

**Untersuchungen zur Histaminsynthese und
kontraktilen Wirkung von Histamin an
Vorhofpräparaten von transgenen Mäusen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Juliane Martha Grobe
geboren am 27.08.1992 in Weimar

Betreuer:

Prof. Dr. med. Joachim Neumann

Gutachter:

Prof. Dr. Roland Seifert, Hannover
apl. Prof. Dr. Stefan Dhein, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.03.2023

Referat

Anhand verschiedener Experimente mit transgenen Mäusen, welche den humanen H₂-Histamin-Rezeptor selektiv im Herzen überexprimieren, sollte der Metabolismus von Histamin in Kardiomyozyten im Rahmen dieser Dissertation genauer untersucht werden. Im Mittelpunkt dabei stand die Frage, ob es im Herzen eine kontraktile relevante Produktion von Histamin aus seinem Vorläufer Histidin gibt. Daneben sollte die Auswirkung von Inhibitoren des Histaminabbaus auf den kardialen Histamingehalt untersucht werden. Dafür wurden Kontraktions- und Frequenzmessungen an isolierten, elektrisch gereizten linken und spontan schlagenden rechten Vorhofpräparationen von transgenen Mäusen und Wildtyp-Geschwistertieren durchgeführt.

Histamin wirkte auf die isolierten transgenen Muskelpräparate positiv inotrop und chronotrop, während die Wildtyp-Mäuse keinerlei Reaktion zeigten. Bei der Applikation der Histamin-Vorstufe Histidin konnten jedoch keine signifikanten kraft- und frequenzsteigernden Effekte an den transgen veränderten Mäusen nachgewiesen werden und somit die Funktion der L-Histidin-Decarboxylase nicht genau beurteilt werden. Ergänzend wurde auch an menschlichem Herzvorhofgewebe bei der Gabe von Histidin, wie auch Histamin eine Kraftzunahme beobachtet.

Durch die Gabe von verschiedenen Hemmstoffen der Enzyme des Histaminabbaus wurden die Wirkung von Histamin auf die Inotropie und teilweise der Chronotropie potenziert, was sich in einer Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von Histamin zeigte. Untersucht wurden der Diaminoxidase Hemmer Aminoguanidin, der N-Methyltransferase-Hemmer Quinacrin und der unspezifische Monoaminoxidase Hemmer Tranylcypromin.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass in Kardiomyozyten ein Histaminabbau und eventuell auch eine Histaminsynthese aus Histidin möglich sind. Dies könnte klinisch relevant bei der Behandlung von Patienten mit chronischen Herzerkrankungen sein, da bei diesen Erkrankungen ein erhöhter Histaminspiegel gefunden wurde. Darüber hinaus ist das Wissen über die Beeinflussbarkeit der Histaminkonzentration bei der Neueinstellung von Medikamenten, die in den Histaminmetabolismus eingreifen können wichtig um kardiale unerwünschte Wirkungen, wie Arrhythmien verhindern zu können.

Grobe, Juliane Martha: Untersuchungen zur Histaminsynthese und kontraktile Wirkung von Histamin an Vorhofpräparaten von transgenen Mäusen. Halle (Saale), Martin-Luther-Universität, Medizinische Fakultät, Dissertation; 77 Seiten, 2022

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Hintergrund	1
1.2.	Biosynthese, Metabolismus und Vorkommen des Histamins	2
1.3.	Kardiovaskuläre Wirkung von Histamin	4
1.4.	Histamin-Rezeptoren	5
1.5.	Signalkaskade des H ₂ -Histamin-Rezeptors am Herzen	6
2.	Zielstellung	8
3.	Material und Methoden	9
3.1.	Versuchstiere und Tierhaltung	9
3.2.	H ₂ -Histamin-Rezeptor überproduzierende Mäuse	9
3.2.1.	Generierung von transgenen Mäusen	9
3.2.2.	Genotypisierung	10
3.2.3.	Konzentrationsbestimmung der DNA	10
3.2.4.	PCR-Amplifikation der DNA	10
3.2.5.	Agarosegelelektrophorese	11
3.2.6.	Untersuchung auf Proteinebene	11
3.2.7.	Färbung und histologische Untersuchung	12
3.3.	Radioenzymatische Messungen von Enzymaktivität und Histamingehalt	13
3.4.	Messung des Histamingehaltes mittels HPLC	13
3.5.	Kontraktionsversuche	13
3.5.1.	Vorbereitung des Organbades	13
3.5.2.	Vorbereitung und Kalibrierung der Messanlage	14
3.5.3.	Narkotisierung und Entnahme der Herzen	15
3.5.4.	Präparation der Vorhöfe	16
3.5.5.	Vorbereitung der menschlichen Vorhofpräparate	17
3.5.6.	Versuchsdurchführung	18
3.5.7.	Versuchsprotokolle	19
3.5.8.	Verwendete Substanzen und deren Wirkmechanismus	21
3.6.	Statistische Auswertung	21
4.	Ergebnisse	22
4.1.	Genotypisierung der Versuchsmäuse	22
4.2.	Kontraktionsversuche an linken Vorhofpräparaten	22
4.2.1.	Wirkung von Isoprenalin	23
4.2.2.	Auswirkung auf die Hemmung der L-Histidindecaboxylase durch NSD 1015	23
4.2.3.	Wirkung von Histidin, Histamin und Cimetidin	24
4.2.4.	Auswirkung auf die Hemmung des Histaminmetabolismus	27

4.3.	Kontraktionsversuche an rechten Vorhofpräparaten.....	32
4.3.1.	Wirkung von Isoprenalin	32
4.3.2.	Wirkung von Histidin und Histamin.....	33
4.4.	Arrhythmien während der Versuche mit transgenen und Wildtyp-Mäusen	33
4.5.	Kontraktionsversuche an menschlichen Vorhofpräparaten	34
4.6.	Histologische Untersuchungen der Herzen	36
4.7.	Nachweis der Histamin auf- und abbauenden Enzyme	37
4.8.	Messung von Histamingehalt und Enzymaktivitäten	38
4.9.	EC ₅₀ -Werte	40
5.	Diskussion.....	42
5.1.	Diskussion der Methoden	43
5.1.1.	Genetische Veränderung.....	43
5.1.2.	Transgene Mausmodelle	43
5.1.3.	Kontraktionsexperimente.....	44
5.2.	Diskussion der Ergebnisse	45
5.2.1.	Wirkung von Histamin und Histidin.....	46
5.2.2.	Wirkung von Cimetidin und NSD 1015	48
5.2.3.	Wirkung von Aminoguanidin, Quinacrin und Tranycypromin.....	48
5.2.4.	Menschliche Herzvorhöfe	51
5.3.	Klinischer Ausblick	53
6.	Zusammenfassung.....	54
7.	Literatur	55
8.	Thesen.....	63
9.	Anhang	64
	Selbstständigkeitserklärung	IX
	Erklärung über frühere Promotionsversuche	IX
	Danksagung.....	X

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AC	Adenylylcyclase
AG	Aminoguanidin
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calciumionen
CaCl ₂	Kalziumchlorid
ca.	zirka
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CICR	Ca ²⁺ -induzierte-Ca ²⁺ -Freisetzung
CSQ	Calsequestrin
CO ₂	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamtetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii
evtl.	eventuell
g	Gramm
Gs	stimuliertes G-Protein
h	Stunde
H ₂ O	Diwasserstoffmonoxid (Wasser)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Ktr	Kontrolle
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KWK	Konzentrations-Wirkungskurve
Ltr	Liter
LTKK	L-Typ Kalziumkanal
M	Molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesiumionen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
NaOH	Natriumhydroxid
NSD 1015	3-Hydroxybenzylhydrazine dihydrochlorid
O ₂	Sauerstoff
P	Phosphorylierung
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PDE	Phosphodiesterase
pH	-log [H ⁺]
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
QAN	Quinacrin
Rpm	<i>Eng. revolutions per minute</i> ("Umdrehung pro Minute")
RyR	Ryanodin-Rezeptor (Ca ²⁺ -Freisetzungskanal)
s.	siehe
SEM	Standartabweichung
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SL	Sarkolemma
sog.	sogenannt
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TG	Transgen
TnC	Troponin C
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Histaminmetabolismus

Abb. 2: Signaltransduktion von Histamin an den H₂-Histamin-Rezeptor

Abb. 3: Schematische Darstellung der α -MCH-H₂-Rezeptor Expressionskassette

Abb. 4: Kontraktionskraftmessanlage

Abb. 5: Schematische Darstellung der Versuchsprotokolle

Abb. 6: Wirkung von Isoprenalin an isolierten linken Vorhofpräparaten

Abb. 7: Positiv inotroper Effekt von NSD 1015

Abb. 8: Wirkung von Histidin an isolierten linken Vorhofpräparaten

Abb. 9: Wirkung von Histamin an isolierten linken Vorhofpräparaten

Abb.10: Hemmung der Diaminoxidase mit Aminoguanidin

Abb.11: Hemmung der N-Methyltransferase mit Quinacrin

Abb.12: Hemmung der Diaminoxidase und N-Methyltransferase mit Quinacrin und Aminoguanidin (A)

Abb.13: Hemmung der Diaminoxidase und N-Methyltransferase mit Quinacrin und Aminoguanidin (B)

Abb.14: Hemmung der Monoaminoxidase-B mit Tranylcypromin

Abb.15: Wirkung von Isoprenalin an isolierten rechten Vorhofpräparaten

Abb.16: Arrhythmien der rechten und linken Vorhofpräparate

Abb.17: Wirkung von Histidin an menschlichen Vorhofpräparaten

Abb.18: Wirkung von Histamin an menschlichen Vorhofpräparaten

Abb. 19: Immunhistochemische Untersuchung zum Nachweis von Histamin-abbauenden Enzymen in den murinen Vorhofpräparatione

Abb. 20: Westernblot

Abb. 21: Histaminmetabolismus und Signaltransduktion über den H₂-Histamin-Rezeptor an Kardiomyozyten

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Antikörper für immunhistochemische Darstellung

Tab. 2: Verwendete Substanzen und ihre Wirkungen

Tab. 3: Radioenzymatisch gemessene Enzymaktivitäten und Histamingehalt am menschlichen und murinen Herzen

Tab. 4: Histamingehalt gemessen mittels HPLC

Tab. 5: EC₅₀-Werte und maximale Effekte der rechten und linken murinen Vorhofpräparationen und der menschlichen Vorhofpräparate

1. Einleitung

1.1. Hintergrund

Histamin ist an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen involviert. Dazu zählen u.a. Allergische Reaktionen, Asthma, Diarrhö, Entzündungen und Magensäure-Sekretion (Jutel et al. 2009, Brunton et al. 2017). Weiterhin ist Histamin an Prozessen im ZNS, wie der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt (Zecharia et al. 2012; Aktories et al. 2017). Darüber hinaus werden Krankheiten wie Narkolepsie, Morbus Alzheimer, Tourette-Syndrom und Depressionen mit einer Fehlfunktion des zentralen histaminergen Nervensystems in Verbindung gebracht (Yoshikawa et al. 2013).

In den 1910er Jahren erfolgte die Erstbeschreibung von Histamin durch Windaus und Vogt. Diesen gelang es Histamin aus der Imidazolylpropionsäure im Reagenzglas herzustellen (Windaus und Vogt 1907). Die Bedeutung von Histamin als möglicher Wirkstoff am Herz-Kreislauf-System, sein Vorkommen im Gewebe und die mögliche Bedeutung bei allergischen Reaktionen wurden zuerst von Sir Henry Hallett Dale beschrieben, der u.a. dafür 1936 einen Nobelpreis erhielt (Dale und Laidlaw 1910). Des weiteren wurde Histamin ab 1913 in der Gynäkologie eingesetzt, um eine Uteruskontraktion vor und nach der Geburt zu induzieren. Die Patientinnen berichteten nach der Gabe u.a. von Rötungen im Injektionsbereich, Erbrechen, Kopfschmerzen und Herzklopfen (Jäger 1913a; Jäger 1913b). In der klinischen Untersuchung fielen ein Blutdruckabfall, sowie Symptome des anaphylaktischen Schocks auf. Ebenso wurden ventrikuläre Extrasystolen, Kontraktionen des Magens und eine Kontraktion der Bronchien festgestellt (Jäger 1913a; Jäger 1913b; Schenk 1921).

