt (5x Laemmli-Puffer: 0,5 mM Tris, pH 6,8, 10% SDS, 20% Glycerol, 10% Mercaptoethanol, 0,05% Bromphenolblau). Pro Geltasche ergab sich ein Auftragevolumen von 20 µl. Die Proben wurden homogenisiert, kurz zentrifugiert und schließlich für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Dann wurden die Proben vollständig in die Taschen des Gels gegeben. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Standardproteinmarker zur Größenbestimmung in eine separate Tasche pipettiert.

4.6.4 Auftrennung der Proteine und Blotting

Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte in einem vertikalen Elektrophorese-System, das mit Laufpuffer gefüllt wurde. Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes wanderten die vorbehandelten Proteine von der Kathode zur Anode und wurden so nach ihrer Größe aufgetrennt. An das Gel wurde daher zunächst eine Stromspannung von 70V angelegt, um die Proteine im Sammelgel ca. 20 Minuten zu konzentrieren. Danach wurde die Spannung auf 120-160 V erhöht, bis die Proteinbanden ausreichend getrennt waren. Das Gel wurde nun vorsichtig von den Glasplatten abgenommen und das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt. Es wurde eine Nitrocellulosemembran in der Größe des Gels zugeschnitten. Für den Blotting-Vorgang wurde ein sogenanntes Sandwich hergestellt. Dieses bestand aus einem Streifen Filterpapier aus Zellstoff, einer Nitrocellulosemembran, dem Gel und einem weiteren Filterpapierstreifen. Dieses Sandwich wurde zwischen zwei dünnen Schwämmen in einer gitterförmigen Kunststoffvorrichtung eingeklemmt und mit der Membranseite zur Anode in die mit Blotting Puffer gefüllte Blot-Kammer eingehängt. Somit konnten die Proteinbanden vom Gel auf die Nitrocellulosemembran transferiert werden. Der Transfer erfolgte bei 350 mA für ca. 90 Minuten.

4.6.5 Färbungen

Die auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteinbanden wurden mit dem Farbstoff Ponceau angefärbt um die Effizienz der Übertragung zu überprüfen. Wenn alle Banden vorhanden und vor allem gleichmäßig zu sehen waren, wurde der Farbstoff mit TBST ausgewaschen.

4.6.6 Blocken

Vor der Reaktion zwischen den fixierten Proteinen auf der Nitrocellulosemembran und den spezifischen Antikörpern müssen unspezifische Proteinbindungsstellen der Blotmembran blockiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Membran 90 Minuten bei Raumtemperatur je nach Antikörper entweder in 3% BSA-TBST-Lösung oder 5% Magermilch-TBST-Lösung inkubiert.

4.6.7 Detektion

Direkt nach dem Blocken wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht bei 4° Celsius auf dem Kippschüttler mit dem Primärantikörper (Tab. 4) inkubiert. Zum Vergleich wurde GAPDH verwendet (Kaninchen-Anti-GAPDH-Antikörper, Aminosäure 1-335 des Menschen). Es folgte dreimaliges Waschen mit TBST jeweils 10 Minuten und die anschließende 90-minütige Inkubation mit dem jeweiligen HRP-konjugierten Sekundärantikörper (Tab. 5) im jeweiligen Blocking-Buffer auf dem Kippschüttler. Daraufhin wurden drei weitere Waschvorgänge der Membranen mit TBST für 10 Minuten durchgeführt. Als Substrat für die HRP wurde eine ECL-Lösung (SuperSignal West Pico; Thermo Scientific, USA) verwendet. Die Membranen zur Detektion des Chemilumineszenzsignals zwischen 30 Sekunden und 20 Minuten mit Röntgenfilmen in einer Röntgenkassette exponiert. In einer automatischen Entwicklermaschine wurden die Banden sichtbar gemacht. Die quantitative densitometrische Auswertung der Banden erfolgte mit Hilfe des Programms Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health).
Zunächst wurde der Hintergrund des Bildes gleich 0 gesetzt und zur Erzeugung der gegenteiligen Farbe des jeweiligen Farbraumes das Bild invertiert. Anschließend wurden das Areal und die Dichte der Pixel der spezifischen Banden gemessen. Daraus wurde die optisch integrierte Dichte (OID) mit Hilfe des Programms errechnet.

Tabelle 4: Primärantikörper zu Darstellung von Opioidrezeptoren und ihren endogenen Liganden im Western Blot. Auflistung der Primärantikörper zur Darstellung der Opioidrezeptoren (DOR,KOR) und Opioidpeptide (PENK,PDYN) im Myokard einer Ratte 28 ± 2 Tage nach der Induktion einer infrarenalen, aortokavalen Fistel mit einhergehender chronischer kongestiver Herzinsuffizienz.

Zielstruktur	Immunogen	Primärantikörper
DOR	Peptid: METWPF-	Kaninchen Anti-DOR
	GELL	
KOR	Aminosäuren 350-400	Kaninchen Anti-KOR
	ab N-Terminus des	
	KOR des Menschen	
PENK	Leu5-enkephalin (Rat-	Maus Anti-PENK
PDYN	Peptid:	Kaninchen Anti-PDYN
	RSQENPNTYSEDLDV	
	(Ratte)	

Tabelle 5: Sekundärantikörper zur Detektion der Primärantikörper im Western Blot. Auflistung der benutzten Sekundärantikörper zur Darstellung der für das Fc-Segement der Opioidrezeptor- und Opioidpeptid-spezifischen Primärantikörper im Myokard einer Ratte 28 ± 2 Tage nach der Induktion einer infrarenalen, aortokavalen Fistel mit einhergehender chronischer kongestiver Herzinsuffizienz.

Zielstruktur	Sekundärantikörper
Kaninchen Anti-DOR	Anti-Kaninchen-Antikörper
Kaninchen Anti- KOR	Anti-Kaninchen-Antikörper
Maus Anti-PENK	Anti-Maus-Antikörper
Kaninchen Anti-PDYN	Anti-Kaninchen-Antikörper

4.7 Statistik

Die Berechnungen und graphischen Darstellungen wurden mit SPSS erstellt. Alle Daten werden als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben. Die statistischen Signifikanzen zwischen zwei Gruppen wurden bei Normalverteilung der Daten mittels Student-t-Test ermittelt (Kolmogorov–Smirnov-Test), andernfalls mittels Mann–Whitney-U-Test durch-geführt. P<0.05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

5. Ergebnisse

5.1 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien

5.1.1 Nachweis von Opioidrezeptoren im Gehirn

Zunächst konnten zum Vergleich der ORs zwischen Gehirn, Rückenmark und Herz spezifische Bindungsstellen von DOR, KOR und MOR nachgewiesen werden. Dazu wurden Sättigungs-Bindungsstudien mit Hilfe der radioaktiv markierten Liganden [³H]Naltrindole, [³H]U-69,593 und [³H]DAMGO mit jeweils 5 gesunden Ratten (n=5 durchgeführt.

Es zeigte sich, dass der Ligand [³H]Naltrindole in den Sättigungs-Bindungsstudien von DOR an die Gehirn-Membranfraktionen gebunden wurde. Die Ermittlung der maximalen Bindungskapazität und der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten ergab B_{max} = 373,1 ± 32,1 fmol/mg und K_d = 1,5 ± 0,4 nM (Abb. 4).

Die Ergebnisse der Sättigungs-Bindungsstudien von KOR im Gehirn und im Rückenmark zeigten, dass der Ligand [³H]U-69,593 an die Membranfraktionen gebunden wurde. Die maximale Bindungskapazität und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindungsstudien im Gehirn betrugen B_{max} = 72,03 ± 5,7 fmol/mg und K_d = 0,4 ± 0,14 nM (Abb. 5). Im Rückenmark wurde eine maximale Bindungskapazität B_{max}= 22,7 ± 1,7 und eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_d = 1,8 ± 0,38 nM ermittelt (Abb. 6).

MOR ließ sich in Sättigungs-Bindungsstudien im Gehirn und im Rückenmark mittels [³H]DAMGO darstellen. Die Berechnung der maximalen Bindungskapazität und der Gleichgewichtsdissoziationskonstante im Gehirn ergab B_{max} = 404,7 ± 18,83 fmol/mg und K_d = 0,70 ± 0,1 nM (Abb. 7), im Rückenmark B_{max} = 138.8 ± 9,4 fmol/mg und K_d = 0.43 ± 0.1 nM (Abb. 8).



Abb. 4: Nachweis von DOR-spezifischen Bindungsstellen im Gehirn. A: DOR-spezifische Bindungskurve von [³H]Naltrindole im Rattengehirn. Auf der x-Achse ist die Konzentration von radioaktiv markiertem [³H]Naltrindole, einem DOR-Agonisten, in nM angegeben, auf der y-Achse die Proteinmenge, an die der Ligand spezifisch gebunden hatte, in fmol/milligramm. B: Scatchard-Plot der DOR- spezifischen Bindungskurve von [³H]Naltrindole im Ratten-Hypothalamus. Auf der x-Achse ist die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes, auf der y-Achse die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes/Ligand angegeben. Die Auswertung ergab B_{max}= 373,1 ±32,1 fmol/mg und K_d = 1,5 ± 0,4 nM. Angegebene Werte stellen Mittelwerte ± Standardfehler von 5 Ratten (n=5) dar.



Abb. 5: Nachweis von KOR-spezifischen Bindungsstellen im Gehirn. A: KOR-spezifische Bindungskurve von [3 H]U-69,593 im Rattengehirn. Auf der x-Achse ist die Konzentration von radioaktiv markiertem [3 H]U-69,593, einem KOR-Agonisten, in nM angegeben, auf der y-Achse die Proteinmenge, an die der Ligand spezifisch gebunden hatte, in fmol/milligramm. B: Scatchard-Plot der KOR- spezifischen Bindungskurve von [3 H]U-69,593 im Ratten-Mesencephalon. Auf der x-Achse ist die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes, auf der y-Achse die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes, auf der y-Achse die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes, auf der y-Achse die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes/Ligand angegeben. Die Auswertung ergab B_{max}= 72,03 ± 5,7 fmol/mg und K_d = 0,4 ± 0,14 nM. Angegebene Werte stellen Mittelwerte ± Standardfehler von 5 Ratten (n=5) dar.



Abb. 6: Nachweis von KOR-spezifischen Bindungsstellen im Rückenmark. A: KOR-spezifische Bindungskurve von [³H]U-69,593 im Rückenmark von Ratten. Auf der x-Achse ist die Konzentration von radioaktiv markiertem [³H]U-69,593, einem KOR-Agonisten, in nM angegeben, auf der y-Achse die Proteinmenge, an die der Ligand spezifisch gebunden hatte, in fmol/milligramm. B: Scatchard-Plot der KOR- spezifischen Bindungskurve von [³H]U-69,593 im Ratten-Mesencephalon. Auf der x-Achse ist die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes, auf der y-Achse die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes, auf der y-Achse die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes, auf der y-Achse die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes/Ligand angegeben. Die Auswertung ergab B_{max} = 22,7 ± 1,7 fmol/mg und K_d = 1,8 ± 0,38 nM. Angegebene Werte stellen Mittelwerte ± Standardfehler von 5 Ratten (n=5) dar.



Abb. 7: Nachweis von MOR-spezifischen Bindungsstellen im Gehirn. A: MOR-spezifische Bindungskurve von [³H]DAMGO im Rattengehirn. Auf der x-Achse ist die Konzentration von radioaktiv markiertem [³H]DAMGO, einem MOR-Agonisten, in nM angegeben, auf der y-Achse die Proteinmenge, an die der Ligand spezifisch gebunden hatte, in fmol/milligramm. B: Scatchard-Plot der MOR- spezifischen Bindungskurve von [³H]DAMGO im Ratten-Hypothalamus. Auf der x-Achse ist die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes, auf der y-Achse die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes, auf der y-Achse die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes, Ligand angegeben. Die Auswertung ergab B_{max}= 404,7 ± 18,83 fmol/mg und K_d = 0,70 ± 0,1 nM. Angegebene Werte stellen Mittelwerte ± Standardfehler von 5 Ratten (n=5) dar.



Abb. 8: Nachweis von MOR-spezifischen Bindungsstellen im Rückenmark. A: MOR-spezifische Bindungskurve von [³H]DAMGO im Rückenmark von Ratten. Auf der x-Achse ist die Konzentration von radioaktiv markiertem [³H]DAMGO, einem MOR-Agonisten, in nM angegeben, auf der y-Achse die Proteinmenge, an die der Ligand spezifisch gebunden hatte, in fmol/milligramm. B: Scatchard-Plot der MOR- spezifischen Bindungskurve von [³H]DAMGO im Ratten-Hypothalamus. Auf der x-Achse ist die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes, auf der y-Achse die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes, auf der y-Achse die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes/Ligand angegeben. Die Auswertung ergab B_{max}= 138.8 ± 9,4 fmol/mg und K_d = 0.43 ± 0.1 nM. Angegebene Werte stellen Mittelwerte ± Standardfehler von 5 Ratten (n=5) dar.

5.1.2 Nachweis von Opioidrezeptoren im Herzen

Im nächsten Schritt konnten DOR-, KOR- und MOR-spezifische Membran-Bindungsstellen im LV nachgewiesen werden. Wie in Gehirn und Rückenmark ließ sich auch im linken Ventrikel gesunder Ratten eine Sättigungskinetik der DOR-spezifischen Bindungsstellen zeigen. [³H]Naltrindole wurde an die LV-Membranfraktionen gebunden. Die maximale Bindungskapazität und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante betrug B_{max}= 456 fmol/mg und K_d = 6,3 nM (Abb. 9).

Die Ergebnisse der Sättigungs-Bindungsstudien von KOR im LV zeigten, dass [³H]U-69,593 an die LV-Membranfraktionen gebunden wurde. Die Berechnung der maximalen Bindungskapazität und der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten mittels Scatchard-Plot ergab B_{max} = 33,5 ± 6,2 fmol/mg und K_d = 5,1 ± 1,8 nM (Abb. 10).

MOR-spezifische Membran-Bindungsstellen im linken Ventrikel zeigten keine Sättigungskinetik in den Bindungsstudien mit [³H]DAMGO.



Abb. 9: Nachweis von DOR-spezifischen Bindungsstellen im LV gesunder Rattenherzen. A: DOR-spezifische Bindungskurve von [³H]Naltrindole im LV von gesundem Rattenmyokard. Auf der x-Achse ist die Konzentration von radioaktiv markiertem [³H]Naltrindole, einem DOR-Agonisten, in nM angegeben, auf der y-Achse die Proteinmenge, an die der Ligand spezifisch gebunden hatte, in fmol/milligramm. B: Scatchard-Plot der DOR- spezifischen Bindungskurve von ³[H]Naltrindole im LV. Auf der x-Achse ist die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes, auf der y-Achse die Konzentration des Rezeptor-Liganden-Komplexes/Ligand angegeben. Die Auswertung ergab B_{max}= 455,6 ±60,9 fmol/mg und K_d = 6,3 nM ±1,9. Angegebene Werte stellen Mittelwerte ± Standardfehler von 5 Ratten (n=5) dar. (Abbildung modifiziert nach Treskatsch, Dehe et al., 2015)









A: MOR-spezifische Bindungskurve von [³H]DAMGO im LV von gesundem Rattenmyokard. Auf der x-Achse ist die Konzentration von radioaktiv markiertem [³H]DAMGO, einem MOR-Agonisten, in nM angegeben, auf der y-Achse die Proteinmenge, an die der Ligand spezifisch gebunden hatte, in fmol/milligramm.

5.2 Ergebnisse ACF-Modell

5.2.1 Morphometrie

Zum Zeitpunkt der hämodynamischen Vermessung und Organentnahme zeigten sich nach Eröffnung des Thorax ein stark dilatiertes Herz und stark vergrößerte Lungen. Die Patentheit der ACF wurde durch erneute visuelle Inspektion evaluiert. Teilweise konnte eine deutliche Dilatation der Vena cava inferior gesehen werden.

Anhand der Körper- und Organgewichte von Herz und Lunge konnten Herz- und Lungen-Gewichtsindices ermittelt werden (Abb. 12). ACF-operierte Ratten zeigten 28 ± 2 Tage nach der Operation eine signifikante Zunahme der Herz- und Lungen-Gewichtsindices.



Abb. 12: Herz- und Lungen-/Körpergewicht-Indices. 28 ± 2 Tage nach Induktion einer infrarenalen, aortokavalen Fistel oder von Kontrolltieren wurden Herz und Lunge entnommen und deren Feuchtgewichte bestimmt und in Relation zum Körpergewicht gesetzt (Index). Dargestellt ist die Veränderung der Herz- und Lungen-Indices von Kontrolltieren und 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion (p<0,001). Angegebene Werte stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von 6 Ratten pro Gruppe dar (ACF: n=6; Kontrolle: n=6).

5.2.2 Hämodynamische Vermessung

In der hämodynamischen Vermessung der Ratten 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion zeigte sich eine schwere systolische Dysfunktion aufgrund einer biventrikulären Volumenüberladung (Tab. 7). Es ließen sich eine signifikante Erhöhung des Linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) und des Zentralvenösen Drucks (ZVD), sowie des Linksventrikulären endsystolischen Volumens (LVEDV) und des Linksventrikulären enddiastolischen Volumens (LVEDV) nachweisen. Auch der Systolische Blutdruck (SBD) und der Diastolische Blutdruck (DBD) verringerten sich signifikant. Die maximale systolische Druckveränderung pro Sekunde im linken Ventrikel (dP/dt max.) nahm hingegen signifikant ab. Die Bestimmung der Herzfrequenz (HF) zeigte keine signifikante Änderung. Trotz eines nahezu verdoppelten Schlagvolumens (SV) zeigte sich 28 \pm 2 Tage nach ACF-Induktion eine signifikante Reduktion der Linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF).

Tabelle 6: Ergebnisse der hämodynamischen Vermessung 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion. Angegebene Werte stellen Mittelwerte ± Standardfehler von 6 Ratten pro Gruppe dar. SV = Schlagvolumen; LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; LVEDP = Linksventrikulärer enddiastolischer Druck; SBD = Systolischer Blutdruck; DBD = Diastolischer Blutdruck; ZVD = Zentralvenöser Druck; dP/dt max.= maximale systolische Druckveränderung pro Sekunde im linken Ventrikel; HF = Herzfrequenz, LVESV = Linksventrikuläres endsystolisches Volumen; LVEDV = Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen. * = p<0,05. * = p=0,717.

	Kontrolle (n=6)	ACF (n=6)
SV (µI)	134 <u>+</u> 3*	298 <u>+</u> 40*
LVEF (%)	74 <u>+</u> 2*	45 <u>+</u> 4*
LVEDP (mmHg)	5,1 <u>+</u> 0,3*	12,1 <u>+</u> 1*
SBD (mmHg)	150 <u>+</u> 5*	95 <u>+</u> 4*
DBD (mmHg)	114 <u>+</u> 9*	71 <u>+</u> 3*
ZVD (mmHg)	0,1 <u>+</u> 0,1*	5,6 <u>+</u> 1*
dP/dt max.	14955 <u>+</u> 929*	9442 <u>+</u> 266*
(mmHg/s)		
HF (min ⁻¹)	$340,41\pm10^{+}$	316,98 <u>+</u> 10 ⁺
LVESV (µI)	359,71 <u>+</u> 36*	48,18 <u>+</u> 5*
LVEDV (µI)	658,04 <u>+</u> 61*	181,86 <u>+</u> 8*

Anhand der aufgezeichneten Druck-Volumen-Kurven konnte die erhöhte Herzarbeit der herzinsuffizienten Tiere dargestellt werden. Bei ACF-operierten Tieren zeigten sich charakteristische Druck-Volumen-Kurven, die mit erhöhten Schlagvolumina und erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Drücken, aber niedrigeren linksventrikulärer Ejektionsfraktion, niedrigerem systolischen und diastolischen Blutdruck und niedrigeren maximalen systolischen Druckveränderungen pro Sekunde im linken Ventrikel einhergingen (Abb. 13).



Abb. 13: Druck-Volumen-Kurven nach hämodynamischer Vermessung. Zur hämodynamischen Vermessung der ACF- und der Kontrolltiere wurde ein Druck-Volumen-Katheters (Mikro-Tip Pressure-Volume Catheter; SPR-838NR; Millar[®]) über die Arteria carotis communis in den LV eingeführt. Dabei zeigten sich unter anderem charakteristische Druck-Volumen-Kurven A: Druck-Volumen-Kurve eines Kontrolltieres B: Druck-Volumen-Kurve einer Ratte 28 ± 2 Tage nach Induktion einer CHF, induziert durch eine infrarenale, aortokavale Fistel.

5.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbung

In der immunhistochemischen Anfärbung von ORs in den Kardiomyozyten des linken Ventrikels von insuffizienten (ACF) und gesunden Rattenherzen (Kontrolle) ließen sich die Opioidrezeptoren DOR und KOR mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops visuell nachweisen. Zur genauen Lokalisationsbestimmung der ORs konnte die Kolokalisation mit dem plasmamembranständigen spannungsabhängigen L-Typ Dihydropyridin-Rezeptor (Ca_v1.2) und dem intrazellulären sarkoplasmatischen Ryanodin-Rezeptor (RyR) gezeigt werden.

5.3.1 Kolokalisation von OR und Ca_v1.2

Zunächst wurden ORs auf der Plasmamembran von Kardiomyozyten nachgewiesen. In der mikroskopischen Untersuchung des LV aus gesunden Rattenherzen ließ sich DOR zeigen. Die Lokalisationsbestimmung ergab eine Kolokalisation des DOR mit dem Dihydropyridin-Rezeptor ($Ca_v 1.2$) auf der Zellmembran und in T-Tubuli der Kardiomy-ozyten (Abb. 14).



Abb. 14: Immunhistochemische Anfärbung von DOR und Dihydropyridin-Rezeptor (Ca_v1.2) im Myokard des LV gesunder Rattenherzen. Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden die Rattenherzen in vivo transkardial mit einer Fixationslösung perfundiert und daraufhin entnommen. Anschließend erfolgte zur Herstellung histologischer Gewebeschnitte die Einbettung des Myokards in einer Tissue-Tek-Lösung. Schließlich wurden die Gewebeschnitte auf Objektträgern in Gelatine eingefasst. Die Anfärbung der Zielstrukturen erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Rezeptoranfärbung: DOR rot (Texas red Immunfluoreszenz); Dihydropyridin-Rezeptor (Ca_v1.2) grün (FITC green Immunfluoreszenz); Kolokalisation auf der Zellmembran (gelb); Zellkerne blau (DAPI); Balken=10 μ m. A-C Immunhistochemische Darstellung von DOR und Dihydropyridin-Rezeptor auf der Zellmembran und in T-Tubuli von Kardiomyozyten des gesunden LV. (Abbildung modifiziert nach Treskatsch, Dehe et al., 2015)

Die KOR-spezifische Anfärbung des LV aus gesunden Rattenherzen erbrachte in der mikroskopischen Untersuchung den Nachweis des KOR-Proteins im Kardiomyozyten. Es zeigte sich eine Kolokalisation des KOR mit dem Dihydropyridin-Rezeptor (Ca_v1.2) auf der Zellmembran und in T-Tubuli. (Abb. 15).



Abb. 15: Immunhistochemische Anfärbung von KOR und Dihydropyridin-Rezeptor (Ca_v1.2) im Myokard des LV gesunder Rattenherzen. Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden die Rattenherzen in vivo transkardial mit einer Fixationslösung perfundiert und daraufhin entnommen. Anschließend erfolgte zur Herstellung histologischer Gewebeschnitte die Einbettung des Myokards in einer Tissue-Tek-Lösung. Schließlich wurden die Gewebeschnitte auf Objektträgern in Gelatine eingefasst. Die Anfärbung der Zielstrukturen erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Rezeptoranfärbung: KOR (Texas red Immunfluoreszenz); Dihydropyridin-Rezeptor (FITC green Immunfluoreszenz); Kolokalisation auf der Zellmembran (gelb); Zellkerne blau (DAPI); Balken=10µm. A-C Immunhistochemische Darstellung von KOR und Dihydropyridin-Rezeptor auf der Zellmembran und in T-Tubuli von Kardiomyozyten des gesunden LV.