Einige dieser Entdeckungen werden heute täglich im klinischen Alltag angewendet. Es gibt verschiedene Medikamente, die die Wirkung des Histamins beeinflussen können und so bei der Behandlung von Erkrankungen mitwirken: z.B. H₂-Histamin-Rezeptor Antagonisten bei erhöhter Magensäuresekretion oder zur Therapie von peptischen Ulcera, sowie H₁- Rezeptor Antagonisten bei allergischen Reaktionen. In einigen Kliniken werden H₁- und H₂-Histamin-Rezeptor Antagonisten als Prämedikation vor großen Operationen verabreicht. Damit soll die Histaminfreisetzung aus Mastzellen vermindert werden (Kubas und Stark 2007). Als unerwünschte Wirkungen der Antihistaminika zeigten sich sedierende und kognitiv leistungssenkende Komponenten, welche heute gezielt in der Behandlung von psychiatrischen Krankheiten, wie z.B. Depressionen, eingesetzt werden (Helm 2014; Ansari 2013). Histamin selbst hat jedoch im Gegensatz zu den antihistaminerg wirkenden Substanzen in der Medizin derzeit weniger Anwendungen. Es findet Verwendung als Positivkontrolle bei der Durchführung von Allergietests (Ansari 2013). Weiterhin wurde 2008

das Medikament mit dem Handelsnamen Caplene® zugelassen. Dabei handelt es sich um Histamindihydrochlorid, welches in Kombination mit Interleukin-2 zur Therapie von akuter myeloischer Leukämie eingesetzt wird (Ansari 2013; European Medicines Agency 2018).

1.2. Biosynthese, Metabolismus und Vorkommen des Histamins

Histidin wird dem Organismus über die Nahrung zugeführt und über sogenannte ABC-Transporter in die Zellen des Darms und in Nervenzellen aufgenommen. Dort erfolgt die Synthese von Histamin aus seiner physiologischen Vorstufe L-Histidin über die L-Histidindecaboxylase (HDC) (Helm 2014). Die HDC ist das wichtigste Histamin produzierende Enzym der Säugetiere. In Versuchen zeigte sich, dass sich nach der Deletion der HDC die Konzentration von Histamin drastisch senkte (von ca. 50 pmol/m bis unter die Nachweisgrenze in Peritonealflüssigkeit der Maus) (Jutel et al. 2009; Jäger 1913a; Hori et al. 2002). HDC-Aktivität fand man in Mastzellen und Makrophagen, sowie in dendritischen Zellen, T-Lymphozyten und menschlichen Ganglien (Ercan-Sencicek et al. 2010). Es existieren verschiedene Hemmstoffe der HDC (z.B. Quinacrin und NSD 1015), wobei das α -Fluomethylhistidin einer der spezifischsten ist. In Versuchen wurde gezeigt, dass die Gabe von α -Fluomethylhistidin die Histaminmenge im kompletten Organismus senken kann. Am Herzen jedoch zeigten sich regionale Unterschiede zwischen den Herzkammern (Ratte: Senkung der Histaminkonzentration um 22% im rechten Vorhof, jedoch nicht im linken Vorhof und in den Ventrikeln) (Yoshitomi et al. 1989).

Histamin wird intrazellulär in Vesikeln, von z.B. Neuronen oder Immunzellen, gespeichert und bei Stimulation freigesetzt. Dies kann zum Einem im Rahmen von allergischen Reaktionen durch Vernetzung von IgE-Antikörpern geschehen. Zum anderen durch verschiedene Medikamente, Nahrungsmittel, chemische und physikalische Reize (Teloh et al. 2018; Hirasawa 2019). Dabei erfolgt die Regulation der Freisetzung über zyklische Nukleotide (u.a. cAMP). Zur erhöhten Histaminfreisetzung kommt es bei gesenkten cAMP-Spiegeln, der z.B. durch Zytokine im Rahmen von Entzündungsreaktionen oder durch α -adrenerge Stimulation. Über einen Rückkopplungsmechanismus kann Histamin, über die Erhöhung des cAMPs, die Degranulation auch selbst hemmen (Maintz 2007). Am isolierten Rattenherz zeigte sich eine Freisetzung von Histamin nach Gabe von Neurotensin oder Compound 48/80 (Rioux et al. 1984).

Der Histamin Abbau kann über zwei verschiedene Wege ablaufen (Abb.1):

1. Über das für Histamin hochselektive Enzym Histamin-N-Methyltransferase (HNMT), das hauptsächlich für den intrazellulären Abbau verantwortlich ist und zu einer Methylierung führt

(Maintz 2007, Brunton et al. 2017). Das entstandene N-Methylhistamin wird durch die Monoaminoxidase Typ B (MAO-B) über N-Methylimidazol-4-ylacetaldehyd zu N-Methylimidazol-4-yl-essigsäure oxidativ desaminiert.

2. Extrazellulär über die Diaminoxidase (DAO), welche Histamin zum 2-(1*H*-imidazol-4-yl)acetaldehyd desaminiert (Brunton et al. 2017, Neumann et al. 2021a). Im Weiteren erfolgt die Ribosylierung über eine Phosphoribosyltransferase zu (1-Ribosyl-1*H*-imidazol-4-yl)essigsäure (siehe Abb. 4) (Helm 2014; Maintz 2007). Die DAO ist hauptsächlich für den Abbau von über die Nahrung aufgenommenen Histamins verantwortlich.

Die Ausscheidung der beiden Endprodukte N-Methylimidazol-4-yl-essigsäure und (1-Ribosyl-1*H*-imidazol-4-yl)essigsäure erfolgt renal (Teloh et al. 2018).

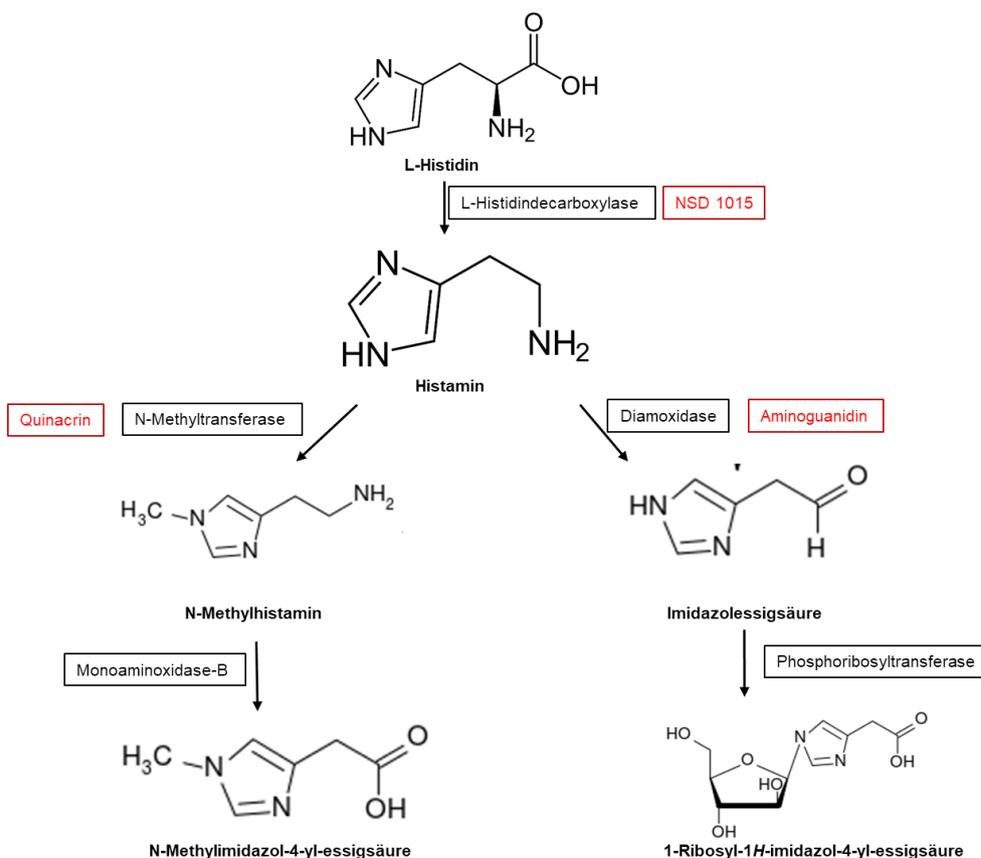


Abb. 1: Histaminmetabolismus

Abgebildet ist die Histaminsynthese durch das Enzym L-Histidindecaboxylase aus Histidin, sowie die zwei Wege des Histaminmetabolismus:

1. Über die Histamin-N-Methyltransferase und Monoaminoxidase zum N-Methylimidazol-4-yl-essigsäure;
 2. Durch die Diaminoxidase und Phosphoribosyltransferase zum Imidazolessigsäureribosid;
- In rot dargestellt sind die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Hemmstoffe der abbauenden Enzyme.

In Abbildung 1 ist der Histaminmetabolismus dargestellt. Daneben sind die Angriffspunkte der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Hemmstoffe abgebildet. In den durchgeführten

Versuchen sollte die Beeinflussbarkeit des Histaminmetabolismus untersucht werden. Mit der Gabe von Histidin sollte die Histaminproduktion über die HDC gesteigert werden bzw. mit NSD 1015 eine Hemmung der HDC erreicht werden. Im zweiten Teil sollte der Abbau des Histamins an verschiedenen Stellen gehemmt werden. Es wurden Experimente mit dem unspezifischen MAO-Hemmer Tranylcypromin, dem N-Methyltransferase-Hemmer Quinacrin und dem Diaminoxidase-Hemmer Aminoguanidin durchgeführt.

Der größte Anteil des Histamins des Körpers liegt in der Peripherie vor (weniger im ZNS). Dabei wurde in Mastzellen mit einer 100-bis 1000-fach höheren Konzentration als in anderen Zellen die Hauptmenge von Histamin gefunden. Die Konzentration des Histamins in den Mastzellen ist organ- und speziesabhängig (Jutel et al. 2009).

Der Transport von Histamin durch die Zellmembran kann durch verschiedene Transporter erfolgen. Dazu zählen OCT (=organischer Kationentransporter), die PMAT (=plasmatischer Monoamintransporter) und VMAT (=vesikulärer Monoamintransporter). Daneben besteht die Endozytose bzw. Exozytose von in Vesikeln gespeichertem Histamin (Stark 2013). Bisher wurden der OCT-2 und OCT-3 am Herzen nachgewiesen (Gründemann et al. 1998).

Die Aufnahme von Histamin in nicht-neuronale Zellen kann über sogenannten Uptake 2, der sich durch eine geringe Affinität aber hohe Kapazität auszeichnet, stattfinden (Iversen 1965). Der Uptake 2 von Histamin zeigt hohe Speziesunterschiede. Bei den Menschen sind als Hemmstoffe u.a. Corticosteroide und Despramin bekannt. Bei der Maus hingegen nur Decynium 22 (Gründemann et al. 1998).

1.3. Kardiovaskuläre Wirkung von Histamin

Die Arbeitsgruppe um Dale beschrieb die blutdrucksenkende Wirkung von exogen zugeführtem Histamin durch die Relaxation glatter Muskulatur der arteriellen Gefäße (Dale und Laidlaw 1910).

Später fanden sie heraus, dass Histamin auch endogen vorkommt und ebenso einen vasodilatativen Effekt besitzt (Best et al. 1927). Weiterhin wurde ein antiadrenerger Effekt beschrieben. So war bei der Katze eine Katecholamin bedingte Vasokonstriktion durch Histamin abschwächbar (Dale und Laidlaw 1910). Andererseits zeigte sich an anderen glatten Muskeln, wie Koronararterien, eine Vasokonstriktion, sowie einen Anstieg des pulmonalen Druckes und in vitro Kontraktionen an glatter Muskulatur des Uterus, der Blase und des Darm (Dale und Laidlaw 1910). An Langendorff-Präparaten des Kaninchenherzens konnte ein positiv chronotroper und inotroper Effekt gezeigt werden (Einis 1913). Einis aus Freiburg beschrieb in seinen Untersuchungen an isolierten Kaninchenherzen gelegentlich

Rhythmusstörungen, vor allem AV-Blöcke III. Grades bei Kaninchen und Asystolien bei isolierten Froschherzen (Einis 1913).

Zusammenfassend führt Histamin einerseits zu einer Zunahme der Kontraktilität des Herzens (positive Inotropie) und der Herzfrequenz (positive Chronotropie), andererseits zu einer Verlängerung der Überleitungszeit vom Atrium zum Ventrikel (negative Dromotropie) und einer Abnahme der Reizschwelle (negative Bathmotropie) (Freissmuth et al. 2012).

1.4. Histamin-Rezeptoren

Bisher wurden vier Subtypen von Histamin-Rezeptoren, Typ 1 bis Typ 4, beschrieben (Neumann et al. 2021b; Neumann et al. 2022).