Die mikroskopische Untersuchung des Myokards aus dem LV 28 \pm 2 Tage nach ACF-Induktion zeigte die Existenz von DOR auf Kardiomyozyten. Die Lokalisationsbestimmung ergab eine Kolokalisation des DOR mit dem Dihydropyridin-Rezeptor auf der Zellmembran und in T-Tubuli (Abb. 16).

28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion konnte der KOR auf Kardiomyozyten des LV nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine Kolokalisation des KOR mit dem zellmembranständigen Dihydropyridin-Rezeptor auf der Plasmamembran und in T-Tubuli des Kardiomyozyten (Abb. 17).



Abb. 16: Immunhistochemische Anfärbung von DOR und Dihydropyridin-Rezeptor (Ca_v1.2) im LV 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion. Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden die Rattenherzen in vivo transkardial mit einer Fixationslösung perfundiert und daraufhin entnommen. Anschließend erfolgte zur Herstellung histologischer Gewebeschnitte die Einbettung des Myokards in einer Tissue-Tek-Lösung. Schließlich wurden die Gewebeschnitte auf Objektträgern in Gelatine eingefasst. Die Anfärbung der Zielstrukturen erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Rezeptoranfärbung: DOR (Texas red Immunfluoreszenz); Dihydropyridin-Rezeptor (FITC green Immunfluoreszenz); Kolokalisation auf der Zellmembran (gelb); Zellkerne blau (DAPI); Balken=10 μ m. A-C Immunhistochemische Darstellung von DOR und Dihydropyridin-Rezeptor im insuffizienten Rattenmyokard 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion auf der Zellmembran und in T-Tubuli von Kardiomyozyten aus dem LV. (Abbildung modifiziert nach Treskatsch, Dehe et al., 2015)



Abb. 17: Immunhistochemische Anfärbung von KOR und Dihydropyridin-Rezeptor (Ca_v1.2) 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion. Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden die Rattenherzen in vivo transkardial mit einer Fixationslösung perfundiert und daraufhin entnommen. Anschließend erfolgte zur Herstellung histologischer Gewebeschnitte die Einbettung des Myokards in einer Tissue-Tek-Lösung. Schließlich wurden die Gewebeschnitte auf Objektträgern in Gelatine eingefasst. Die Anfärbung der Zielstrukturen erfolgte mittels spezifischer Anti-körper. Rezeptoranfärbung: KOR (Texas red Immunfluoreszenz); Dihdydropyridin-Rezeptor (FITC green Immunfluoreszenz); Kolokalisation gelb dargestellt; Zellkerne blau (DAPI); Bal-ken=10 μ m. A-C Immunhistochemische Darstellung von KOR und Dihydropyridin-Rezeptor im insuffizienten Rattenmyokard 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion auf der Zellmembran und in T-Tubuli von Kardiomyozyten aus dem LV.

5.3.2 Immunhistochemische Anfärbung OR und RyR

Des Weiteren konnten intrazelluläre ORs auf der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums gezeigt werden. DOR ließ sich mikroskopisch in Kardiomyozyten des LV aus gesunden Rattenherzen nachweisen. Es zeigte sich eine Kolokalisation von DOR mit dem intrazellulären Ryanodin-Rezeptor auf der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (Abb. 18).

KOR ließ sich intrazellulär in Kardiomyzyten des LV gesunder Rattenherzen zeigen. Es ergab sich eine Kolokalisation von KOR mit dem Ryanodin-Rezeptor in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums im gesunden Rattenmyokard (Abb. 19).



Abb. 18: Immunhistochemische Anfärbung von DOR und Ryanodin-Rezeptor (RyR) in Kardiomyozyten des LV gesunder Rattenherzen. Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden die Rattenherzen in vivo transkardial mit einer Fixationslösung perfundiert und daraufhin entnommen. Anschließend erfolgte zur Herstellung histologischer Gewebeschnitte die Einbettung des Myokards in einer Tissue-Tek-Lösung. Schließlich wurden die Gewebeschnitte auf Objektträgern in Gelatine eingefasst. Die Anfärbung der Zielstrukturen erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Rezeptoranfärbung: DOR (Texas red Immunfluoreszenz); Ryanodin-Rezeptor (FITC green Immunfluoreszenz); Kolokalisation auf der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (gelb); Zellkerne blau (DAPI); Balken=10µm. A-C Immunhistochemische Darstellung von DOR und Ryanodin-Rezeptor im gesunden Rattenmyokard auf der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums von Kardiomyozyten des gesunden LV. (Abbildung modifiziert nach Treskatsch, Dehe et al., 2015)



Abb. 19: Immunhistochemische Anfärbung von KOR und Ryanodin-Rezeptor (RyR) in Kardiomyozyten des LV gesunder Rattenherzen. Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden die Rattenherzen in vivo transkardial mit einer Fixationslösung perfundiert und daraufhin entnommen. Anschließend erfolgte zur Herstellung histologischer Gewebeschnitte die Einbettung des Myokards in einer Tissue-Tek-Lösung. Schließlich wurden die Gewebeschnitte auf Objektträgern in Gelatine eingefasst. Die Anfärbung der Zielstrukturen erfolgte mittels spezifischer Antikörper.Rezeptoranfärbung: KOR (Texas red Immunfluoreszenz); Ryanodin-Rezeptor (FITC green Immunfluoreszenz); Kolokalisation auf der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (gelb); Zellkerne blau (DAPI); Balken=10µm. A-C Immunhistochemische Darstellung von KOR und Ryanodin-Rezeptor im gesunden Rattenmyokard auf der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums von Kardiomyozyten des gesunden LV.

Zusätzlich konnten DOR und der Ryanodin-Rezeptor in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums in Kardiomyozyten des LV 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion gezeigt werden (Abb. 20).

Eine intrazelluläre Kolokalisation von KOR mit dem Ryanodin-Rezeptor in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums ließ sich in Kardiomyozyten des LV 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion zeigen. (Abb. 21).



Abb. 20: Immunhistochemische Anfärbung von DOR und Ryanodin-Rezeptor (RyR) im LV 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion. Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden die Rattenherzen in vivo transkardial mit einer Fixationslösung perfundiert und daraufhin entnommen. Anschließend erfolgte zur Herstellung histologischer Gewebeschnitte die Einbettung des Myokards in einer Tissue-Tek-Lösung. Schließlich wurden die Gewebeschnitte auf Objektträgern in Gelatine eingefasst. Die Anfärbung der Zielstrukturen erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Rezeptoranfärbung: DOR (Texas red Immunfluoreszenz); Dihydropyridin-Rezeptor (FITC green Immunfluoreszenz); Kolokalisation auf der Zellmembran (gelb); Zellkerne blau (DAPI); Balken=10 μ m. A-C Immunhistochemische Darstellung von DOR und Ryanodin-Rezeptor im insuffizienten Rattenmyokard 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion auf der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums von Kardiomyozyten aus dem LV. (Abbildung modifiziert nach Treskatsch, Dehe et al., 2015)



Abb. 21: Immunhistochemische Anfärbung von KOR und Ryanodin-Rezeptor (RyR) im LV 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion. Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden die Rattenherzen in vivo transkardial mit einer Fixationslösung perfundiert und daraufhin entnommen. Anschließend erfolgte zur Herstellung histologischer Gewebeschnitte die Einbettung des Myokards in einer Tissue-Tek-Lösung. Schließlich wurden die Gewebeschnitte auf Objektträgern in Gelatine eingefasst. Die Anfärbung der Zielstrukturen erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Rezeptoranfärbung: KOR (Texas red Immunfluoreszenz); Dihydropyridin-Rezeptor (FITC green Immunfluoreszenz); Kolokalisation auf der Zellmembran (gelb); Zellkerne blau (DAPI); Balken=10µm. A-C Immunhistochemische Darstellung von KOR und Ryanodin-Rezeptor im insuffizienten Rattenmyokard 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion auf der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums von Kardiomyozyten aus dem LV.

5.3.3 Densitometrische Auswertung der OR-spezifischen Immunfluoreszenz

Die densitometrische Untersuchung der DOR-spezifischen Immunfluoreszenz im linken Ventrikel ergab einen signifikanten 1,5-fachen Anstieg der OID in herzinsuffizienten Ratten (ACF) im Vergleich mit gesunden Ratten (Abb. 22).



Abb. 22: Quantitative Bestimmung der DOR-spezifischen Immunfluoreszenz. Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden die Rattenherzen in vivo transkardial mit einer Fixationslösung perfundiert und daraufhin entnommen. Anschließend erfolgte zur Herstellung histologischer Gewebeschnitte die Einbettung des Myokards in einer Tissue-Tek-Lösung. Schließlich wurden die Gewebeschnitte auf Objektträgern in Gelatine eingefasst. Die Anfärbung der Zielstrukturen erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Zur quantitativen Bestimmung der ORspezifischen Immunfluoreszenz wurde die optisch integrierte Dichte (OID) bestimmt. Die OID der DOR-spezifischen Immunfluoreszenz zeigte einen signifikanten 1,5-fachen Anstieg im LV der ACF-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (Kontrolle=1, ACF=1,5; p<0,01). Angegebene Werte stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von 5 Ratten pro Gruppe dar (ACF: n=5; Kontrolle: n=5). (Abbildung modifiziert nach Treskatsch, Dehe et al., 2015)

In der densitometrischen Untersuchung der KOR-spezifischen Immunfluoreszenz im linken Ventrikel zeigte sich ein signifikanter 1,35-facher Anstieg der OID in herzinsuffizienten Ratten (ACF) im Vergleich zu gesunden Ratten (Abb. 23).



Abb. 23: Densitometrische Darstellung der KOR-spezifischen Immunfluoreszenz. Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden die Rattenherzen in vivo transkardial mit einer Fixationslösung perfundiert und daraufhin entnommen. Anschließend erfolgte zur Herstellung histologischer Gewebeschnitte die Einbettung des Myokards in einer Tissue-Tek-Lösung. Schließlich wurden die Gewebeschnitte auf Objektträgern in Gelatine eingefasst. Die Anfärbung der Zielstrukturen erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Zur quantitativen Bestimmung der ORspezifischen Immunfluoreszenz wurde die optisch integrierte Dichte (OID) bestimmt. Die OID der KOR-spezifischen Immunfluoreszenz zeigte einen signifikanten 1,35-fachen Anstieg im LV der ACF-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (Kontrolle=1, ACF=1,35; p<0,05). Angegebene Werte stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von 5 Ratten pro Gruppe dar (ACF: n=5; Kontrolle: n=5).

5.4 Ergebnisse Western Blot

Der quantitative Nachweis der Opioidrezeptoren (DOR, KOR) und ihrer endogenen Liganden (PENK, PDYN) erfolgte mittels Western Blot.

5.4.1 DOR

Mit Hilfe der Western Blot Methode konnten DOR-spezifische immunreaktive Banden (48 kDa) im linken Ventrikel (LV) des Rattenmyokards detektiert werden. Diese zeigten sich sowohl in operierten ACF-, als auch in Kontrolltieren (Abb. 24 A). Die densitometrische Auswertung der DOR-spezifischen Banden ergab einen signifikanten Anstieg der optisch integrierten Dichtemessung (OID) des DOR-Proteins im linken Ventrikel bei ACF-Tieren von $1,49 \pm 0,14$ im Gegensatz zu den Kontrolltieren (p=0,025) (Abb. 24 B).



Abb. 24: Nachweis DOR-spezifischer Banden im Western Blot. Der quantitative Nachweis von DOR erfolgte durch die Western-Blot-Methode mit Hilfe von markierten Antikörpern. Dazu wurden die Proteine des Myokards nach Homogenisation zunächst mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Daraufhin erfolgte die Anfärbung der Zielstrukturen mittels spezifischer Antikörper. A: Western Blot mit DOR-spezifischer Bande (48 kDa) und intrinsischer Kontrolle mittels GAPDH (37 kDa) im LV von ACF- und Kontrolltieren B: Die OID der DOR-spezifischen Banden zeigte einen signifikanten Anstieg im LV der ACF-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (Kontrolle=1, ACF=1,49 \pm 0,14; p<0,05). Angegebene Werte stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von 3 Ratten pro Gruppe dar (ACF: n=3; Kontrolle: n=3). (Abbildung modifiziert nach Treskatsch, Dehe et al., 2015)

5.4.2 PENK

Die immunreaktiven PENK-spezifischen Banden (28 kDa) ließen sich im LV von ACFund Kontrolltieren darstellen (Abb. 25 A). Die densitometrische Auswertung der PENKspezifischen Banden ergab einen signifikanten Anstieg der OID von PENK im linken Ventrikel bei ACF-Tieren von 1,45 \pm 0,17 im Gegensatz zu den Kontrolltieren (p=0,025) (Abb. 25 B).



Abb. 25: Nachweis PENK-spezifischer Banden im Western Blot. Der quantitative Nachweis von PENK erfolgte durch die Western-Blot-Methode mit Hilfe von markierten Antikörpern. Dazu wurden die Proteine des Myokards nach Homogenisation zunächst mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Daraufhin erfolgte die Anfärbung der Zielstrukturen mittels spezifischer Antikörper. A: Western Blot mit PENK-spezifischer Bande (28 kDa) und intrinsischer Kontrolle mittels GAPDH (37 kDa) im LV von ACF- und Kontrolltieren B: Die OID der PENK-spezifischen Banden zeigte einen signifikanten Anstieg im LV der ACF-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (Kontrolle=1, ACF=1,45 ± 0,17; p<0,05). Angegebene Werte stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von 3 Ratten pro Gruppe dar (ACF: n=3; Kontrolle: n=3). (Abbildung modifiziert nach Treskatsch, Dehe et al., 2015)

5.4.3 KOR

KOR-spezifische immunreaktive Banden stellten sich bei einem Molekulargewicht von 48 kDa im LV von ACF- und Kontrolltieren dar (Abb. 26 A). Die densitometrische Auswertung der KOR-spezifischen Banden ergab einen signifikanten Anstieg der OID von KOR im linken Ventrikel bei ACF-Tieren von $1,68 \pm 0,21$ im Gegensatz zu den Kontrolltieren (p=0,016) (Abb. 26 B).



Abb. 26: Nachweis KOR-spezifischer Banden im Western Blot. Der quantitative Nachweis von KOR erfolgte durch die Western-Blot-Methode mit Hilfe von markierten Antikörpern. Dazu wurden die Proteine des Myokards nach Homogenisation zunächst mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Daraufhin erfolgte die Anfärbung der Zielstrukturen mittels spezifischer Antikörper. A: Western Blot mit KOR-spezifischer Bande (48 kDa) und intrinsischer Kontrolle mittels GAPDH (37 kDa) im LV von ACF- und Kontrolltieren B: Die OID der KOR-spezifischen Banden zeigte einen signifikanten Anstieg im LV der ACF-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (Kontrolle=1, ACF=1,68 \pm 0,21; p<0,05). Angegebene Werte stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von 3 Ratten pro Gruppe dar (ACF: n=3; Kontrolle: n=3). (Abbildung modifiziert nach Treskatsch, Dehe et al., 2015)

5.4.4 PDYN

Abschließend wurden PDYN-spezifische immunreaktive Banden (36 kDa) im linken Ventrikel des Rattenmyokards detektiert. Diese stellten sich sowohl in operierten ACF-, als auch in Kontrolltieren dar (Abb. 27 A). Die densitometrische Auswertung der PDYN-spezifischen Banden ergab einen signifikanten Anstieg der OID des PDYN-Proteins im linken Ventrikel bei ACF-Tieren von 3,14 \pm 0,72 im Gegensatz zu den Kontrolltieren (p<0,05) (Abb.27 B).



Abb. 27: Nachweis PDYN-spezifischer Banden im Western Blot. Der quantitative Nachweis von PDYN erfolgte durch die Western-Blot-Methode mit Hilfe von markierten Antikörpern. Dazu wurden die Proteine des Myokards nach Homogenisation zunächst mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Daraufhin erfolgte die Anfärbung der Zielstrukturen mittels spezifischer Antikörper. A: Western Blot mit PDYN-spezifischer Bande (36 kDa) und intrinsischer Kontrolle mittels GAPDH (37 kDa) im LV von ACF- und Kontrolltieren B: Die OID der PDYN-spezifischen Banden zeigte einen signifikanten Anstieg im LV der ACF-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (Kontrolle=1, ACF=3,14 \pm 0,72; p<0,05). Angegebene Werte wurden mittels Mann-Whitney-U-Test erhoben und stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von 3 Ratten pro Gruppe dar (ACF: n=3; Kontrolle: n=3). (Abbildung modifiziert nach Treskatsch, Dehe et al., 2015)

6. Diskussion

In dieser Arbeit konnten OR-spezifische Membran-Bindungsstellen aller drei ORs (δ, κ, μ) im linken Ventrikel gesunder Ratten mittels Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien nachgewiesen werden. Dies wurde durch die immunhistochemische Anfärbung von DOR und KOR auf Kardiomyozyten des LV bestätigt. Zusätzlich konnte der Nachweis einer Kolokalisation der ORs mit dem plasmamembranständigen Dihydropyridin-Rezeptor (Cav1.2) und dem intrazellulären sarkoplasmatischen Ryanodin-Rezeptor erbracht werden. Im nächsten Schritt wurden adaptive Veränderungen des kardialen Opioidsystems im Verlauf einer chronischen kongestiven Herzinsuffizienz, induziert durch eine infrarenale, aortokavale Fistel untersucht. 28 \pm 2 Tage nach der ACF-Induktion zeigte sich eine relative Zunahme der DOR- und KOR-spezifischen Immunfluoreszenz. Western Blot Untersuchungen ergaben eine Hochregulation der DOR und KOR auf Proteinebene, sowie eine vermehrte Bildung der endogenen Opioidpeptide PENK und PDYN im Verlauf einer CHF. Diese Ergebnisse lassen auf eine Beeinflussung der pathophysiologischen Vorgänge durch das Deltaund Kappa-Opioidsystem im Verlauf einer kongestiven Herzinsuffizienz schließen.

Der Nachweis membrangebundener ORs (DOR, KOR, MOR) gelang mit Hilfe von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien. In dieser Arbeit konnten zur Komplettierung bisheriger Studien DOR-, KOR-, und MOR- spezifische Membran-Bindungsstellen im LV mittels [³H]Naltrindole, [³H]U69,593, [³H]DAMGO nachgewiesen werden. Bisherige Studien haben bereits DOR-spezifische Bindungsstellen in den Vorhöfen neonataler Rattenherzen (26) sowie KOR-spezifische Bindungsstellen in atrialem und ventrikulärem Myokard (96) gezeigt. Im Gegensatz zur bisherigen Annahme konnten in dieser Arbeit MORspezifische Bindungsstellen nachgewiesen werden (48,49). Im Vergleich mit DOR und KOR erreichten sie allerdings nicht deren B_{max}- und K_d-Werte.

Zum Vergleich wurden die Opioidrezeptoren in Gehirn und Rückenmark der Ratte pharmakologisch charakterisiert. Das Vorkommen von MOR, KOR und DOR in Gehirn und Rückenmark der Ratte ist seit langem gut dokumentiert (97,98). Da diese Gewebe bekanntermaßen eine hohe Dichte an Opioidrezeptoren haben, konnte mit geringerem Aufwand die Menge und die Affinität der ORs bestimmt werden (99).

Wir konnten zeigen, dass der Ligand [³H]Naltrindole mit einer hohen Affinität (K_d) an die DOR-spezifischen Bindungsstellen der Gehirn-Membranfraktionen gebunden wurde. Vorherige Studien unterstreichen unsere Ergebnisse im Hinblick auf die Affinität von [³H]Naltrindole zu DOR im gesamten Hirngewebe (100). KOR wurde mittels des radioaktiven Liganden [³H]U69,593 nachgewiesen (101) und pharmakologisch charakterisiert. Zur Untersuchung von MOR-spezifischen Bindungsstellen in den Gehirn-Membranfraktionen wurde [³H]DAMGO eingesetzt. Bekanntermaßen eignete sich [³H]DAMGO für die Ermittlung MOR-spezifischer Bindungsstellen (102). Die maximale Anzahl der OR-spezifischen Bindungsstellen im LV war im Vergleich mit den ORspezifischen Bindungsstellen in Gehirn und Rückenmark deutlich erniedrigt. Ebenso zeigte sich eine verringerte Rezeptoraffinität der ORs im LV im nanomolaren Bereich.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung zeigten das Vorkommen von DOR und KOR auf Myozyten des linken Ventrikels von gesunden Ratten durch eine immunhistochemische Anfärbung. Der erste immunhistochemische Nachweis von DOR im Myokard gelang auf synaptischen Nervenendigungen im rechten Atrium und Sinusknoten von Hunden (42). Des Weiteren ließ sich eine Kolokalisation von DOR und KOR mit dem zellmembranständigen Dihydropyridin-Rezeptor (Cav1.2) auf der äußeren Kardiomyozytenmembran und der T-Tubuli feststellen. Diese Ergebnisse werden von vorangegangenen Studien gestützt. In diesen konnte bereits gezeigt werden, dass G-Proteingekoppelte-Rezeptoren in T-Tubuli in der Nähe des Sarkoplasmatischen Retikulums im Myozyten vorkommen¹⁰³. Vor kurzem gelang zudem der immunhistochemische Nachweis von DOR und KOR auf der Kardiomyozytenoberfläche des LV von Schweinen (104) und Menschen (105). Der Dihydropyridin-Rezeptor kommt sowohl in der Zellmembran auf der Myozytenoberfläche, als auch in Membraneinstülpungen, den sogenannten T-Tubuli (106,107) vor. T-Tubuli sind Einstülpungen des Sarkolemms, die als anastomosierendes Kanalsystem die Muskelfaser durchsetzen (108). Die Kontakte zwischen Sarkoplasmatischem Retikulum und den T-Tubuli bilden kurze Diaden (ein SR-Schlauch + ein T-Tubulus). Die T-Tubuli leiten ein eingehendes Aktionspotenzial zum SR weiter und initiieren die Ca²⁺-Freisetzung über den DiR. Die erhöhte Calciumkonzentration führt dann wiederum zur Öffnung des sarkoplasmatischen Ryanodin-Rezeptors und es kommt zu einem starken Ca²⁺-Anstieg innerhalb weniger Millisekunden und zur Muskelkontraktion (109).

Die zur Detektion mittels Antikörper benutzte α 2-Untereinheit des Dihydropyridin-Rezeptors ist ein großes Glykoprotein, das sich besonders im Herzmuskel gut darstellen lässt (110).

Zusätzlich zeigte sich interessanterweise die Kolokalisation von DOR und KOR mit dem intrazellulären Ryanodin-Rezeptor. Der Ryanodin-Rezeptor ist bekannt für seine intrazelluläre Lage in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums (111). Dort kommen RyR in der diadischen Spalte zwischen SR und T-Tubulus vor. Gemeinsam dienen der DiR und der RyR wie bereits beschrieben zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration mit einhergehender Muskelkontraktion. Der intrazelluläre Nachweis von ORs konnte außerdem bereits auf der Membran des Zellkerns von Kardiomyozyten gezeigt werden (112). Die hier dargestellten Ergebnisse stellen eine Erweiterung bisherigen Wissens über die exakte Lokalisation der ORs durch die Kolokalisation mit DiR und RyR auf und in Myozyten dar. Zur Verdeutlichung der Kolokalisation von DOR/KOR und Dihydropyridin-Rezeptor in der Zellmembran und der Kolokalisation von DOR/KOR und Ryanodin-Rezeptor in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums in einer Herzmuskelzelle soll die folgende Abbildung dienen (Abb. 28).

Um Veränderungen des kardialen Opioidsystems im Verlauf einer chronischen kongestiven Herzinsuffizienz zu erkennen, wurde ein experimentelles Modell zur reproduzierbaren Entwicklung einer biventrikulären Volumenüberladung, induziert durch eine infrarenale, aortokavale Fistel angewendet. Mit Hilfe dieses zuverlässigen Verfahrens, ließ sich die zügige Entwicklung einer chronischen kongestiven Herzinsuffizienz innerhalb von 28 ± 2 Tagen nach ACF-Induktion mittels einer 16G-Nadel sicherstellen. Dieses Modell steht im Gegensatz zu einer älteren Technik von Garcia und Diebold, bei dem eine 18G-Nadel zur Erzeugung einer volumen-induzierten Herzinsuffizienz benutzt wurde (92). Bei einer ACF-Induktion mit einer 18G-Nadel zeigte sich in verschiedenen Studien allerdings eine unregelmäßige Entwicklung einer CHF nach 8-10 Wochen (113-115). Durch Verwendung der 16G-Nadel konnte ein deutlich höherer Blutfluss durch die ACF erreicht werden. Mit dem erhöhten Blutfluss ging eine Geschwindigkeitszunahme der pathophysiologischen Prozesse einher, die in eine chronische kongestive Herzinsuffizienz mündeten (91).