Der H₁-Histamin-Rezeptor kommt im Gehirn, in glatter Muskulatur, in Endothelzellen, im Nebennierenmark und im Herz vor. Er spielt eine große Rolle im Rahmen von allergischen Reaktionen, indem er u.a. zur Kontraktion von glatter Muskulatur führt und die Gefäßpermeabilität erhöht (Oda et al. 2000, Oda et al. 2002). Im ZNS spielt der H₁-Histamin-Rezeptor u.a. bei Lernprozessen eine Rolle. Der humane H₁-Histamin Rezeptor ist auf Chromosom 3p25b lokalisiert und gehört zur Familie der G_{q/11}-Proteine. Nach Stimulation des Rezeptors durch Histamin kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C (Jutel et al. 2009, Thangam et al. 2018).

H₂-Histamin-Rezeptoren sind auf Chromosom 5 lokalisiert und führen über G_s-Proteine zur Aktivierung der Adenylylcyclase mit dem nachfolgenden Anstieg des intrazellulären cAMP. Er ist lokalisiert in Zellen des Magens, im kardialen Gewebe, sowie in endothelialen Zellen, glatter Muskulatur und Immunzellen. Vor allem im Magen ist der H₂-Histamin-Rezeptor durch seine Funktion bei der Magensäuresekretion bekannt (Kobayashi et al. 1996; Saad 2013).

Die H₃-Histamin-Rezeptoren sind auf Chromosom 20 lokalisiert und wurden zuerst im Gewebe des zentralen und peripheren Nervensystems identifiziert. Sie sind präsynaptische Rezeptoren, welche an der Regulation von anderen Neurotransmittern, wie Dopamin, Serotonin und Noradrenalin beteiligt sind. Nach Stimulation dieses H₃-Histamin-Rezeptor, der zur Gruppe der G_{i/o}-Proteine-gekoppelten Rezeptoren gehört, kommt es intrazellulär zu einer Hemmung der Adenylylcyclase und somit zu einem Abfall des cAMP (Jutel et al. 2009, Thangam et al. 2018).

Eine große Ähnlichkeit zum H₃-Histamin-Rezeptor hat der auf Chromosom 18 lokalisierte H₄-Histamin-Rezeptor. Beide besitzen zu 58% die gleichen transmembranären

Aminosäuresequenzen. Er gehört zur Gruppe der $G_{i/o}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren und führt über die Hemmung der Adenylylcyclase zu einer intrazellulären Verringerung der cAMP-Konzentration (Verta et al. 2021). Des weiteren aktiviert er die Phospholipase C, was zu einer Mobilisierung von Calcium führt. Der H_4 -Histamin-Rezeptor kommt in Knochenmarkzellen und peripheren Blutzellen vor. Er spielt eine wichtige Rolle bei Immun- und Entzündungsprozessen (Jutel et al. 2009, Thangam et al. 2018).

1.5. Signalkaskade des H_2 -Histamin-Rezeptors am Herzen

Für die Entstehung von Kontraktionen in den Herzmuskelzellen ist Calcium (Ca^{2+}) ein wichtiger Mediator. In Kardiomyozyten wird die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch Calcium-induzierte Calciumfreisetzung aktiviert: Calcium wird bei einer Depolarisation der Zellmembran über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle durch die Zellmembran in das Zellinnere transportiert (Galice et al. 2018). Das jetzt intrazelluläre Ca^{2+} aktiviert neben der direkten Wirkung am kontraktilem Apparat den Ryanodin-Rezeptor (RyR) am SR. Dieser führt zur Induzierung der Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR (Sham et al. 1998).

Die Calciumhomöostase der Herzmuskelzelle kann darüber hinaus u.a. durch Bindung von Histamin an dem membranständigen H_2 -Histamin-Rezeptor reguliert werden (Abb.2). Dabei kommt es über die α -Untereinheit des G_s -Proteins zu einer Aktivitätszunahme der Adenylylcyclase (AC) an der Zellmembran. Dies führt zu einer Umwandlung von ATP in cAMP, welches dann an die Proteinkinase A (PKA) im Zytoplasma der Zelle bindet. Die so aktivierte PKA führt über Phosphorylierung verschiedener intrazellulärer Proteine, wie des RyR, Phospholamban (PLB) und den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal zu einem Calciumeinstrom in das Zytoplasma (Galice et al. 2018).

Eine erhöhte freie Ca^{2+} -Konzentration erzeugt durch elektromechanische Kopplung eine Kontraktion. Diese wird durch die Bindung von freien Ca^{2+} an das myofilamentäre Troponin C eingeleitet. Am Ende der Kontraktion folgt die Relaxation, bei der sich die Ventrikel des Herzens mit Blut füllen. Dafür muss die Konzentration an freiem intrazellulärem Ca^{2+} gesenkt werden. Dies erfolgt über die Wiederaufnahme des Ca^{2+} in das SR über die SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA-2a), die je zwei Calciumionen unter Verbrauch eines ATP in das SR aufnimmt. Im SR werden die Ca^{2+} -Ionen an Calsequestrin (CSQ), einem Glykoprotein, gebunden. Die SERCA-2a wird in ihrer Funktion vom PLB reguliert. Dieses Membranprotein spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der kardialen Kontraktilität. Es kann in seinem dephosphorylierten Zustand die Kontraktilität durch eine Aktivitätshemmung der SERCA-2a inhibieren (Eijgenraam et al. 2020). Wird PLB jedoch durch cAMP-abhängige Proteinkinasen

phosphoryliert, kommt es zu einer Abspaltung und somit Aktivierung von SERCA-2a. Die Aufnahme von Ca^{2+} zurück in das SR wird dann beschleunigt und die Relaxationszeit verkürzt (positiv lusitroper Effekt).

Die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration, sowie eine über die SERCA-2a beschleunigte Ca^{2+} Erniedrigung nach der Kontraktion führt zu einer erhöhten Kraftentwicklung und einer beschleunigten Relaxation des Herzmuskels (siehe Abb. 2) (Primeau et al. 2018; Galice et al. 2018).

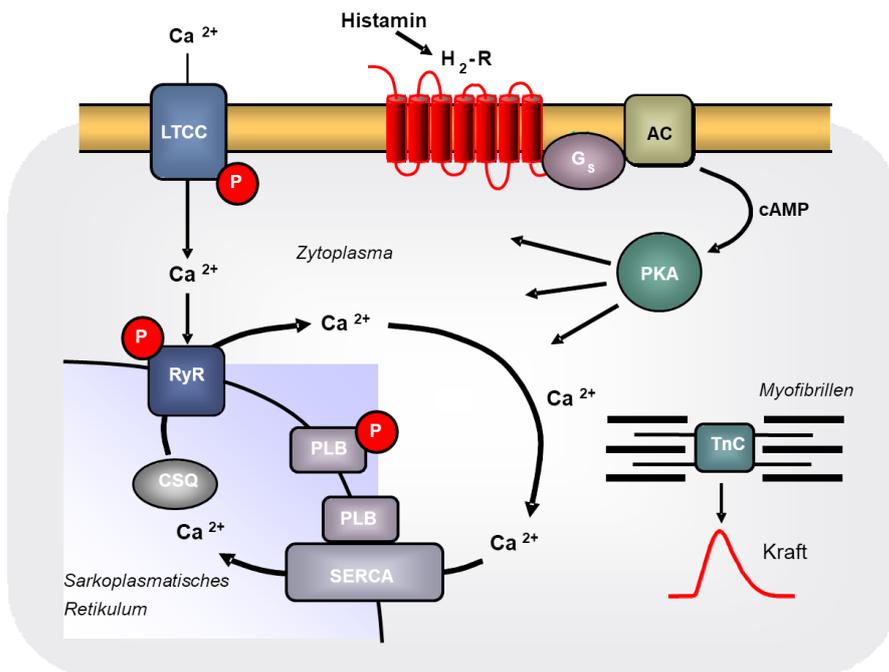


Abb. 2: Signaltransduktion von Histamin über den H_2 -Histamin-Rezeptor

Schematisch abgebildet ist eine Zelle mit G-Protein gekoppeltem H_2 -Histamin Rezeptor und die darüber stattfindende Aktivierung der Adenylylcyklase (AC) mit nachfolgender Phosphorylierung von Ryanodin-Rezeptor (RyR), Phospholamban (PLB) und L-Typ-Calcium-Kanal (LTCC). Darüber kommt es über die Erhöhung der Konzentration von intrazellulärem freiem Calcium (Ca^{2+}) zu einer Kontraktion. Das Ca^{2+} wird anschließend über das sarkoplasmatische Retikulum Calcium ATPase (SERCA-2a) aufgenommen.

2. Zielstellung

β -Adrenozeptor-Antagonisten sind in Rahmen der Behandlung von ischämischen Herzerkrankungen bekannt (Asanuma et al. 2006). Sie vermindern die Wirkung der positiv inotrop und positiv chronotrop wirkenden Katecholamine, senken dadurch den Sauerstoffbedarf des Herzens und führen somit zu einer Kardioprotektion. Im Gewebe von ischämischen Herzen wurde jedoch neben den Katecholaminen auch eine Erhöhung von Histamin und seinen Rezeptoren festgestellt. Die G-Protein-gekoppelten Histamin Rezeptoren sind über eine Aktivierung der Adenylylcyclase mit anschließendem cAMP-Anstieg an der Regulierung der Herzaktion beteiligt. Ebenso wurde in Gewebe von hypertrophierten Herzen eine Erhöhung von Mastzellen, welche Histamin speichern und vermehrt ausschütten können, gefunden. In Versuchen wurde gezeigt, dass eine Blockade von H_2 -Histamin-Rezeptoren den myokardialen Sauerstoffbedarf senken kann und somit kardioprotektiv wirkt (Asanuma et al. 2006). Dies ist vor allem bei Patienten mit chronischen Herzerkrankungen, wie z.B. der Herzinsuffizienz, von großer Bedeutung.

Ergänzend zu diesen Daten sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht werden, wie sich die Konzentration von Histamin in murinen Vorhofpräparaten durch verschiedene Substanzen, die in den Histaminmetabolismus eingreifen, beeinflussen lassen kann. Dabei soll neben den Einfluss auf die Synthese von Histamin auch der Einfluss auf den Histaminabbau untersucht werden.

Medikamente, die in den Histaminmetabolismus eingreifen können, indem sie die abbauenden Enzyme blockieren, werden z.B. in der Psychiatrie eingesetzt. Tranylcypromin ist ein Monoaminoxidase-Hemmer, der als Antidepressivum therapeutisch eingesetzt wird. Aminoguanidin, ein Hemmstoff der Diaminoxidase wurde auf seinen Einsatz in der Therapie von Diabetes mellitus untersucht (Reichel und Neundörfer 1996). Des weiteren werden H_2 -Histamin-Rezeptor-Inhibitoren in der Therapie von allergischen Erkrankungen eingesetzt (Jutel et al. 2009; Thangam et al. 2018).

Das Verständnis der Beeinflussbarkeit des Histaminspiegels ist vor allem in Hinsicht auf die hohe Zahl der an chronischer Herzerkrankung erkrankten Patienten von Bedeutung.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Die für die Kontraktionsversuche verwendeten transgenen Mäuse mit herzspezifischer H₂-Histamin-Rezeptorexpression und ihre Wildtyp-Geschwistertiere basierten auf der Aufzuchtlinie CD1 (Gergs et al. 2019). Die transgenen Mäuse wogen im Durchschnitt $36,2 \pm 0,9$ g und waren 205 ± 32 Tage alt. Die Wildtyp-Mäuse wogen durchschnittlich $36,3 \pm 0,8$ g und waren 168 ± 9 Tage alt. Es wurden in gleicher Anzahl weibliche, wie männliche Tiere verwendet.

Die Ernährung der Versuchstiere erfolgte mit handelsüblichem Labortierfutter und Wasser ad libitum. Die Haltung der Tiere erfolgte geschlechtergetrennt. Lediglich zur Paarung erfolgte eine Zusammensetzung der Mäuse. Als Grundlage für die Haltung und den Umgang mit den Versuchstieren lagen die entsprechenden Genehmigungen der Core-Facility Tierhaltung dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität vor (Az.: 42502-2-1078-MLU, 28.11.2011- 28.11.2016).