Abb. 28: Schematische Darstellung der Lokalisation von Opioidrezeptoren, Dihydropyridin- und Ryanodin-Rezeptor im Rattenmyozyt. Dargestellt ist eine Kolokalisation von DOR/KOR und Dihydropyridin-Rezeptor in der Zellmembran und eine Kolokalisation von DOR/KOR und Ryanodin-Rezeptor in der Membran des Sarkoplasmatischen Retikulums in einer Herzmuskelzelle. Zeichnung: Christine Voigts, Zentrale Mediendienstleistungen, Charité Universitätsmedizin Berlin. (Abbildung modifiziert nach Treskatsch, Dehe et al., 2015)

Bei der Eröffnung des Thorax und der Bauchhöhle zeigte sich ein deutlich vergrößertes Herz, sowie deutlich vergrößerte Lungenflügel. Die Herz- und Lungen-/Körpergewicht-Indices zeigten darüber hinaus nahezu eine Verdopplung in der Gruppe der ACF-Tiere (87). Dies wies auf die Entwicklung einer schweren chronischen kongestiven Herzinsuffizienz mit pulmonaler Beteiligung hin. Diese Ergebnisse wurden von bisherigen Studien gestützt, in denen unter anderem ein Lungengewicht von >2500 mg (114,116), sowie ein Herz-Index >5,0 mg/g KG (116,117) zur Charakterisierung einer chronischen kongestiven Herzinsuffizienz herangezogen wurden.

Zum Zeitpunkt der Organentnahme wurden mittels Druck-Volumen-Katheter zusätzlich hämodynamische Daten erhoben. Wie bereits oben beschrieben handelt sich bei der Herzinsuffizienz um eine dynamische, fortschreitende Erkrankung.

Deshalb war die detaillierte Bestimmung kardialer Funktionsparameter zur Charakterisierung des Grades der Herzinsuffizienz ein wichtiges Kriterium zur korrekten Interpretation der resultierenden Daten. Zum Beweis, dass der definierte Endpunkt "chronische kongestive Herzinsuffizienz" 28 ± 2 Tagen nach ACF-Induktion erreicht wurde, musste der Übergang von einer kompensierten Herzinsuffizienz mit exzentrischer Hypertrophie und erhaltener Pumpfunktion in eine dekompensierte kongestive Herzinsuffizienz mit dilatativer Hypertrophie und verminderter Pumpfunktion dokumentiert werden (113,115,118,119).

Der Druck-Volumen-Katheter gilt als der aktuelle Goldstandard zur hämodynamischen Vermessung kardialer Veränderungsprozesse. In einigen Studien wurden bereits hämodynamische Parameter mittels des Druck-Volumen-Katheters erhoben, um adaptive Veränderungen des Herzen aufgrund eines Myokardinfarkts (120) oder einer Volumenüberlastung (121) zu zeigen. Hämodynamische Kriterien zur Definition der chronischen kongestiven Herzinsuffizienz konnten bereits in vorherigen Studien definiert werden: LVEDV>550 µl (113), ZVD>4 mmHg (117). Zusätzlich wurden die für das Modell etablierten hämodynamischen Parameter zur Evaluation herangezogen (91).

Neben der Darstellung der ORs im linken Ventrikel gesunder Ratten konnten in dieser Arbeit darüber hinaus DOR und KOR auf Myozyten von herzinsuffizienten Ratten gezeigt werden. Hinsichtlich Veränderungen der ORs 28 \pm 2 Tage nach ACF-Induktion zeigte sich eine signifikante Zunahme der OID der DOR- und KOR-spezifischen Immunfluoreszenz im linken Ventrikel.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbung wurden mittels Western Blot weiter untersucht. Dabei zeigte sich, dass immunreaktive OR-spezifische Banden im Rattenmyokard nachgewiesen werden konnten. In vorangegangenen Studien konnten so bereits DOR und KOR im Myokard von Schweinen (104) und Hamstern (122) detektiert werden. Im linken Ventrikel des Rattenmyokards 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion ergab die densitometrische Auswertung einen signifikanten Anstieg der OID der DOR-spezifischen Banden im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Die Auswertung der PENK-spezifischen Banden stellte einen signifikanten Anstieg der OID des PENK-Proteins im LV der ACF-Tiere 28 \pm 2 Tage nach ACF-Induktion gegenüber den Kontrolltieren heraus.

Dies wird von weiteren Studien bestätigt, in denen Enkephalin im Myokard von Menschen, Ratten und Mäusen nachgewiesen wurde (123,124). In diesem Zusammenhang wurden bereits Untersuchungen zur mRNA-Bildung mittels RT-PCR durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression sowohl von DOR, als auch von dessen endogenen Liganden PENK, in dem verwendeten Modell zur Erzeugung einer chronischen kongestiven Herzinsuffizienz signifikant ansteigt (87). Dies wird von einer Studie unterstützt, die eine erhöhte Bildung von Met-Enkephalin in herzinsuffizienten Hunden zeigt (125). Des Weiteren wird von einer Erhöhung des ventrikulären Methionin-Enkephalins in einer Studie mit einer Herzhypertrophie aufgrund einer Angiotensin II-Überexpression berichtet (126). Zusätzlich zeigte sich eine Erhöhung des Plasma-Spiegels von
ß-Endorphin bei Patienten mit einer chronischen kongestiven Herzinsuffizienz (127). KOR-spezifische Banden zeigten einen signifikanten Anstieg der OID des KOR-Proteins im LV 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion gegenüber den Kontrolltieren (Abb. 25). Ebenso zeigte sich 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion ein signifikanter Anstieg der PDYN-spezifischen-Banden (Abb. 26). Eine Studie zeigte bereits, dass Kappa-ORmRNA- und Proteinlevel im Rahmen eines Ischämie-Reperfusion-Tiermodells im Herzen von Ratten hochreguliert wurden (128). Im Rahmen einer Kardiomyopathie zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der PDYN-mRNA und des PDYN-Peptids in ventrikulären Myozyten von Hamstern (129,130).

Die Aktivierung des kardialen Opioidsystems wird durch diese Arbeit im Verlauf einer CHF untermauert. Die immunhistochemische Untersuchung zeigte eine relative Erhöhung der Expression von DOR und KOR. Dies wurde durch die Ergebnisse der Western Blots bestätigt. Ergänzend konnte eine verstärkte Bildung der endogenen Opioidliganden PENK und PDyn im Verlauf einer CHF gezeigt werden.

Liang et al. konnten zeigen, dass eine erhöhte Aktivität des endogenen Opioidsystems in einem Tiermodell zur chronischen kongestiven Herzinsuffizienz in Hunden die sympathische Aktivierung limitiert und die kardiale Funktion verbessert (131). Interessanterweise wurden diese kardialen Effekte durch Blockade des adrenergen Systems aufgehoben. Dies deutet auf eine Interaktion des adrenergen Systems und des Opioidsystems hin. Eine weitere Studie konnte darüber hinaus eine Verbesserung der linksventrikulären Kontraktilität nach Applikation eines OR-Antagonisten in einem Herzinsuffizienz-Modell mit Hunden zeigen (125). Dies wurde dadurch unterstützt, dass der OR-Antagonist Naloxon die hämodynamische Situation und die myokardiale Kontraktilität in einem Modell der pacing-induzierten kongestiven Herzinsuffizienz in Hunden verbesserte (132). Die Blockade des Opioidsystems mit dem OR-Antagonisten Sudie Naltrexone führte ebenfalls zu einer reduzierten adrenergen Antwort in Bezug auf eine Studie zur chronischen kongestiven Herzinsuffizienz bei Hunden (133).

Die hier dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass eine funktionelle Verknüpfung zwischen dem kardialen Opioidsystem und der calcium-induzierten Kontraktion des Herzens besteht. Die enge Kolokalisation von DOR und KOR mit dem zellmembranständigen DiR und dem sarkoplasmatischen RyR stellt einen Hinweis auf eine G-Protein-gekoppelte Modulation der Calciumhomöostase der Kardiomyozyten durch das Opioidsystem dar. Eine neue Studie hat in diesem Zusammenhang gezeigt, dass es im Verlauf einer CHF zu einer Dysfunktion der Kardiomyozyten durch eine Veränderung der Ca²⁺-Homöostase kommt (134). Die kardiale Kontraktilität war 10 Wochen nach der Induktion der CHF stark vermindert. Zusätzlich zeigte sich eine verminderte zytosolische Ca²⁺-Konzentration im Verlauf eines Aktionspotenzials [Ca²⁺], und eine verminderter Ca²⁺-Gehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums. Interessanterweise kam es zu einer reduzierten Expression des RyR 10 Wochen nach Induktion der CHF, eine Reduktion der DiR Expression zeigte sich hingegen nicht. Weitere Studien konnten eine verminderte Expression von L-Typ-Calciumkanälen oder eine Änderung der Kanalisoform im insuffizienten menschlichen Myokard zeigen. Diese Veränderungen gingen wiederum mit einer Reduzierung der zytosolischen Calcium-Konzentration [Ca²⁺]_i einher (135,136). Auch die Regulation des Calciumgehalts des Sarkoplasmatischen Retikulums war bereits Gegenstand der Forschung. Beispielsweise zeigte sich eine reduzierte Calciumkonzentration [Ca²⁺]_i in insuffizienten Rattenkardiomyozyten auf Grund einer verminderten Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR (137). Auswirkungen einer Aktivierung von Opioidrezeptoren auf die Calcium-Homöostase konnten bereits in verschiedenen früheren Studien gezeigt werden.

Zum Beispiel führte die Aktivierung von DOR durch Leucin-Enkephalin in isolierten Rattenkardiomyozyten zu einer verminderten Calciumkonzentration [Ca²⁺]_i und Kontraktionsfähigkeit durch Inhibition des DiR (138). Außerdem zeigte sich eine Beeinflussung des Calciumgehalts des Sarkoplasmatischen Retikulums (48), sowie ein Verminderung der Calcium-induzierten Stimulierbarkeit der Myofilamete durch Aktivierung des DOR (139).

Auch die Aktivierung von KOR zeigt inhibitorische Effekte auf die Kontraktilität des Myokards durch Abbau der zytosolischen Calciumkonzentration durch das SR (140). Des Weiteren führte die Aktivierung von KOR zu einer verminderten [Ca²⁺]_i in Myozyten des LV von Hamstern (122).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit OR-spezifische Membranbindungsstellen von DOR, KOR, und MOR im Myokard des LV von Ratten gezeigt werden. Des Weiteren wurde mittels immunhistochemischer Anfärbung eine Kolokalisation von DOR und KOR mit dem L-Typ Calciumkanal Dihydropyridin-Rezeptor auf der äußeren Zellmembran und den T-Tubuli von Kardiomyozyten nachgewiesen. Darüber hinaus zeigte sich eine Kolokalisation von DOR und KOR mit dem intrazellulären Ryanodin-Rezeptor auf der Membran des Sarcoplasmatischen Retikulums. Im Verlauf einer kongestiven Herzinsuffizienz kam es zu einer Hochregulierung des kardialen Opioidsystems. Dies äußerte sich durch eine vermehrte Expression der Opioidrezeptoren DOR und KOR und ihren endogenen Liganden PENK und PDYN. Dies legt die Vermutung nahe, dass das kardiale Opioidsystem eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellfunktion und der Calciumhomöostase, besonders im Rahmen einer Herzinsuffizienz, spielt. In Erweiterung dieser Arbeit soll die funktionelle Bedeutung der Hochregulation des kardialen Opiatsystems untersucht werden. Dazu soll die Auswirkung einer chronischen Naltrexon-Therapie auf die kardiale Funktion in diesem experimentellen Herzinsuffizienzmodell evaluiert werden. Präliminäre Ergebnisse lassen bereits auf eine verbesserte kardiale Funktion durch Blockade des endogenen Opiatsystems im Verlauf einer chronischen kongestiven Herzinsuffizienz schließen.