3.2. H₂-Histamin-Rezeptor überproduzierende Mäuse

3.2.1. Generierung von transgenen Mäusen

Die Kontraktionsversuche wurden mit einer transgenen Mauslinie, die das humane H₂-Rezeptor Gen im Herzen überexprimieren, durchgeführt. Die dafür benötigte cDNA des menschlichen H₂-Histamin-Rezeptors wurde dankenswerter Weise von R. Seifert (Med. Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt. Das cDNA-Fragment wurde dann in eine Expressionskassette, die den Promotor der α -Isoform der schweren Kette des Myosins (α -MHC) der Maus enthält, eingefügt (Abb.3). Damit wurde erreicht, dass die Sequenz des H₂-Histamin Rezeptors unter der Kontrolle des herzspezifischen Promotors steht. Die Expressionskassette enthielt zusätzlich einen Simian Virus 40 (SV40)-Poly-A-Signalsequenz, der die Transkription terminiert (Gergs et al. 2010; Gergs et al. 2019).

Abschließend erfolgte die Mikroinjektion der Expressionskassette in die befruchtete Eizelle von FVB/N-Mäusen. Die entstandenen transgenen Mäuse zeigten eine herzspezifische Überproduktion des H₂-Histamin-Rezeptors. Anschließend wurden die Tiere in einen CD1-Hintergrund eingekreuzt (Gergs et al. 2010; Gergs et al. 2019).

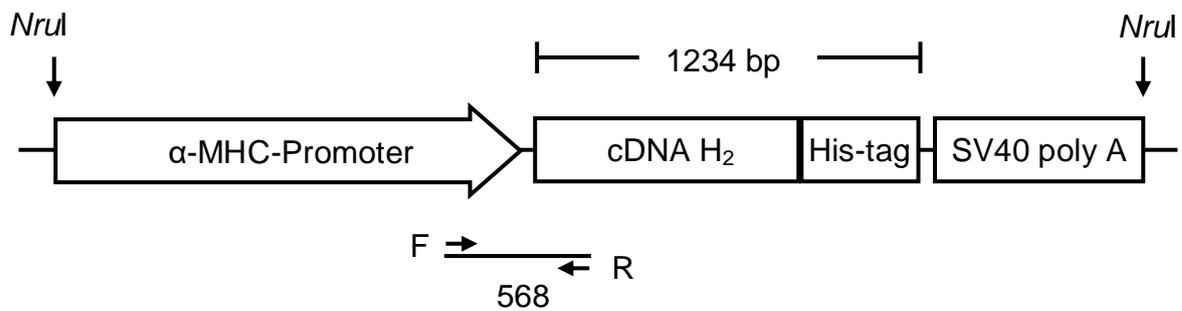


Abb. 3: Schematische Darstellung der α -MHC-H₂-Rezeptor-Expressionskassette

Die α -MHC-Expressionskassette wurde, um transgene Tiere mit einer herzspezifischen Überexpression des humanen H₂-Histamin Rezeptors zu generieren, in befruchtete Eizellen von Mäusen mikroinjiziert. Die H₂-cDNA enthält am C-Terminus einen His-tag (=6*Histidin). Die kodierende Sequenz enthielt 1234 Basenpaare (bp). Eine SV 40 poly-A-Signalsequenz terminierte die Transkription, die unter der Kontrolle des α -MHC Promotors der Maus stand. Mittels spezifischer Primer (F und R) konnte das transgene Gen in der DNA der Maus nachgewiesen werden. Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Größe von 568 bp. F = *Forward Primer*; R = *Reverse Primer*

3.2.2. Genotypisierung

3.2.2.1. Isolation der DNA

In üblicher Weise (z.B. Gergs et al. 2021b) wurde jeder Maus im Alter von vier Wochen ein ca. 5 mm langes Schwanzstück entfernt. Die Mäuse erhielten zur Identifizierung eine Ohrmarkierung. Das abgetrennte Gewebe wurde unter Zugabe von 700 μ l TE-/SDS-Puffer und 30 μ l Proteinase K proteolytisch aufbereitet. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Isolation der DNA (Sambrook et al. 1989; Wang und Storm 2006).

3.2.3. Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration der DNA wurde anhand ihrer optischen Dichte (OD) mittels Biophotometer (Eppendorf) in üblicher Weise bestimmt (z.B. Gergs et al 2021a). Zuerst erfolgte eine Kontrollwertbestimmung durch eine Leerwertmessung ohne DNA. Die Messung des DNA-Gehalts der Probe erfolgte dann anhand der Extinktion bei 260 nm (E_{260}). Bei einem OD_{260} -Messwert von 1,0 und einer Schichtdicke der Messküvette von 1 cm enthält die Probe 50 μ g/ml doppelsträngige DNA. Mit der Formel $E_{260} * 50 \mu\text{g/ml} * \text{Verdünnungsfaktor} = X \mu\text{g/ml}$ wurde der DNA-Gehalt bestimmt.

Durch die zusätzliche Bestimmung des Quotienten aus OD_{260} und OD_{280} kann die Qualität der Probe abgeschätzt werden. Von einer geringen Verunreinigung der DNA mit Proteinen und anderen Bestandteilen ist bei einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 auszugehen.

3.2.4. PCR-Amplifikation der DNA

Die Vervielfältigung des gesuchten DNA-Fragments erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Hausstandart (z.B. Gergs et al. 2021b). Zunächst erfolgte in einem 0,2 ml Eppendorfgefäß die Herstellung eines Reaktionsansatzes, der pro Probe

aus 1 µl extrahierter DNA, einem PCR-Reaktionspuffer mit 1,5 mM Magnesiumchlorid, 200 µM dNTP-Mix, 1 µM Forward-Primer, 1 µM Reverse-Primer und 2,5 U einer thermostabilen Taq-DNA-Polymerase bestand (siehe Anhang). Diese PCR-Ansätze wurden mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt und die PCR in einem Thermocycler der Firma Eppendorf durchgeführt. Das gesuchte PCR-Fragment hatte eine Größe von 568 Basenpaaren.

3.2.5. Agarosegelelektrophorese

In üblicher Weise wurde abschließend das gewonnene PCR-Produkt mittels einer Agarosegelelektrophorese beurteilt (z.B. Gergs et al. 2019). Diese erfolgt anhand der Eigenschaft, dass in einem Agarosegel kleine Moleküle im angelegten elektrischen Feld schneller wandern als große Moleküle. Die Proben wurden dazu mit 8 µl Ladepuffer (siehe Anhang) versehen und in die Geltaschen eines 1-prozentigen Agarosegels gefüllt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit einer Stromstärke von 80 mA erfolgte die Auftrennung des PCR-Produkts. Dieser Vorgang dauerte 45 Minuten. Die Größe der DNA-Fragmente wurde durch Einsetzen von Markern (DNA-Leitern), sowie der Verwendung einer Positiv- und Negativkontrolle unter UV-Licht und Einfärbung mit dem interkalierenden Farbstoff SafeRed beurteilt (Abbildung 8).

3.2.6. Untersuchung auf Proteinebene

Die nach den Kontraktionsversuchen eingefrorenen Herzmuskelpräparate wurden mittels Western-Blot-Analyse weiter untersucht. Es sollten die Enzyme des Histaminmetabolismus, N-Methyltransferase, Monoaminoxidase, Diaminoxidase und L-Histidindecaboxylase, nachgewiesen werden. Calsequestrin diente als Beladungskontrolle für die Gelelektrophorese. Die Untersuchungen erfolgten in üblicher Weise (z.B. Gergs et al. 2021b).

3.2.6.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

Die Vorhofpräparate wurden in einem Mikrodismembrator mit Wolfram-Karbid-Kugeln unter flüssigen Stickstoff bei 2400 rpm pulverisiert. Anschließend wurde eine Spatelspitze des pulvers mit 100 µl 10 mM NaHCO₃ und 21,3 µl SDS (20%) vermischt. Auf Eis erfolgte eine dreimalige Ultraschall-Homogenisation für je 15 Sekunden.

Die nachfolgende Gelelektrophorese zur Auftrennung nach Proteingröße wurde in SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt. Das Sammelgel enthielt dabei 4 % Polyacrylamid und das Trenngel 10 % Polyacrylamid (Porzio und Pearson 1977). Pro Spur wurden 100 µg Protein aufgetragen. Zur Kontrolle diente ein Molekularstandard der Firma Thermo Scientific, welcher zuvor bei 95°C 15 Minuten denaturiert wurde. Für die Gelelektrophorese wurde eine

vertikale Elektrophoresekammer (Hoefler SE 600; Hoefler; San Francisco; CA; USA) mit auf 4°C gekühlten Elektrophoresepuffer und konstanten Strom von 40 mA pro Gel verwendet.

Die im Gel getrennten Proteine wurden im elektrischen Feld mit einem Naßblotverfahren, bei konstant 4,5 Ah bei 4°C in einem Puffersystem aus 40 mM Na₂HPO₄ und 7,9 mM NaH₂PO₄ auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Qualität des Transfers wurde durch eine Kontrollfärbung der Membran mit Ponceau-Rot überprüft.

Abschließend konnten die Membranen direkt für den Immunoblot verwendet (3.2.6.3.) oder getrocknet und bei 4°C gelagert werden.

3.2.6.2. Nachweis der Enzyme im Western Blot

Der Nachweis der Monoaminoxidase A und B, N-Methyltransferase und Diaminoxidase erfolgte nachdem die zuvor mit Ponceau eigefärbten Membranen entsprechend der Größe der gesuchten Proteine zerschnitten wurde. Die Membranstreifen wurden in Plexiglaskammern überführt und die Ponceau-Färbung zweimal je 15 Minuten mit TBST-Puffer ausgewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden danach mittels einer zweistündigen Inkubation mit 2 % BSA in TBST- Puffer (Puffer A) blockiert.

Für den Calsequestrin Nachweis erfolgte das Blocken der Membran mit 5 % Milchpulver in TBST-Puffer. Zum Nachweis wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Calsequestrin verwendet.

Desweiteren wurden die Antikörper Anti-HMT, Anti-MAOB, Anti-ABP-1 (=DAO) und anti-HDC verwendet (siehe Anhang).

Nach der Blockierung der Membran erfolgte die Inkubation mit 1:1000 in Puffer A verdünnten Antikörpern über Nacht bei 4°C. Der Calsequestrin-Antikörper wurde jedoch im Verhältnis 1:10000 in 5 % Milchpulver in TBST-Puffer (Puffer B) verdünnt. Am nächsten Tag wurden die Membranen drei Mal für zehn Minuten in TBST gewaschen. Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur eine zweistündige Inkubation mit 1:2000 in Puffer B verdünnten anti-rabbit-IgG, welcher an eine alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war. Danach wurden die Membranen dreimalig für je zehn Minuten in TBST gewaschen und abschließend für zwei mal zwei Minuten in AP-Puffer inkubiert. Beschrieben wird dies in Publikationen aus dem hiesigen Institut (Gergs et al. 2010; Gergs et al. 2020; Neumann et al. 2021a).

Die Banden wurden dann mit einem Fluoreszenzsubstrat der alkalischen Phosphatase (ECF) dargestellt und einem Typhoon-Multi-Mode Imager sichtbar gemacht und auf einen Computer übertragen.

3.2.7. Färbung und histologische Untersuchung

Um histologische Veränderungen des Myokards der transgenen Mäuse zu beurteilen, wurden Färbungen an Wildtyp- und transgenen-Präparaten durchgeführt. Die

Untersuchungen wurden an Vorhöfen von transgenen (TG) und Wildtyp (WT) Mäusen durchgeführt. Die Präparate wurden zuerst in Formalinlösung fixiert und mit Hämatoxylin-Eosin sowie mit Masson-Goldner-Trichomfärbung, welche zur Darstellung von Bindegewebe dient, eingefärbt.

Anschließend wurde das Herzvorhofgewebe immunhistochemisch untersucht (nach Standardprotokoll) (Buchwalow und Böcker 2010). Dazu wurde das Gewebe mit verschiedenen Antikörpern auf das Vorhandensein der entsprechenden Enzyme untersucht. In der Tab. 1 ist eine Übersicht über die verwendeten Antikörper einzusehen.

Diese Versuche erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Igor B. Buchwalow aus dem Institut für Hämatopathologie in Hamburg.

Tab. 1: Verwendete Antikörper für immunhistochemische Darstellungen

Antikörper	Referenz (siehe Anhang)	Verdünnung
Monoamine oxidase A (N-Term)	Antikoerper-online	1:20
Monoamine oxidase B	GeneTx	1:200
Histamine N-Methyltransferase (HMT)	Antikoerper-online	1:50 und 1:10
Diaminoxidase (ABP1, mouce)	Acris	1:100 und 1:500

3.3. Radioenzymatische Messungen von Enzymaktivität und Histamingehalt

Die radioenzymatischen Messungen von Enzymaktivitäten und Histamingehalt erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. habil. W. Agnieszka Fogel der Medizinischen Universität in Lodz (Polen). Dazu wurden einige der untersuchten Proben an das Institut in Lodz geschickt. Dort erfolgte die Aufarbeitung und Untersuchung (Ciepluch et al. 2012; Shaff 1979).

3.4. Messung des Histamingehaltes mittels HLPC

Die Spiegel von Histamin und N-Methylhistamin wurden mittels high-performance liquid chromatography (HLPC) mit fluorometrischer Messung bestimmt. Dazu wurden Herzgewebe, isolierte Kardiomyozyten, sowie Serum und Vollblut von Mäusen untersucht (Paijo et al. 2017).

Diese Messung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie in Hannover unter der Leitung von Herr Prof. Dr. Volkhard Kaefer.

3.5. Kontraktionsversuche

3.5.1. Vorbereitung des Organbades

Vor jedem Versuchsdurchgang wurde eine physiologische Salzlösung die sog. Tyrode-Lösung frisch hergestellt, welche Elektrolyte und Glucose in einem bestimmten Verhältnis

enthält. Diese diente dazu ein physiologisches Umgebungsmilieu für die isolierten linken und rechten Vorhöfe im Organbad zu schaffen.

Für die Herstellung der Tyrode-Lösung wurden drei verschiedenen Stammlösungen verwendet (Zusammensetzung s. Anhang). Es wurden 40 ml Stammlösung I, 38 ml Stammlösung II und 20 ml Stammlösung III miteinander vermischt und mit destillierten Wassern auf 1 l aufgefüllt. Die entstandene Lösung wurde daraufhin 30 min mit Carbogen © (95% O₂ und 5% CO₂) begast. Danach wurden 0,8ml Kalziumchlorid-Lösung (33,2 g CaCl₂/100 ml H₂O), 1g Glucose, 49,9mg Ascorbinsäure und 19mg Na⁺-EDTA hinzugefügt. Am Ende betrug die Konzentration von CaCl₂ 1,8mM. Die Tyrode-Lösung wurde während des gesamten Versuches auf eine Temperatur von 37°C angewärmt und diese Temperatur kontinuierlich gehalten. Um einen stabilen pH-Wert zu erhalten wurde die Lösung von der Herstellung bis zum Versuchsende mit Carbogen begast.

3.5.2. Vorbereitung und Kalibrierung der Messanlage

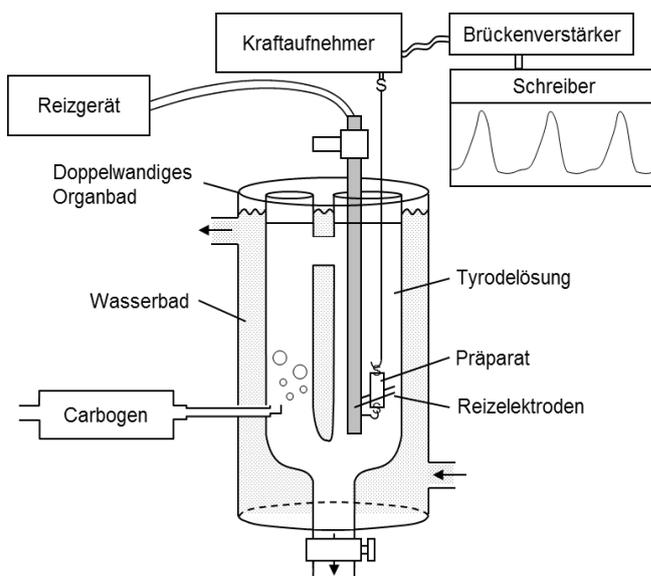


Abb. 4: Kontraktionskraftmessanlage

In der Abbildung ist ein doppelwandiges Organbad, mit einem äußeren Wasserbad (37°C) und einen mit Tyrode-Lösung gefüllten und mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begasten Innenraum, schematisch abgebildet. Zwischen den Reizelektroden ist das Vorhofpräparat über Haken befestigt. Der Schreiber zeichnet über den Kraftaufnehmer und den Brückenverstärker verarbeitete Muskelsignale auf. Dies geschah zum Einen in Form von Mechanogrammen und zum Anderen über eine digitalisierende Hardware auf ein Computerbildschirm.

Die Versuche wurden in doppelwandigen Organbädern mit je einem Volumen von 10 ml und Platz für ein Vorhofpräparat durchgeführt (Abbildung 4). Das Inneren der Gefäße wurde mit der beheizten Tyrode-Lösung gefüllt und über einen Carbogenanschluss kontinuierlich begast. Im äußeren Teil des doppelwandigen Gefäßes befand sich Wasser, dass über einen

Kreislauf kontinuierlich erwärmt wurde. Darüber wurde die Tyrode-Lösung im Inneren des Gefäßes indirekt während des kompletten Versuchs temperiert.

Die Vorhofpräparate wurden über zwei starre Metalldrähte befestigt und in das Innere des Organbades eingehängt. Über den oberen Metalldraht besteht eine Verbindung zu einem Kraftmesser, der über einen Verstärker die Kontraktionskraft der Vorhöfe an einen Schreiber bzw. über eine digitalisierende Hardware zum Computer weiterleitet.

In dem Inneren des Organbades befanden sich zwei Reizelektroden zur Reizung der isolierten linken Vorhofpräparate. Die isolierten rechten Vorhofpräparate kontrahierten bei intakten Sinusknoten spontan und mussten somit nicht stimuliert werden. Lediglich zu Versuchsbeginn war bei einigen rechten Vorhofpräparaten eine kurze Stimulation nötig. Am Schreiber konnte somit die spontane Schlagfrequenz der rechten Vorhofpräparate dargestellt werden.

Die Kalibrierung der Messanlage erfolgte vor jedem Versuchsdurchgang. Dazu wurde zunächst ein Nullpunkt festgelegt. Danach wurde ein 500 mg schweres Gewicht, das eine definierte Kraft von 5 mN erzeugt, an den oberen Metalldraht des Organbades befestigt. Somit wurde ein Referenzwert für die nachfolgenden Messungen erstellt und es war möglich die Zugkraft der Vorhofpräparate zu bestimmen.

3.5.3. Narkotisierung und Entnahme der Herzen

Die Tiere wurden vor der Präparation gewogen um die benötigte Menge Narkosemittel zu berechnen.

Zu Beginn der Präparation wurden den Mäusen 500 IE Heparin intraperitoneal injiziert, um einer Thrombenbildung während der Präparation und des Versuches vorzubeugen.

Die Narkotisierung der Mäuse erfolgte mit intraperitoneal appliziertem Pentobarbital (50-75 mg/kg Körpergewicht). Durch die damit erzielte Bewusstlosigkeit und Analgesie wurde die Katecholaminausschüttung während der Präparation gesenkt. Die Narkose wurde so gewählt, dass die Mäuse nicht unmittelbar einen Atemstillstand erlitten und somit die Oxygenierung des Herzmuskels zu keiner Zeit gefährdet war.

Sobald die Bewusstlosigkeit der Mäuse eingetreten war, wurden sie an den Extremitäten fixiert und der Kopf überstreckt. Der Thorax wurde mit einer Schere von ventral eröffnet. Dies erfolgte mit einem vertikalen Schnitt mit Bereich des Abdomens, bei dem zuerst Fell und Haut durchtrennt wurden. Danach folgten zwei weitere Schnitte entlang des rechten bzw.

linken Rippenbogens. Mit diesen wurden die Pleura- und Peritonealhöhle eröffnet. Mit einer Klemme, die am distalen Sternum fixiert wurde, konnten die Rippen nach kranial umgeschlagen werden und so der komplette Thoraxraum eingesehen werden. Es erfolgte eine Spülung mit beheizter und begaster Tyrode-Lösung um die Vitalität des Herzmuskels nicht zu gefährden. Das Herz wurde anschließend mit einer Schere von der Vena cava und des Aortenbogens getrennt und aus dem Thorax entnommen. Das Präparat wurde sofort in ein Gefäß mit der vorbereiteten Tyrode-Lösung überführt. Es erfolgte eine vorsichtige Kompression des Herzens, um möglichst viele Blutreste aus dem noch schlagenden Herzen zu entfernen. Damit sollte einer intrakardialen Thrombenbildung entgegengewirkt werden.

3.5.4. Präparation der Vorhöfe

Nach der Entnahme der Herzen wurden sie in eine mit vorgewärmter Tyrode-Lösung und mit Carbogen begasten Präparierschale gelegt. Zuerst wurde das Präparat mit Nadeln fixiert und nochmals komprimiert um Blutreste zu entfernen. Ebenso wurden evtl. mit entnommene Lungen- und andere Gewebereste entfernt, um einen genauen Überblick über die Anatomie des Herzens zu bekommen. Danach wurde der linke Vorhof vorsichtig mit einer Schere vom restlichen Herz getrennt. Am so entstandenen, isolierten linken Vorhofpräparat wurde am oberen, sowie am unteren Pol mit Hilfe einer Pinzette und einer Klemme je ein Haken angebracht. Über diese Metallhaken wurde das exzidierte linke Vorhofpräparat in die innere Kammer des Organbades eingehängt und in die darin befindliche begaste Tyrode-Lösung getaucht. Unmittelbar nach dem Einbringen in das Versuchsgefäß wurde begonnen das linke Vorhofpräparat über die Elektroden zu reizen.

Um die noch schlagenden rechten Vorhofpräparate zu isolieren, wurden Reste von Gefäßen und Perikard vorsichtig abpräpariert. Besondere Vorsicht galt den Sinusknoten im Bereich der Einmündung der Vena cava superior um ihn bei der weiteren Präparation unbeschädigt zu lassen. Der rechte Vorhof wurde mit einer Schere vom restlichen Herz getrennt. In dem jetzt isolierten Vorhofpräparat wurden ebenso zwei Haken befestigt und das Präparat in das Organbad eingehängt. Es erfolgte ebenso wie bei den linken Vorhofpräparaten eine Vorspannung der Präparate, um eine maximale Kraftentwicklung zu erzielen. Eine elektrische Reizung war bei intakten Sinusknoten nicht notwendig und wurde lediglich bei schwacher spontaner Eigenkontraktion zu Beginn des Versuches angewandt. Über die Kraftmesser wurde bei den rechten Vorhöfen die Schlagfrequenz gemessen und aufgezeichnet.

Vom Zeitpunkt des Einhängens der Vorhofpräparate bis zum endgültigen Beginn des Versuches wurden die einzelnen linken und rechten Vorhofpräparate jeweils alle 10 min

dreimal mit frischer Tyrode-Lösung gespült und nachgespannt. Dies dauerte ca. eine halbe Stunde und führte zu einer ausgeglichenen Kraftentwicklung bzw. Schlagfrequenz.

Diese Vorbehandlung diente dazu eine möglichst stabile Ausgangslage für die verschiedenen folgenden Experimente zu haben.

Wurden bei den Aufnahmen der ersten halben Stunde Arrhythmien der Vorhöfe festgestellt, die auch nach dem mehrmaligen Wechseln der Tyrode-Lösung, sowie der Optimierung der Vorspannung nicht sistierten, so wurden diese Vorhöfe aus der Auswertung der Versuche ausgeschlossen.

3.5.5. Vorbereitung der menschlichen Vorhofpräparate

Die verwendeten menschlichen Vorhofpräparate stammten aus der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikum Halle (Saale). Entnommen wurden die rechten Vorhoföhren bei herzchirurgischen Eingriffen, bei denen eine Herz-Lungen-Maschine verwendet wurde. Die Patienten wurden vor dem Eingriff ausführlich durch die behandelten Ärzte über die Entnahme der Präparate und Nutzung in der Forschung aufgeklärt und willigten schriftlich ein.

Die Präparate wurden sofort nach der Entnahme in frischer Tyrode-Lösung gelagert und bei 5°C gekühlt transportiert. Die Tyrode-Lösung entspricht exakt der Lösung die auch bei den Versuchen mit murinen Vorhofpräparaten verwendet wurde. Jedoch wurde die Glucose erst zusammen mit dem Präparat hinzugegeben, damit eine bakterielle Besiedelung der Tyrode-Lösung verhindert werden konnte.

Die weitere Präparation erfolgte, wie auch bei den murinen Vorhofpräparaten, in erwärmter und begaster Tyrode-Lösung in einer Präparierschale. Das Vorhofohr wurde zuerst aufgeschnitten und das Trabekelwerk dargestellt. Anschließend wurden einzelne Präparate, mit je einem Trabekel, erstellt. Abschließend wurden die Präparate mit je zwei Haken versehen und in die vorbereitete (s. 3.5.2) Versuchsanlage eingehängt.