67

7. Literaturverzeichnis

1 Benyhe, S. Morphine: new aspects in the study of an ancient compound. *Life sciences* 55, 969-979 (1994).

2 Klockgether-Radke, A. P. [F. W. Serturner and the discovery of morphine. 200 years of pain therapy with opioids]. *Anasthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS* 37, 244-249, doi:10.1055/s-2002-30132 (2002).

3 Brennan, F., Carr, D. B. & Cousins, M. The role of opioids in pain management. *Anesthesia and analgesia* 105, 1865-1866; author reply 1866, doi:10.1213/01.ane.0000295243.31253.e9 (2007).

4 Stein, C., Schafer, M. & Machelska, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nature medicine* 9, 1003-1008, doi:10.1038/nm908 (2003).

5 Dores, R. M., Lecaude, S., Bauer, D. & Danielson, P. B. Analyzing the evolution of the opioid/orphanin gene family. *Mass spectrometry reviews* 21, 220-243, doi:10.1002/mas.10029 (2002).

6 Evans, C. J., Keith, D. E., Jr., Morrison, H., Magendzo, K. & Edwards, R. H. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258, 1952-1955 (1992).

7 Kieffer, B. L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C. & Hirth, C. G. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 12048-12052 (1992).

8 Minami, M. *et al.* Cloning and expression of a cDNA for the rat kappaopioid receptor. *FEBS letters* 329, 291-295 (1993).

9 Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, J. A. & Yu, L. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Molecular pharmacology* 44, 8-12 (1993).

10 Nishi, M., Takeshima, H., Fukuda, K., Kato, S. & Mori, K. cDNA cloning and pharmacological characterization of an opioid receptor with high affinities for kappasubtype-selective ligands. *FEBS letters* 330, 77-80 (1993).

11 Yasuda, K. *et al.* Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 6736-6740 (1993).

12 Wang, J. B. *et al.* cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS letters* 348, 75-79 (1994).

13 Chaturvedi, K., Christoffers, K. H., Singh, K. & Howells, R. D. Structure and regulation of opioid receptors. *Biopolymers* 55, 334-346, doi:10.1002/1097-0282(2000)55:4<334::AID-BIP1006>3.0.CO;2-S (2000).

14 Mollereau, C. *et al.* ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS letters* 341, 33-38 (1994).

15 Bunzow, J. R. *et al.* Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS letters* 347, 284-288 (1994).

16 Donica, C. L., Awwad, H. O., Thakker, D. R. & Standifer, K. M. Cellular mechanisms of nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) peptide (NOP) receptor regulation and heterologous regulation by N/OFQ. *Molecular pharmacology* 83, 907-918, doi:10.1124/mol.112.084632 (2013).

17 Befort, K., Mattei, M. G., Roeckel, N. & Kieffer, B. Chromosomal localization of the delta opioid receptor gene to human 1p34.3-p36.1 and mouse 4D bands by in situ hybridization. *Genomics* 20, 143-145 (1994).

18 Yasuda, K., Espinosa, R., 3rd, Takeda, J., Le Beau, M. M. & Bell, G. I. Localization of the kappa opioid receptor gene to human chromosome band 8q11.2. *Genomics* 19, 596-597, doi:10.1006/geno.1994.1117 (1994).

19 Pasternak, G. W. & Pan, Y. X. Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacological reviews* 65, 1257-1317, doi:10.1124/pr.112.007138 (2013).

20 Meunier, J., Mouledous, L. & Topham, C. M. The nociceptin (ORL1) receptor: molecular cloning and functional architecture. *Peptides* 21, 893-900 (2000).

21 Pradhan, A. A., Smith, M. L., Kieffer, B. L. & Evans, C. J. Ligand-directed signalling within the opioid receptor family. *British journal of pharmacology* 167, 960-969, doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02075.x (2012).

22 Connor, M. & Christie, M. D. Opioid receptor signalling mechanisms. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 26, 493-499 (1999).

23 Stein, C. Opioid Receptors. *Annual review of medicine*, doi:10.1146/annurev-med-062613-093100 (2015).

24 Oeltjenbruns, J. & Schafer, M. Peripheral opioid analgesia: clinical applications. *Current pain and headache reports* 9, 36-44 (2005).

25 Chu, L. F., Angst, M. S. & Clark, D. Opioid-induced hyperalgesia in humans: molecular mechanisms and clinical considerations. *The Clinical journal of pain* 24, 479-496, doi:10.1097/AJP.0b013e31816b2f43 (2008).

26 Mousa, S. A. *et al.* Developmental expression of delta-opioid receptors during maturation of the parasympathetic, sympathetic, and sensory innervations of the neonatal heart: early targets for opioid regulation of autonomic control. *The Journal of comparative neurology* 519, 957-971, doi:10.1002/cne.22560 (2011).

27 Mousa, S. A., Bopaiah, C. P., Richter, J. F., Yamdeu, R. S. & Schafer, M. Inhibition of inflammatory pain by CRF at peripheral, spinal and supraspinal sites: involvement of areas coexpressing CRF receptors and opioid peptides. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 32, 2530-2542, doi:10.1038/sj.npp.1301393 (2007).

28 Mousa, S. A. *et al.* Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. *Brain : a journal of neurology* 130, 502-513, doi:10.1093/brain/awl330 (2007).

29 Headrick, J. P., Pepe, S. & Peart, J. N. Non-analgesic effects of opioids: cardiovascular effects of opioids and their receptor systems. *Current pharmaceutical design* 18, 6090-6100 (2012).

30 Krajnik, M. *et al.* Local pulmonary opioid network in patients with lung cancer: a putative modulator of respiratory function. *Pharmacological reports : PR* 62, 139-149 (2010).

31 Verma-Gandhu, M., Verdu, E. F., Cohen-Lyons, D. & Collins, S. M. Lymphocyte-mediated regulation of beta-endorphin in the myenteric plexus. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 292, G344-348, doi:10.1152/ajpgi.00318.2006 (2007).

32 Van Ree, J. M. *et al.* Endogenous opioids and reward. *European journal of pharmacology* 405, 89-101 (2000).

33 Trescot, A. M., Datta, S., Lee, M. & Hansen, H. Opioid pharmacology. *Pain physician* 11, S133-153 (2008).

34 Zabel, B. U., Naylor, S. L., Sakaguchi, A. Y., Bell, G. I. & Shows, T. B. High-resolution chromosomal localization of human genes for amylase, proopiomelanocortin, somatostatin, and a DNA fragment (D3S1) by in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 6932-6936 (1983).

35 Litt, M. *et al.* Chromosomal localization of the human proenkephalin and prodynorphin genes. *American journal of human genetics* 42, 327-334 (1988).

36 Meunier, J. C. *et al.* Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377, 532-535, doi:10.1038/377532a0 (1995).

37 Mollereau, C. *et al.* Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8666-8670 (1996).

38 Ling, N., Burgus, R. & Guillemin, R. Isolation, primary structure, and synthesis of alpha-endorphin and gamma-endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 3942-3946 (1976).

39 Chang, A. C., Cochet, M. & Cohen, S. N. Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 4890-4894 (1980).

40 Noda, M. *et al.* Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene. *Nature* 297, 431-434 (1982).

41 Horikawa, S. *et al.* Isolation and structural organization of the human preproenkephalin B gene. *Nature* 306, 611-614 (1983).

42 Deo, S. H., Barlow, M. A., Gonzalez, L., Yoshishige, D. & Caffrey, J. L. Cholinergic location of delta-opioid receptors in canine atria and SA node. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 294, H829-838, doi:10.1152/ajpheart.01141.2007 (2008).

43 Mousa, S. A. *et al.* Identification of mu- and kappa-opioid receptors as potential targets to regulate parasympathetic, sympathetic, and sensory neurons within rat intracardiac ganglia. *The Journal of comparative neurology* 518, 3836-3847, doi:10.1002/cne.22427 (2010).

44 Starke, K., Schoffel, E. & Illes, P. The sympathetic axons innervating the sinus node of the rabbit possess presynaptic opioid kappa- but not mu- or delta-receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 329, 206-209 (1985).

45 Farias, M., Jackson, K., Yoshishige, D. & Caffrey, J. L. Bimodal deltaopioid receptors regulate vagal bradycardia in canine sinoatrial node. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 285, H1332-1339, doi:10.1152/ajpheart.00353.2003 (2003).

46 Headrick, J. P., See Hoe, L. E., Du Toit, E. F. & Peart, J. N. Opioid Receptors and Cardioprotection - 'Opioidergic Conditioning' of the Heart. *British journal of pharmacology*, doi:10.1111/bph.13042 (2014).

47 Zimlichman, R. *et al.* Expression of opioid receptors during heart ontogeny in normotensive and hypertensive rats. *Circulation* 93, 1020-1025 (1996).

48 Ventura, C., Spurgeon, H., Lakatta, E. G., Guarnieri, C. & Capogrossi, M. C. Kappa and delta opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca2+ release from an intracellular pool in myocytes and neurons. *Circulation research* 70, 66-81 (1992).

49 Wittert, G., Hope, P. & Pyle, D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochemical and biophysical research communications* 218, 877-881, doi:10.1006/bbrc.1996.0156 (1996).

50 Villemagne, P. S., Dannals, R. F., Ravert, H. T. & Frost, J. J. PET imaging of human cardiac opioid receptors. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 29, 1385-1388, doi:10.1007/s00259-002-0897-z (2002).

51 Barron, B. A. Cardiac opioids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine 224, 1-7 (2000).

52 Caffrey, J. L. *et al.* Aging, cardiac proenkephalin mRNA and enkephalin peptides in the Fisher 344 rat. *Journal of molecular and cellular cardiology* 26, 701-711, doi:10.1006/jmcc.1994.1085 (1994).

53 Howells, R. D., Kilpatrick, D. L., Bailey, L. C., Noe, M. & Udenfriend, S. Proenkephalin mRNA in rat heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 1960-1963 (1986).

54 Karlsson, L. O. *et al.* Dose-dependent cardioprotection of enkephalin analogue Eribis peptide 94 and cardiac expression of opioid receptors in a porcine model of ischaemia and reperfusion. *European journal of pharmacology* 674, 378-383, doi:10.1016/j.ejphar.2011.11.012 (2012).

55 Romano, M. A., McNish, R., Seymour, E. M., Traynor, J. R. & Bolling, S. F. Differential effects of opioid peptides on myocardial ischemic tolerance. *The Journal of surgical research* 119, 46-50, doi:10.1016/j.jss.2004.01.006 (2004).

56 Chang, M. C. *et al.* Myocardial and peripheral concentrations of betaendorphin before and following myocardial ischemia and reperfusion during coronary angioplasty. *Japanese heart journal* 45, 365-371 (2004).

57 Romano, M. A., Seymour, E. M., Berry, J. A., McNish, R. A. & Bolling, S. F. Relative contribution of endogenous opioids to myocardial ischemic tolerance. *The Journal of surgical research* 118, 32-37, doi:10.1016/j.jss.2003.12.006 (2004).

58 Schultz, J. E. & Gross, G. J. Opioids and cardioprotection. *Pharmacology* & *therapeutics* 89, 123-137 (2001).

59 Murry, C. E., Jennings, R. B. & Reimer, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124-1136 (1986).

60 Ovize, M., Thibault, H. & Przyklenk, K. Myocardial conditioning: opportunities for clinical translation. *Circulation research* 113, 439-450, doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300764 (2013).

61 Shi, W. & Vinten-Johansen, J. Endogenous cardioprotection by ischaemic postconditioning and remote conditioning. *Cardiovascular research* 94, 206-216, doi:10.1093/cvr/cvs088 (2012).

62 Gross, G. J. Role of opioids in acute and delayed preconditioning. *Journal of molecular and cellular cardiology* 35, 709-718 (2003).
63 Peart, J. N., Patel, H. H. & Gross, G. J. Delta-opioid receptor activation mimics ischemic preconditioning in the canine heart. *Journal of cardiovascular pharmacology* 42, 78-81 (2003).

64 Wu, G. *et al.* kappa-Opioid receptor stimulation inhibits augmentation of Ca(2+) transient and hypertrophy induced by isoprenaline in neonatal rat ventricular myocytes - Role of CaMKIIdelta(B). *European journal of pharmacology* 595, 52-57, doi:10.1016/j.ejphar.2008.07.059 (2008).