Die menschlichen Vorhofpräparate wurden dann, wie auch die linken murinen Vorhofpräparate stimuliert und die Kraft aufgezeichnet. Die Substanzgabe erfolgte nach einer individuellen Äquilibrationsphase, in der die Präparate regelmäßig gespült und nachgespannt wurden, bis eine einheitliche Ausgangslage erreicht war.

Aus jedem Vorhofohr wurden pro Versuchstag vier Präparate entnommen und parallel untersucht. Die Kontraktilität hing dabei vor allem von der präzisen Präparation der eingehängten Präparate ab. So zeigten sich bei den einzelnen Präparaten eines Patienten verschiedene Kraftmaxima. Dies lässt sich durch die unterschiedlichen Konzentrationen von kontraktilen Gewebe in einem Vorhofohrpräparat beschreiben. Nach dem Versuch wurden die Präparate eingefroren.

Die Namen der Patienten wurden dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie Halle (Saale) aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht übermittelt. Den entnommenen Präparaten waren Nummern zugeordnet.

3.5.6. Versuchsdurchführung

Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurde, wie in Abschnitt 3.5.4. bereits beschrieben, eine 30-minütige Adaptationszeit mit dreimaligen Spülen der Vorhofpräparate mit frischer Tyrode-Lösung, eingehalten. Die Vorhofpräparate befanden sich somit in einer stabilen Ausgangslage für die folgenden Versuche (=Kontrolle).

Es wurde je nach Versuchsanordnung verschiedene Substanzen (siehe Abbildung 5) in das Organbad appliziert und die Reaktion der Vorhöfe als Mechanogramm aufgezeichnet.

Zum Ende des jeweiligen Experiments erfolgte eine dreimalige Spülung der Vorhofpräparate mit jeweils 10 ml frischer Tyrode-Lösung (=Badwechsel) über 30 min, um die Vorhofpräparate in ihre Ausgangslage zurückzusetzen. Danach wurde in den meisten Fällen eine Kontrolle mit Isoprenalin und Calciumchlorid (CaCl_2) durchgeführt um die Funktionalität der Präparate am Ende der Versuchsreihe zu überprüfen.

Nach erfolgtem Versuch wurden die Vorhofpräparate zusammen mit den restlichen Herzgeweben bei -80 °C eingefroren.

Alle Versuche wurden an transgenen H_2 -Histamin-Rezeptor-überexprimierten Mäusen und zur Kontrolle an Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Bei jedem Experiment wurden Messungen an beiden Maus-Typen mit den zu untersuchenden Substanzen und zur Kontrolle mit dem jeweiligen Lösungsmittel durchgeführt.

Die für die Versuche verwendeten Substanzen stammen von verschiedenen Firmen, die genaue Auflistung befindet sich im Anhang. Die Substanzen wurden nach ihrer jeweiligen Vorschrift im Institut gelagert und für die Versuche entsprechend der Vorschriften gelöst bzw. angesetzt (s. Anhang).

Eine Übersicht über die Substanzen ist in der Tab. 2 dargestellt.

Die Zugabe von Histamin, Histidin bzw. Isoprenalin zur Erstellung einer Konzentration-Wirkungskurve (KWK) erfolgte jeweils in einem Abstand von 5 Minuten beginnend von der vorherigen Konzentration.

Bei den Spülvorgängen wurde das Organbad mit frischer, vorgeheizter und begaster Tyrode-Lösung erneuert. Das Spülen wurde solange durchgeführt bis auf dem am Schreiber aufgezeichneten Mechanogramm die Ausgangslage wieder erreicht war. In der Regel dauerte dies 30 Minuten und erforderte drei- bis fünfmaliges Spülen. Dazu wurde über einen

Hahn am unteren Ende des Organbades die alte Lösung abgelassen und mit einer Pipette 10 ml frische Lösung in das Bad gegeben. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Schritte der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente dargestellt.

3.5.7. Versuchsprotokolle

Die Protokolle (Abb. 5) wurden an Wildtyp (WT) und transgenen (TG) linken und rechten murinen Vorhofpräparaten mit gleichem Ablauf durchgeführt. Es erfolgte außerdem jeweils eine Kontrolle mit dem Lösungsmittel der Substanz.

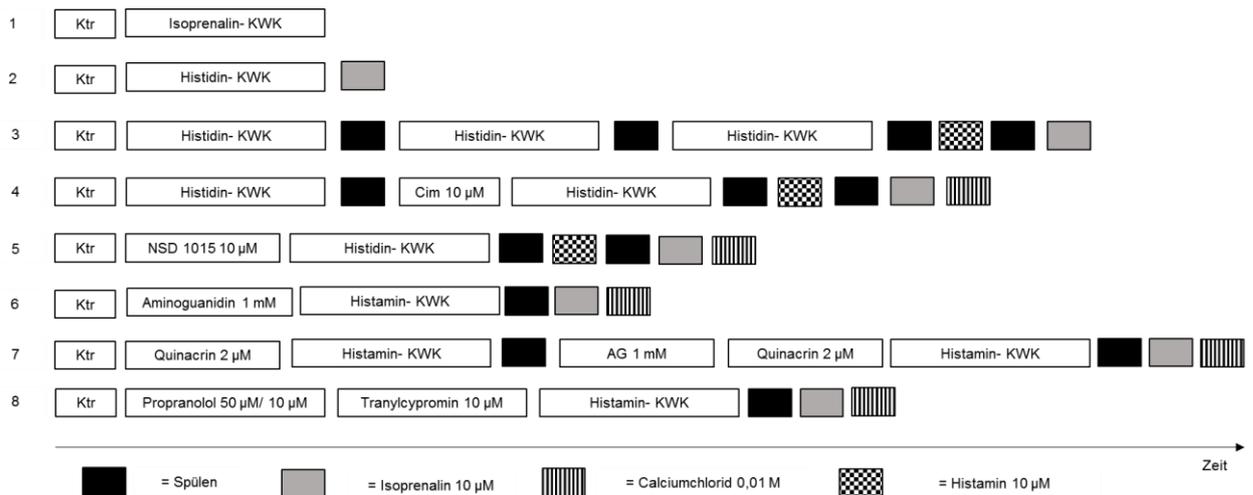


Abb. 5: Schematische Darstellung der Versuchsprotokolle

Zu Beginn der Versuche wurde jeweils eine Kontrollmessung (Ktr) durchgeführt. Danach folgte je nach Versuchsanordnung eine Isoprenalin-KWK (0,01 mN bis 1 µM), Histidin-KWK (0,1 µM bis 0,01 M) oder Histamin-KWK (1nM bis 10 µM). Desweiteren erfolgte am Ende die Kontrolle mit 10 µM Isoprenalin, 0,01 M Calciumchlorid oder einer einmal Gabe von 10 µM Histamin.

Ktr: Der Kontrollwert gibt die Kraft, bzw. Frequenz an die zum Ende der Vorbereitungsphase vorlag. In dieser Phase, die im Durchschnitt 30 Minuten dauerte, erfolgten das dreimalige Spülen und das individuelle Vorspannen der Vorhofpräparate um eine gute Ausgangslage zu erreichen. Anschließend erfolgte die Gabe der Substanzen je nach Versuchsvorschrift.

1: Bei diesem Versuchsablauf wurde im Anschluss an die Vorbereitungsphase eine Isoprenalin-KWK von 0,01 mN bis 1 µM erstellt. Diese Versuchsanordnung wurde nur an WT-Vorhofpräparaten durchgeführt um die präzise Durchführung der Präparation, sowie den Umgang mit der Versuchsanlage zu erlernen.

2: Nach der Kontrolle erfolgte die Gabe von Histidin in Form einer KWK von 0,1 µM bis 0,01 M. Zum Schluss wurde 10 µM Isoprenalin zu den Präparaten appliziert.

3: Im Anschluss an die Kontrollmessung wurde eine Histidin-KWK von 0,1 µM bis 0,01 M durchgeführt. Im Anschluss erfolgten das Spülen der Präparate mit Tyrode-Lösung, sowie

das nochmalige Durchführen einer Histidin-KWK. Der Letzte Schritt wurde nochmals wiederholt. Zum Schluss erfolgte die Gabe von 10 μ M Histamin und 10 μ M Isoprenalin zur Vitalitätskontrolle der Vorhofpräparate. Dieser Versuchsdurchlauf diente der Beurteilung der Abhängigkeit der Inotropie, bzw. Chronotropie von der Zeit, die die Vorhofpräparate in der Versuchsanlage waren oder ob es zu einer Desensitivierung des H₂-Histamin-Rezeptors im Laufe des Versuchs gekommen ist.

4: Nach der Kontrollmessung wurde eine Histidin-KWK von 0,1 μ M bis 0,01 M durchgeführt. Nach einem 30-minütigen Spülvorgang mit frischer Tyrode-Lösung erfolgte die 30-minütige Inkubation mit 10 μ M Cimetidin und eine nachfolgende erneute Histidin-KWK. Anschließend erfolgte nach dem erneuten Badwechsel eine Kontrolle mit einer Einmalgabe von 10 μ M Histamin und 10 μ M Isoprenalin.

5: Nach analogen Versuchsbeginn erfolgte die 30-minütige Inkubation mit 10 μ M NSD 1015. Danach erfolgte eine Histidin-KWK. Dabei wurde zuerst eine Histidinkonzentration von 0,1 μ M appliziert und diese schrittweise bis zur maximalen Konzentration von 0,01 M erhöht. Nach Erreichen der maximalen Histidinkonzentration erfolgte das Auswaschen des Histidins mit neuer Tyrode-Lösung. Anschließend erfolgte die einmalige Gabe 10 μ M Histamin. Es folgte nochmals ein Spülvorgang und abschließend die Gabe von 10 μ M Isoprenalin und 0,01 M Calciumchlorid.

6: Nach der Kontrollmessung wurden die Vorhofpräparate 30 Minuten mit 1 mM Aminoguanidin inkubiert. Danach erfolgte eine Histamin-KWK von 1 nM bis 10 μ M. Nach Abschluss der KWK wurde für 30 min mit frischer Tyrode-Lösung gespült und abschließend eine Kontrolle mit 10 μ M Isoprenalin und 0,01 M durchgeführt.

7: In dieser Versuchsreihe erfolgte zuerst die Inkubation mit Quinacrin (2 μ M). Anschließend wurde eine Histamin-KWK von 1 nM bis 10 μ M angeschlossen. Nach einem 30-minütigen Spülvorgang wurden die Vorhofpräparate zuerst für 10 Minuten mit 1 mM Aminoguanidin und danach für 30 Minuten mit 2 μ M Quinacrin inkubiert. Darauf erfolgte eine erneute Histamin-KWK. Zum Ende des Versuchs wurde noch mal für 30 Minuten gespült und zum Ende eine Kontrolle mit 10 μ M Isoprenalin und 0,01 M durchgeführt.

8: Zuerst erfolgte nach der Kontrolle eine 10-minütige Inkubation der Vorhofpräparate mit Propranolol, um das endogen im Gewebe enthaltene Noradrenalin zu entfernen. Die linken Vorhofpräparate wurden mit 50 μ M und die rechten Vorhöfe mit 10 μ M Propranolol versetzt. Danach wurde 10 μ M Tranylcypromin appliziert und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine Histamin-KWK von 1 nM bis 10 μ M. Nach der KWK wurde für 30 Minuten und

mit dreimaligem Badwechsel gespült und abschließend mit 10 µM Isoprenalin und 0,01 M Calciumchlorid eine Kontrolle durchgeführt.

3.5.8. Verwendete Substanzen und deren Wirkmechanismus

Die für die Versuche verwendeten Substanzen wurden nach der jeweiligen Vorschrift im Institut gelagert und für die Versuche entsprechend der Vorschriften gelöst bzw. angesetzt.