65 Wang, G. Y., Wu, S., Pei, J. M., Yu, X. C. & Wong, T. M. Kappa- but not delta-opioid receptors mediate effects of ischemic preconditioning on both infarct and arrhythmia in rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 280, H384-391 (2001).

66 Rong, F. *et al.* Myocardial apoptosis and infarction after ischemia/reperfusion are attenuated by kappa-opioid receptor agonist. *Archives of medical research* 40, 227-234, doi:10.1016/j.arcmed.2009.04.009 (2009).

67 Jang, Y. *et al.* Postconditioning prevents reperfusion injury by activating delta-opioid receptors. *Anesthesiology* 108, 243-250, doi:10.1097/01.anes.0000299437.93898.4a (2008).

68 Zatta, A. J. *et al.* Evidence that cardioprotection by postconditioning involves preservation of myocardial opioid content and selective opioid receptor activation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 294, H1444-1451, doi:10.1152/ajpheart.01279.2006 (2008).

69 McMurray, J. J. *et al.* ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European journal of heart failure* 14, 803-869, doi:10.1093/eurjhf/hfs105 (2012).

70 Mosterd, A. & Hoes, A. W. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 93, 1137-1146, doi:10.1136/hrt.2003.025270 (2007).

71 Ho, K. K., Pinsky, J. L., Kannel, W. B. & Levy, D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *Journal of the American College of Cardiology* 22, 6A-13A (1993).

72 McMurray, J. J. Clinical practice. Systolic heart failure. *The New England journal of medicine* 362, 228-238, doi:10.1056/NEJMcp0909392 (2010).

73 Hogg, K., Swedberg, K. & McMurray, J. Heart failure with preserved left ventricular systolic function; epidemiology, clinical characteristics, and prognosis. *Journal of the American College of Cardiology* 43, 317-327, doi:10.1016/j.jacc.2003.07.046 (2004).

74 Paulus, W. J. *et al.* How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *European heart journal* 28, 2539-2550, doi:10.1093/eurheartj/ehm037 (2007).

75 Vasan, R. S. *et al.* Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort. *Journal of the American College of Cardiology* 33, 1948-1955 (1999).

76 Aurigemma, G. P. & Gaasch, W. H. Clinical practice. Diastolic heart failure. *The New England journal of medicine* 351, 1097-1105, doi:10.1056/NEJMcp022709 (2004).

77 Westerhof, N. & O'Rourke, M. F. Haemodynamic basis for the development of left ventricular failure in systolic hypertension and for its logical therapy. *Journal of hypertension* 13, 943-952 (1995).

78 Francis, G. S., Goldsmith, S. R., Levine, T. B., Olivari, M. T. & Cohn, J. N. The neurohumoral axis in congestive heart failure. *Annals of internal medicine* 101, 370-377 (1984).

79 Chaggar, P. S., Malkin, C. J., Shaw, S. M., Williams, S. G. & Channer, K. S. Neuroendocrine effects on the heart and targets for therapeutic manipulation in heart failure. *Cardiovascular therapeutics* 27, 187-193, doi:10.1111/j.1755-5922.2009.00094.x (2009).

80 Cohn, J. N. *et al.* Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *The New England journal of medicine* 311, 819-823, doi:10.1056/NEJM198409273111303 (1984).

81 George, J., Struthers, A. D. & Lang, C. C. Modulation of the reninangiotensin-aldosterone system in heart failure. *Current atherosclerosis reports* 16, 403, doi:10.1007/s11883-014-0403-7 (2014).

82 Rea, M. E. & Dunlap, M. E. Renal hemodynamics in heart failure: implications for treatment. *Current opinion in nephrology and hypertension* 17, 87-92, doi:10.1097/MNH.0b013e3282f357da (2008).

83 Jessup, M. & Brozena, S. Heart failure. *The New England journal of medicine* 348, 2007-2018, doi:10.1056/NEJMra021498 (2003).

84 Kerckhoffs, R. C., Omens, J. & McCulloch, A. D. A single strain-based growth law predicts concentric and eccentric cardiac growth during pressure and volume overload. *Mechanics research communications* 42, 40-50, doi:10.1016/j.mechrescom.2011.11.004 (2012).

85 Chatterjee, K. Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin. *The American journal of cardiology* 95, 8B-13B, doi:10.1016/j.amjcard.2005.03.003 (2005).

86 Palazzuoli, A. & Nuti, R. Heart failure: pathophysiology and clinical picture. *Contributions to nephrology* 164, 1-10, doi:10.1159/000313714 (2010).

87 Treskatsch, S. *et al.* Cellular localization and adaptive changes of the cardiac delta opioid receptor system in an experimental model of heart failure in rats. *Heart and vessels*, doi:10.1007/s00380-014-0620-6 (2015).

88 Treskatsch, S. *et al.* Upregulation of the kappa opioidergic system in left ventricular rat myocardium in response to volume overload: Adaptive changes of the cardiac kappa opioid system in heart failure. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 102, 33-41, doi:10.1016/j.phrs.2015.09.005 (2015).

89 Motulsky, H. J. & Mahan, L. C. The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the law of mass action. *Molecular pharmacology* 25, 1-9 (1984).

90 Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann Ny Acad Sci* 51, 660 (1949).

91 Treskatsch, S. *et al.* A modified approach to induce predictable congestive heart failure by volume overload in rats. *PloS one* 9, e87531, doi:10.1371/journal.pone.0087531 (2014).

92 Garcia, R. & Diebold, S. Simple, rapid, and effective method of producing aortocaval shunts in the rat. *Cardiovascular research* 24, 430-432 (1990).

93 Pacher, P., Nagayama, T., Mukhopadhyay, P., Batkai, S. & Kass, D. A. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nature protocols* 3, 1422-1434, doi:10.1038/nprot.2008.138 (2008).

94 Weems, H. B., Chalecka-Franaszek, E. & Cote, T. E. Solubilization of high-affinity, guanine nucleotide-sensitive mu-opioid receptors from rat brain membranes. *Journal of neurochemistry* 66, 1042-1050 (1996).

95 Renart, J., Reiser, J. & Stark, G. R. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 3116-3120 (1979).

96 Jin, W. Q., Tai, K. K., Chan, T. K. & Wong, T. M. Further characterization of [3H]U69593 binding sites in the rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 27, 1507-1511 (1995).

97 Pfeiffer, A., Pasi, A., Mehraein, P. & Herz, A. Opiate receptor binding sites in human brain. *Brain research* 248, 87-96 (1982).

98 Fedynyshyn, J. P., Kwiat, G. & Lee, N. M. Characterization of high affinity opioid binding sites in rat periaqueductal gray P2 membrane. *European journal of pharmacology* 159, 83-88 (1989).

99 Desjardins, G. C., Brawer, J. R. & Beaudet, A. Distribution of mu, delta, and kappa opioid receptors in the hypothalamus of the rat. *Brain research* 536, 114-123 (1990).

100 Yamamura, M. S. *et al.* Characterization of [3H]naltrindole binding to delta opioid receptors in rat brain. *Life sciences* 50, PL119-124 (1992).

101 Kim, K. W., Eun, Y. A., Soh, S. M., Eun, J. S. & Cho, K. P. Ligand binding profiles of U-69, 593-sensitive and-insensitive sites in human cerebral cortex membranes: evidence of kappa opioid receptors heterogeneity. *Life sciences* 58, 1671-1679 (1996).

102 Shaqura, M. A., Zollner, C., Mousa, S. A., Stein, C. & Schafer, M. Characterization of mu opioid receptor binding and G protein coupling in rat hypothalamus, spinal cord, and primary afferent neurons during inflammatory pain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 308, 712-718, doi:10.1124/jpet.103.057257 (2004).

103 Head, B. P. *et al.* G-protein-coupled receptor signaling components localize in both sarcolemmal and intracellular caveolin-3-associated microdomains in adult cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 280, 31036-31044, doi:10.1074/jbc.M502540200 (2005).

104 Theisen, M. M. *et al.* Detection and distribution of opioid peptide receptors in porcine myocardial tissue. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 84, 45-49, doi:10.1016/j.phrs.2014.04.008 (2014).

105 Sobanski, P. *et al.* The presence of mu-, delta-, and kappa-opioid receptors in human heart tissue. *Heart and vessels* 29, 855-863, doi:10.1007/s00380-013-0456-5 (2014).

106 Balijepalli, R. C. *et al.* Depletion of T-tubules and specific subcellular changes in sarcolemmal proteins in tachycardia-induced heart failure. *Cardiovascular research* 59, 67-77 (2003).

107 Balijepalli, R. C., Foell, J. D., Hall, D. D., Hell, J. W. & Kamp, T. J. Localization of cardiac L-type Ca(2+) channels to a caveolar macromolecular signaling complex is required for beta(2)-adrenergic regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7500-7505, doi:10.1073/pnas.0503465103 (2006).

108 Ibrahim, M., Gorelik, J., Yacoub, M. H. & Terracciano, C. M. The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 278, 2714-2723, doi:10.1098/rspb.2011.0624 (2011).

109 Bers, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205, doi:10.1038/415198a (2002).

110 Morton, M. E. & Froehner, S. C. The alpha 1 and alpha 2 polypeptides of the dihydropyridine-sensitive calcium channel differ in developmental expression and tissue distribution. *Neuron* 2, 1499-1506 (1989).

111 Jayasinghe, I. D., Cannell, M. B. & Soeller, C. Organization of ryanodine receptors, transverse tubules, and sodium-calcium exchanger in rat myocytes. *Biophysical journal* 97, 2664-2673, doi:10.1016/j.bpj.2009.08.036 (2009).

112 Tadevosyan, A., Vaniotis, G., Allen, B. G., Hebert, T. E. & Nattel, S. G protein-coupled receptor signalling in the cardiac nuclear membrane: evidence and possible roles in physiological and pathophysiological function. *The Journal of physiology* 590, 1313-1330, doi:10.1113/jphysiol.2011.222794 (2012).

113 Brower, G. L., Henegar, J. R. & Janicki, J. S. Temporal evaluation of left ventricular remodeling and function in rats with chronic volume overload. *The American journal of physiology* 271, H2071-2078 (1996).

114 Wang, X. *et al.* Characterization of cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload in the rat. *Journal of applied physiology* 94, 752-763, doi:10.1152/japplphysiol.00248.2002 (2003).

115 Melenovsky, V. *et al.* The course of heart failure development and mortality in rats with volume overload due to aorto-caval fistula. *Kidney & blood pressure research* 35, 167-173, doi:10.1159/000331562 (2012).

116 Langenickel, T., Pagel, I., Hohnel, K., Dietz, R. & Willenbrock, R. Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 278, H1500-1506 (2000).

117 Huang, M., LeBlanc, M. H. & Hester, R. L. Evaluation of the needle technique for producing an arteriovenous fistula. *Journal of applied physiology* 77, 2907-2911 (1994).

118 Hutchinson, K. R. *et al.* Temporal pattern of left ventricular structural and functional remodeling following reversal of volume overload heart failure. *Journal of applied physiology* 111, 1778-1788, doi:10.1152/japplphysiol.00691.2011 (2011).

119 Flaim, S. F., Minteer, W. J., Nellis, S. H. & Clark, D. P. Chronic arteriovenous shunt: evaluation of a model for heart failure in rat. *The American journal of physiology* 236, H698-704 (1979).

120 Frederick, J. R. *et al.* Stromal cell-derived factor-1alpha activation of tissueengineered endothelial progenitor cell matrix enhances ventricular function after myocardial infarction by inducing neovasculogenesis. *Circulation* 122, S107-117, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.930404 (2010).

121 Murray, D. B., Gardner, J. D., Brower, G. L. & Janicki, J. S. Effects of nonselective endothelin-1 receptor antagonism on cardiac mast cell-mediated ventricular remodeling in rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 294, H1251-1257, doi:10.1152/ajpheart.00622.2007 (2008). 122 Bolte, C., Newman, G. & Schultz Jel, J. Kappa and delta opioid receptor signaling is augmented in the failing heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 47, 493-503, doi:10.1016/j.yjmcc.2009.06.016 (2009).

123 Denning, G. M. *et al.* Proenkephalin expression and enkephalin release are widely observed in non-neuronal tissues. *Peptides* 29, 83-92, doi:10.1016/j.peptides.2007.11.004 (2008).

124 Springhorn, J. P. & Claycomb, W. C. Translation of heart preproenkephalin mRNA and secretion of enkephalin peptides from cultured cardiac myocytes. *The American journal of physiology* 263, H1560-1566 (1992).

125 Imai, N., Kashiki, M., Woolf, P. D. & Liang, C. S. Comparison of cardiovascular effects of mu- and delta-opioid receptor antagonists in dogs with congestive heart failure. *The American journal of physiology* 267, H912-917 (1994).

126 van den Brink, O. W., Delbridge, L. M., Pedrazzini, T., Rosenfeldt, F. L. & Pepe, S. Augmented myocardial methionine-enkephalin in a murine model of cardiac angiotensin II-overexpression. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 8, 153-159, doi:10.3317/jraas.2007.030 (2007).

127 Kawashima, S., Fukutake, N., Nishian, K., Asakuma, S. & Iwasaki, T. Elevated plasma beta-endorphin levels in patients with congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 17, 53-58 (1991).

128 Jin-Cheng, L. *et al.* Anti-arrhythmic effects of kappa-opioid receptor and its changes in ischemia and reperfusion. *Archives of medical research* 39, 483-488, doi:10.1016/j.arcmed.2008.02.011 (2008).

129 Ventura, C. *et al.* Opioid peptide gene expression in the primary hereditary cardiomyopathy of the Syrian hamster. I. Regulation of prodynorphin gene expression by nuclear protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* 272, 6685-6692 (1997).

130 Ventura, C., Pintus, G. & Tadolini, B. Opioid Peptide gene expression in the myocardial cell. *Trends in cardiovascular medicine* 8, 102-110, doi:10.1016/S1050-1738(97)00140-0 (1998).

131 Liang, C. S. *et al.* The role of endogenous opioids in congestive heart failure: effects of nalmefene on systemic and regional hemodynamics in dogs. *Circulation* 75, 443-451 (1987).

132 Himura, Y. *et al.* Short-term effects of naloxone on hemodynamics and baroreflex function in conscious dogs with pacing-induced congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 23, 194-200 (1994).

133 Yatani, A., Imai, N., Himura, Y., Suematsu, M. & Liang, C. S. Chronic opiate-receptor inhibition in experimental congestive heart failure in dogs. *The American journal of physiology* 272, H478-484 (1997).

134 Ding, Y. F. *et al.* Defective intracellular Ca2+ homeostasis contributes to myocyte dysfunction during ventricular remodelling induced by chronic volume overload in rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 35, 827-835, doi:10.1111/j.1440-1681.2008.04923.x (2008).

135 Yang, Y. *et al.* L-type Ca2+ channel alpha 1c subunit isoform switching in failing human ventricular myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 32, 973-984, doi:10.1006/jmcc.2000.1138 (2000).

136 Takahashi, T. *et al.* Expression of dihydropyridine receptor (Ca2+ channel) and calsequestrin genes in the myocardium of patients with end-stage heart failure. *The Journal of clinical investigation* 90, 927-935, doi:10.1172/JCI115969 (1992).

137 Gomez, A. M. *et al.* Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science* 276, 800-806 (1997).

138 Xiao, R. P., Pepe, S., Spurgeon, H. A., Capogrossi, M. C. & Lakatta, E. G. Opioid peptide receptor stimulation reverses beta-adrenergic effects in rat heart cells. *The American journal of physiology* 272, H797-805 (1997).

139 Ela, C., Barg, J., Vogel, Z., Hasin, Y. & Eilam, Y. Distinct components of morphine effects on cardiac myocytes are mediated by the kappa and delta opioid receptors. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29, 711-720, doi:10.1006/jmcc.1996.0313 (1997).

140 Bian, J. S., Wang, H. X., Zhang, W. M. & Wong, T. M. Effects of kappaopioid receptor stimulation in the heart and the involvement of protein kinase C. *British journal of pharmacology* 124, 600-606, doi:10.1038/sj.bjp.0701857 (1998).

8. Abbildungsverzeichnis

Abb.	1: Spezifische und unspezifische Bindung	.23
Abb.	2: Ermittlung der maximalen Bindungskapazität (Bmax) und der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (Kd).	25
Abb.	3: Schematische Darstellung der Induktion einer infrarenalen, aortokavalen Fistel	27
Abb.	4: Nachweis von DOR-spezifischen Bindungsstellen im Gehirn	.40
Abb.	5: Nachweis von KOR-spezifischen Bindungsstellen im Gehirn	40
Abb.	6: Nachweis von KOR-spezifischen Bindungsstellen im Rückenmark	.41
Abb.	7: Nachweis von MOR-spezifischen Bindungsstellen im Gehirn.	41
Abb.	8: Nachweis von MOR-spezifischen Bindungsstellen im Rückenmark	.42
Abb.	9: Nachweis von DOR-spezifischen Bindungsstellen im LV gesunder Rattenherzen.	43
Abb.	10: Nachweis von KOR-spezifischen Bindungsstellen im LV gesunder Rattenherzen	43
Abb.	10: Nachweis MOR-spezifischer Bindungsstellen im LV gesunder Rattenherzen	44
Abb.	12: Herz- und Lungen-/Körpergewicht-Indices.	45
Abb.	13: Druck-Volumen-Kurven nach hämodynamischer Vermessung	47
Abb.	14: Immunhistochemische Anfärbung von DOR und Dihydropyridin- Rezeptor (Ca _v 1.2) im Myokard des LV gesunder Rattenherzen	48
Abb.	15: Immunhistochemische Anfärbung von KOR und Dihydropyridin- Rezeptor (Ca _v 1.2) im Myokard des LV gesunder Rattenherzen	49
Abb.	16: Immunhistochemische Anfärbung von DOR und Dihydropyridin- Rezeptor (Ca _v 1.2) im LV 28 \pm 2 Tage nach ACF-Induktion	50

Abb.	17:	Immunhistochemische Anfärbung von KOR und Dihydropyridin- Rezeptor ($Ca_v 1.2$) 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion	0
Abb.	18:	Immunhistochemische Anfärbung von DOR und Ryanodin-Rezeptor (RyR) in Kardiomyozyten des LV gesunder Rattenherzen5	51
Abb.	19:	Immunhistochemische Anfärbung von KOR und Ryanodin-Rezeptor (RyR) in Kardiomyozyten des LV gesunder Rattenherzen5	2
Abb.	20:	Immunhistochemische Anfärbung von DOR und Ryanodin-Rezeptor (RyR) im LV 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion5	3
Abb.	21:	Immunhistochemische Anfärbung von KOR und Ryanodin-Rezeptor (RyR) im LV 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion5	3
Abb.	22:	Quantitative Bestimmung der DOR-spezifischen Immunfluoreszenz5	4
Abb.	23:	Densitometrische Darstellung der KOR-spezifischen Immunfluoreszenz5	5
Abb.	24:	Nachweis DOR-spezifischer Banden im Western Blot5	6
Abb.	25:	Nachweis PENK-spezifischer Banden im Western Blot5	7
Abb.	26:	Nachweis KOR-spezifischer Banden im Western Blot5	8
Abb.	27:	Nachweis PDYN-spezifischer Banden im Western Blot5	9
Abb.	28:	Schematische Darstellung der Lokalisation von Opioid- rezeptoren, Dihydropyridin- und Ryanodin-Rezeptor im Rattenmyozyt	3

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Radioaktiv und nicht-radioaktiv markierte Liganden der Bindungsstudien	2
Tabelle 2:	Primärantikörper zur immunhistochemischen Anfärbung von Opioidrezeptoren und Calciumkanälen	1
Tabelle 3:	Sekundärantikörper zur immunhistochemischen Darstellung der spezifischen Primärantikörper	2
Tabelle 4:	Primärantikörper zu Darstellung von Opioidrezeptoren und ihrer endogenen Liganden im Western Blot	7
Tabelle 5:	Sekundärantikörper zur Detektion der Primärantikörper im Western Blot	7
Tabelle 6:	Ergebnisse der hämodynamischen Vermessung 28 ± 2 Tage nach ACF-Induktion46	3

10. Eidesstattliche Versicherung

"Ich, Lukas Dehe, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Adaptive Veränderungen des kardialen Opioidsystems der Ratte im Verlauf einer Herzinsuffizienz induziert durch eine infrarenale, aortokavale Fistel" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE *-www.icmje.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Berlin, 23. November 2015

Lukas Dehe

11. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Lukas Dehe hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Originalarbeiten

Publikation 1:

Treskatsch S, Feldheiser A, Shaqura M, **Dehe L**, Habazettl H, Röpke T, Shakibaei M, Schäfer M, Spies C, Mousa SA. Cellular localization and adaptive changes of the cardiac delta opioid receptor system in an experimental model of heart failure in rats. Heart and Vessels, 2015, doi:10.1007/s00380-014-0620-6.

Publikation 2:

Treskatsch S, Shaqura M, **Dehe L**, Feldheiser A, Röpke T, Shakibaei M, Spies C, Schäfer M, Mousa SA. Upregulation of the kappa opioidergic system in left ventricular rat myocardium in response to volume overload: Adaptive changes of the cardiac kappa opioid system in heart failure. Pharmacological research, 2015, 33-41, doi:10.1016/j.phrs.2015.09.005.

Publikation 3:

Treskatsch S, Shakibaei M, Feldheiser A, Shaqura M, **Dehe L**, Röpke T, Spies C, Schäfer M, Mousa SA. Ultrastructural changes associated with myocardial apoptosis, in failing rat hearts induced by volume overload. Int J Cardiol, 2015. 197: p. 327-32.

Beitrag zu den Originalarbeiten: unter Anleitung Durchführung der im Kapitel Methoden beschriebenen Experimente, gemeinsame Auswertung der Daten, gemeinsame Erstellung der Publikationen.

Abstract & Poster

Publikation 1:

Lukas Dehe, Aarne Feldheiser, Shaaban A. Mousa, Mehdi Shakibaei, Michael Schäfer, Claudia D. Spies, Sascha Treskatsch. "Biventrikuläre Volumenüberladung ist mit kardialer Apoptose assoziiert". Hauptstadtkongress der DGAI, Abstract & Poster, 2013.

Publikation 2:

Lukas Dehe, Aarne Feldheiser, Shaaban A. Mousa, Mohammed Shaqura, Mehdi Shakibaei, Michael Schäfer, Claudia D. Spies, Sascha Treskatsch. "Biventrikuläre Volumenüberladung ist mit myokardialer Apoptose assoziiert". Deutscher Anästhesiecongress der DGAI, Abstract & Poster, 2015.

Beitrag zu den Abstracts und Postern: unter Anleitung Durchführung der im Kapitel Methoden beschriebenen Experimente, gemeinsame Auswertung der Daten, gemeinsame Erstellung der Publikationen.

Berlin, 23. November 2015

Univ.-Prof. Dr. med. Michael Schäfer Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Lukas Dehe Unterschrift des Doktoranden

13. Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Michael Schäfer für die Überlassung dieses interessanten Themas. Seine wissenschaftliche Betreuung, Erklärungs- und Diskussionsbereitschaft waren für mich unersetzbar und trugen wesentlich zu dieser Arbeit bei.

Ebenso danke ich Herrn Dr. med. Sascha Treskatsch für seine stetige Einsatzbereitschaft und Unterstützung. Er weckte in mir den Wunsch, mich noch tiefer in Methodik und Theorie einzuarbeiten und mich in Zukunft weiter in der klinischen und experimentellen Forschung zu engagieren. Die Anfertigung dieser Arbeit wäre ohne ihn kaum möglich gewesen.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Mohammed Shaqura und Herrn Dr. Shaaban Mousa für ihre kontinuierliche Hilfsbereitschaft und Einarbeitung in die Methoden. Frau Petra von Kwiatkowski und Frau Susanne Runewitz trugen ebenfalls durch ihre technische Betreuung im Labor wesentlich zu dieser Arbeit bei. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken. Auch möchte ich mich bei allen indirekt Beteiligten und hier nicht Genannten für Ihre Hilfe bedanken.

Mein letzter Dank gilt meiner Familie für die dauerhafte Unterstützung.