Tab. 2: Verwendete Substanzen und ihre Wirkungen

Wirkstoff	Wirkung	Referenz
Isoprenalin	Synthetisch hergestelltes Noradrenalin-Derivat; =Sympathomimetikum: wirkt über die Stimulierung der β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren positiv inotrop und chronotrop	(Aktories et al. 2017)
Histidin	basische Aminosäure mit einem Imidazolring; über die L-HDC kann Histamin aus Histidin synthetisiert werden	(Aktories et al. 2017, Brunton et al. 2017)
Histamin	Biogenes Amin; wirkt als H_2 -Rezeptor-Agonist am Herzen positiv inotrop und chronotrop	(Matsuda et al. 2004)
Cimetidin	H_2 -Histamin Rezeptor Antagonist	(Blum und Siewert 1981)
NSD 1015	Unspezifischer Hemmer der L-HDC	(Hakason et al. 1971)(Dluzen et al. 1992)
Aminoguanidin	Hemmstoff der DAO	(Nilsson B. 1999)
Quinacrin	Hemmstoff der NMT	(Hui et al. 1985)
Propranolol	Nicht-selektiver Antagonist an β -Adrenozeptoren	(Aktories et al. 2017)
Tranlycypromin	Nicht-selektiver, irreversibler Hemmstoff der MAO	(Aktories et al. 2017)

3.6. Statistische Auswertung

Die angegebenen Daten sind arithmetische Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Mittels T-Test erfolgte die statistische Analyse für verbundene und unverbundene Proben. Die Berechnung der EC_{50} -Werte erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.0 für Windows (GraphPad Prism Inc., San Diego, USA). Der negative dekadische Logarithmus der EC_{50} -Werte wird mit pEC_{50} bezeichnet. Die Zahl der jeweils durchgeführten Einzelversuche wird mit „n“ dargestellt.

4. Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente zur Histaminsynthese und dem Histaminmetabolismus im Mausherz wurden an transgenen Mäusen durchgeführt. Dazu wurden Mäuse generiert, die eine Überproduktion des menschlichen H₂-Histamin-Rezeptors in Herzmuskelzellen haben. Zur Kontrolle erfolgten alle Versuche an nicht veränderten Wildtyp-Mäusen. Äußerlich, sowie in ihrer Entwicklung, waren zwischen den Mäusen keinerlei Unterschiede feststellbar. Eine Differenzierung der Tiere war nur mittels Genotypisierung möglich. Bei der Beurteilung der entnommenen Herzen waren morphologisch keine Anomalien erkennbar.

4.1. Genotypisierung der Versuchsmäuse

Aus Schwanzbiopsien der Mäuse wurde wie in 3.2.1.-3.2.5 beschrieben die genomische DNA extrahiert und eine PCR durchgeführt, um zu überprüfen, ob transgene Tiere vorlagen. Somit wurde gesichert in welchen der verwendeten Tiere der herzspezifische H₂-Histamin-Rezeptor im Genom vorlag.

Mittels Photometer erfolgte im Vorfeld eine Qualitätsbestimmung der DNA. Dazu wurde der Quotient der optischen Dichte (OD) gemessen und aufgrund der Ergebnisse (zwischen 1,8 und 2,0) ein hoher Reinheitsgrad der DNA ermittelt.

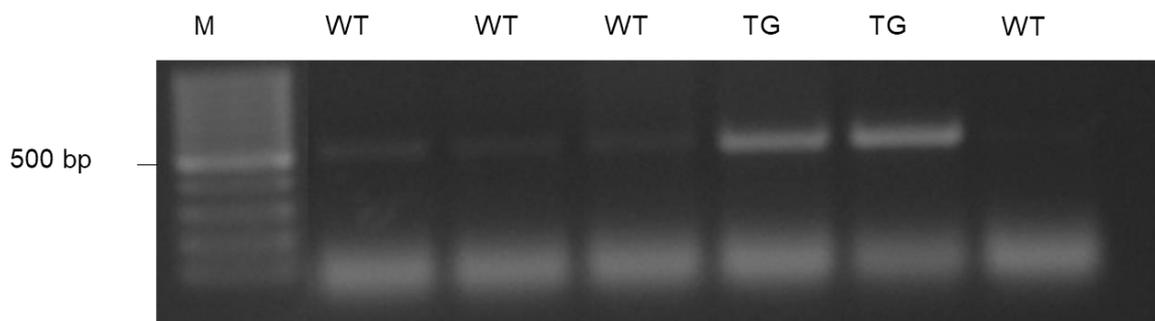


Abb. 8: Genotypisierung der Versuchstiere durch PCR

Gezeigt sind die Ergebnisse einer Agarosegelelektrophorese. Die durch PCR amplifizierten DNA-Proben der Versuchstiere wurden auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die gesuchte DNA-Sequenz hatte eine Länge von 500 Basenpaaren (bp). Zur Beurteilung der Länge der DNA-Fragmente wurde eine 100 bp-DNA-Leiter am linken Rand mit aufgetragen. M=Marker, TG=transgenes Tier; WT=Wildtyp Tier.

4.2. Kontraktionsversuche an linken Vorhofpräparaten

Für die Kontraktionsversuche wurden die Herzen der verwendeten Mäuse, wie in Kapitel 3.5. beschrieben präpariert und die isolierten linken Vorhöfe anschließend in die Versuchsanlage eingespannt. Nach einer Vorbereitungsphase, in der die Präparate gespannt und jeweils

dreimal gespült wurden, wurde mit den verschiedenen Versuchen begonnen. Die Versuche erfolgten jeweils an den linken Vorhöfen von Wildtyp-Mäusen und transgenen H₂-Histamin-Rezeptor überexprimierenden Mäusen parallel. Ein Teil der Wildtyp- und transgenen isolierten Vorhöfe erhielt als Kontrolle nur das Lösungsmittel der jeweiligen Substanz. Die Versuchsabläufe sind in der Abb. 5 schematisch dargestellt und im Detail beschrieben.

4.2.1. Wirkung von Isoprenalin

Die ersten Versuche wurden zur Validierung der Methode an Wildtyp-Mäusen mit Isoprenalin-KWKs durchgeführt. Isoprenalin ist ein nicht-selektives β -Sympathikomimetikum, welches am Herzen durch die Stimulation von β_1 -Rezeptoren einen positiv chronotropen und inotropen Effekt besitzt.

Bei einer Vorspannung von ca. 5 mN und einer elektrischen Reizung von 1 Hz besaßen die linken Vorhofpräparate eine basale Kraft von $3,03 \pm 0,41$ mN. Den Präparaten wurden kumulative Dosen von 0,1 nM bis 1 μ M Isoprenalin appliziert und so eine KWK erstellt (Abb. 6). Bei einer Konzentration von 3 nM im Organbad zeigte sich ein Kraftanstieg um $1,45 \pm 0,27$ mN gegenüber der Ausgangslage (n=8). Die maximale Kraft dieser KWK betrug $7,75 \pm 0,07$ mN und der pEC₅₀ Wert lag bei $8,18 \pm 0,26$.

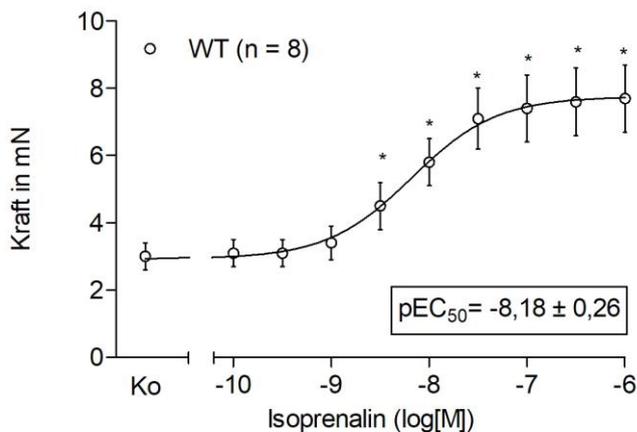


Abb. 6: Wirkung von Isoprenalin an isolierten linken Vorhofpräparaten

Dargestellt ist der Anstieg der Kraft in mN während der kumulativen Gabe von Isoprenalin von 0,1 nM bis 1 μ M bei linken Vorhofpräparaten von Wildtyp-Mäusen. Die Kontrollmessung (Ko) zu Beginn beschreibt die Ausgangslage der Kraft.

n=8; * p<0,05 vs. Ko., Ordinate: Kraft in mN, Abszisse: Isoprenalin-Konzentration.

4.2.2. Auswirkung auf die Hemmung der L-Histidindecaboxylase durch NSD 1015

NSD 1015 ist ein Hemmstoff des Enzyms L-Histidindecaboxylase (HDC), welches Histidin zu Histamin decarboxyliert. Bei dieser Versuchsreihe erfolgte zu Beginn eine 30-minütige Inkubation mit 10 μ M NSD 1015. Danach erfolgte die kumulative Gabe von Histidin (von 0,1 μ M bis 0,01 M).

Die TG Vorhöfe besaßen eine basale Kraft von $8,30 \pm 1,78$ mN, diese fiel im Laufe der KWK auf $6,84 \pm 1,40$ mN ab ($n= 5$). Zu der Kontrollgruppe, welche nicht mit NSD 1015 vorinkubiert wurde, bestand kein Unterschied. Hier fiel die Kraft im Verlauf der KWK von $6,04 \pm 0,947$ mN auf $4,80 \pm 0,778$ mN ab ($n= 5$). Die linken WT-Vorhöfe zeigten bei der Vorinkubation mit NSD 1015 keinen Unterschied im Vergleich zu den linken WT-Präparaten ohne NSD 1015 vorinkubation.

Während der 30-minütigen Inkubation mit NSD 1015 zeigte sich bei den transgenen linken Vorhöfen, wie auch den Wildtyp-Vorhöfen ein leicht positiv inotroper Effekt (Jung 2019). Bei den transgenen Präparaten stieg die Kraft von $7,48 \pm 1,57$ mN auf $8,65 \pm 2,10$ mN (Kraftanstieg um 15,6%), wo hingegen bei den Kontrollen ohne die Applikation von NSD 1015 eher eine Kraftabnahme von $7,12 \pm 1,76$ mN auf $6,37 \pm 1,58$ mN zu verzeichnen war. Dieser Effekt zeigte sich auch bei den WT-Vorhöfen. Hier erhöhte sich die Kraft von $7,12 \pm 1,40$ auf $9,72 \pm 1,69$ mN (Kraftanstieg um 36,5%), wohingegen die Kraft bei den Kontroll-Präparaten von $7,18 \pm 0,6$ mN auf $6,01 \pm 0,36$ mN sank. In diesen Ergebnissen zeigte sich, wie in Abbildung 7 zu sehen, ein von den H₂-Histamin Rezeptorstatus unabhängiger positiv inotroper Effekt von NSD 1015. Die Kraft stieg dabei bei den WT Vorhöfen auf $135,25 \pm 10,0$ %. Bei den transgenen Vorhöfen zeigte sich hingegen ein geringerer Effekt mit einer Kraftzunahme von $119,9 \pm 4,01$ %.

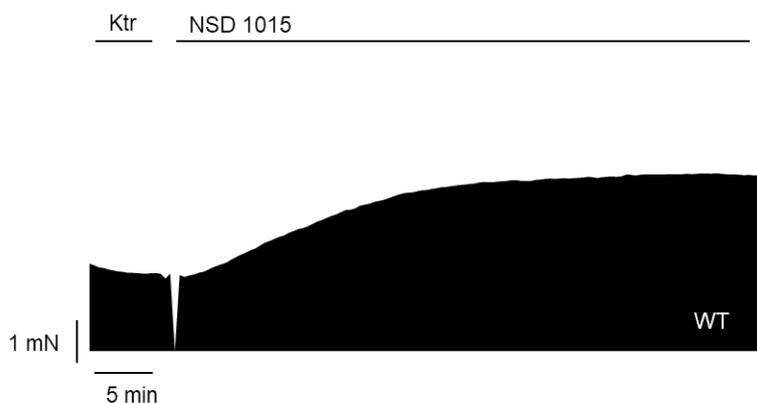


Abb. 7: Positiv inotroper Effekt von NSD 1015

Abgebildet ist ein Mechanogramm eines linken WT-Vorhofpräparats. Es ist ein positiv inotroper Effekt nach der Applikation von 10 µM NSD 1015 zu erkennen.

4.2.3. Wirkung von Histidin, Histamin und Cimetidin

Die folgenden Versuchsreihen wurden an transgenen Mäusen (TG) mit der herzspezifischen Überexpression des H₂-Histamin Rezeptors und zur Kontrolle an WT-Mäusen durchgeführt.

Zuerst wurde die Wirkung von Histidin an linken Vorhofpräparaten von WT- und TG- Mäusen untersucht. Dazu wurde nach der Vorbereitungs- und Kalibrierungsphase durch die kumulative Zugabe von Histidin (von 0,1 μ M bis 0,01M Histidin) eine KWK erstellt. Die Ausgangslage der Kraft lag dabei bei den TG- Vorhofpräparaten bei $4,48 \pm 0,45$ mN (n=13) und bei den WT- Vorhofpräparaten bei $4,35 \pm 0,17$ mN (n=12). Bei den transgenen Vorhofpräparaten kam es im Verlauf der KWK zu einem linearen Kraftabfall auf $4,43 \pm 0,54$ mN. Bei den Vorhofpräparaten der WT- Mäuse war ebenfalls ein kontinuierlicher Kraftabfall auf $3,06 \pm 0,24$ mN zu verzeichnen. Bei dem direkten Vergleich der WT und TG Versuchsreihen zeigte sich während der kumulativen Gabe von Histidin kein Unterschied.

Während der Histidin-KWK kam es bei den letzten beiden Konzentrationen (3 mM und 10 mM Histidin im Organbad) bei WT- und TG-Vorhofpräparaten zu einer Auffälligkeit (siehe Abb. 8): Es kam nach der Applikation von 3 mM Histidin zu einem initialen Abfall der Kraft, die in der 5-minütigen Einwirkphase wieder Anstieg. Dieser Verlauf wiederholte sich anschließend nach der Gabe von 10 mM Histidin.

Bei den WT-Vorhofpräparaten sank die Kraft bei dem ersten Effekt bei einer Histidinkonzentration von 3 mM um $0,42 \pm 0,05$ mN und bei den 2. Effekt bei einer Histidinkonzentration von 10 mM um $0,78 \pm 0,06$ mN (n= 8). Bei den transgenen Vorhofpräparaten kam es zu einem vorübergehenden Abfall der Kraft um $0,40 \pm 0,76$ mN im 1. Effekt und $0,64 \pm 0,10$ mN im 2. Effekt (n= 9). Es fällt auf, dass es bei WT- und TG-Vorhofpräparaten bei dem 2. Effekt zu einem größeren Abfall der Kraft kommt (verglichen zu dem 1. Effekt). Es besteht jedoch kein Unterschied zwischen WT- und TG-Vorhofpräparaten hinsichtlich des beschriebenen Kraftabfalls. Dieser eben beschriebene Effekt bei den letzten beiden Histidin Konzentrationen stellten sich jedoch nicht bei allen untersuchten linken Vorhöfen ein. So zeigten lediglich 8 von 12 WT- und 9 von 17 TG-Vorhofpräparaten diese Auffälligkeit.

Im Anschluss an die reinen, kumulativen Histidin Applikationen, wurden einige der Vorhofpräparate für 30 Minuten mit 10 μ M Cimetidin (=H₂-Histamin-Rezeptor-Antagonist) vorinkubiert und danach erneut eine Histidin-KWK erstellt. Bei dieser erneuten KWK zeigte sich eine lineare Fortsetzung der Erschlaffung der Präparate.

Wie bei den reinen Histidin-Gaben, kam es auch in den Versuchsgruppen mit der Cimetidin-Inkubation bei den letzten beiden Histidin Konzentrationen zu dem bereits beschriebenen Effekt. Bei 3 mM Histidin im Organbad kam es zu einem initial negativen Effekt mit einem Abfall der Kraft um $0,32 \pm 0,10$ mN (n=5). Nach dem erneuten Anstieg der Kraft, kam es

nach der Applikation der nächst höheren Histidin Konzentration zu einem erneuten negativ inotropen Effekt ($- 0,40 \pm 0,74$ mN).

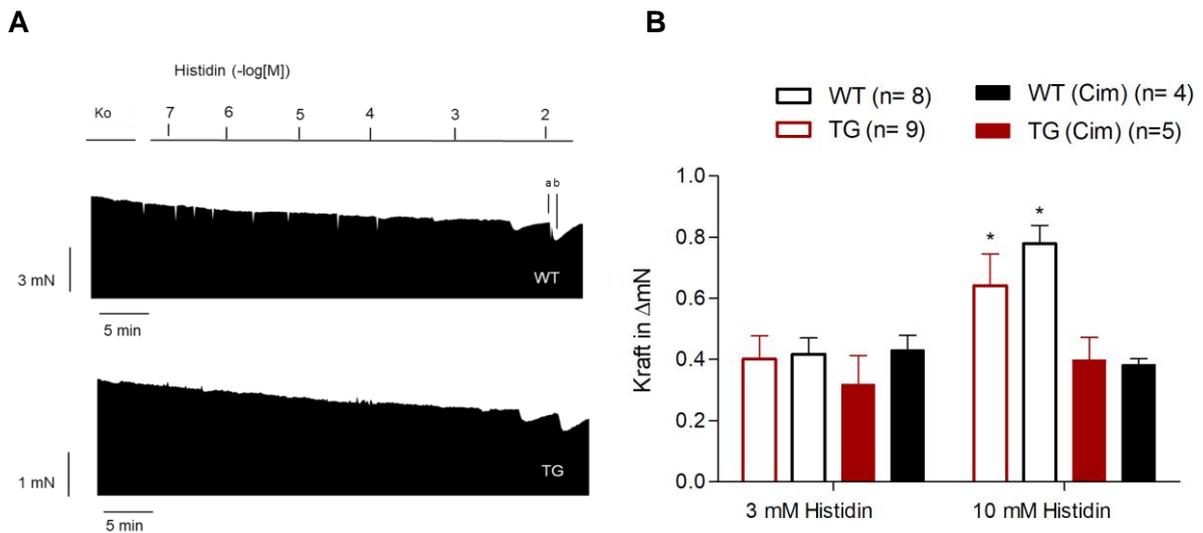


Abb. 8: Wirkung von Histidin an isolierten linken Vorhofpräparaten

A: Beispielmechanogramm einer Histidin- KWK je eines linken WT- und TG-Vorhofpräparats. Bei den letzten beiden Histidin Konzentrationen (3 mM und 0,01 M Histidin im Organbad) ist das Auftreten eines initialen negativ inotropen Effektes mit anschließendem positiv inotropen Effekt bei WT- und TG-Vorhofpräparaten zu erkennen. Dieser war, wie in **B** dargestellt ist, bei der Konzentration von 3 mM Histidin bei den TG- und WT-Vorhofpräparaten mit reiner Histidin-KWK signifikant größer als bei 10 mM Histidin. * $p < 0,05$ 1. Effekt vs. 2. Effekt. Nach der Inkubation der Vorhofpräparate mit 10 μ M Cimetidin ist kein Unterschied zwischen den Konzentrationen bei WT- und TG-Vorhofpräparaten zu verzeichnen. Bestimmt wurde, wie in **A** exemplarisch darstellt, die Kraft in mN zum Zeitpunkt a und b. In **B** dargestellt sind die Differenzen (b-a).

Anschließend erfolgte identisch zu den Untersuchungen mit Histidin die Durchführung einer Histamin-KWK an TG- und WT-Vorhofpräparaten. Dazu wurde beginnend ab einer Histaminkonzentration von 1 nM nach fünfminütiger Einwirkzeit die nächst höherer Konzentration hinzugefügt. Dies wurde bis zu einer Konzentration von 10 μ M Histamin weitergeführt (Abb. 9).

Die TG-Vorhofpräparate besaßen eine basale Kraft von $6,27 \pm 0,33$ mN. Die Kraft stieg unter der kumulativen Gabe von Histamin an und erreichte bei einer Konzentration von 0,3 μ M Histamin im Organbad eine Kraft von $7,50 \pm 0,53$ mN ($p < 0,001$, $n = 15$). Die maximale Kraft betrug $11,37 \pm 0,33$ mN und der pEC_{50} Wert betrug $7,07 \pm 0,14$.

Die basale Kraft der WT- Vorhofpräparate lag bei $7,01 \pm 0,30$ mN und fiel im Laufe der kumulativen Histaminapplikationen kontinuierlich auf einen Wert von $6,34 \pm 0,31$ mN ($n = 16$) ab.

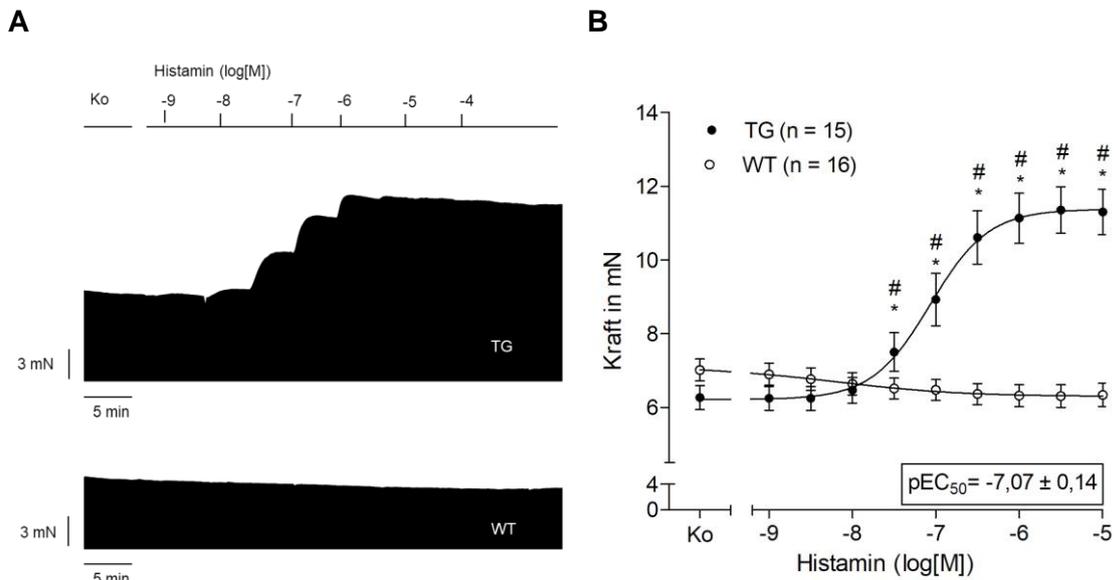


Abb. 9: Wirkung von Histamin an isolierten linken Vorhofpräparaten

A Beispielmechanogramm einer Histamin-KWK je eines linken TG- und WT-Vorhofpräparat

In A + B ist zu erkennen, dass die WT-Vorhofpräparate keine Reaktion auf das applizierte Histamin zeigten, wohingegen bei den TG-Vorhofpräparaten ab einer Histaminkonzentration von 3 μ M ein Kraftanstieg zu erkennen ist.

B Abgebildet ist die Kraft in mN einer KWK von WT (\circ ; n = 16) und TG (\bullet ; n = 15). * p < 0,05 vs. Ktr; # p < 0,05 vs. WT

4.2.4. Auswirkung auf die Hemmung des Histaminmetabolismus

In den folgenden Versuchsreihen wurde der Einfluss einer Hemmung der verschiedenen abbauenden Wege des Histamins auf die Kontraktionskraft untersucht. Dazu wurden nach der Äquilibrationsphase der verschiedenen Hemmstoffe (AG, QAN oder Tranylcypromin) in die Organbäder appliziert und die Vorhofpräparate damit inkubiert. Anschließend erfolgte eine kumulative Gabe von Histamin zur Erstellung einer KWK von 1 nM Histamin bis 10 μ M Histamin.

Aufgrund der Hypothese, dass auch Kardiomyozyten in der Lage sind, Histamin zu metabolisieren, wurde hier ein Anstieg der Inotropie erwartet, da durch die Hemmung des Histaminabbaus die kontraktile wirksame Konzentration von Histamin in den Vorhofpräparaten steigen müsste.

Zuerst erfolgte die Hemmung der DAO. Sie katalysiert die Bildung von Imidazolessigsäure aus Histamin und leitet somit einen der zwei Metabolisierungswege ein (siehe Abb. 1). AG ist ein Hemmstoff der DAO, der in einer Konzentration von 1 mM im Organbad eingesetzt wurde.

Beginnend von einer basalen Kraft von $8,78 \pm 0,50$ mN zeigten die linken Vorhofpräparate der mit AG vorbehandelten TG-Vorhofpräparate einen positiven inotropen Effekt auf die

steigenden Histaminkonzentrationen bis zu einem Maximalwert von $13,46 \pm 0,45$ mN an ($n=6$). Der pEC_{50} Wert lag bei $7,39 \pm 0,19$.

Dem gegenüber kam es bei den Kontrollpräparaten, die nicht mit AG vorbehandelt waren, ausgehend von $6,47 \pm 0,59$ mN zu einer maximalen Kraft von $10,98 \pm 0,75$ mN ($n=4$). Der pEC_{50} Wert lag bei $6,96 \pm 0,31$. Vergleichend zeigte sich eine Linksverschiebung der KWK von Histamin durch AG (Abb. 10).

Bei den mituntersuchten WT-Vorhofpräparaten kam es im Laufe der kumulativen Histaminapplikationen, wie schon in Kapitel 4.2.3. beschrieben ist, zu keinem Effekt (nicht dargestellt).

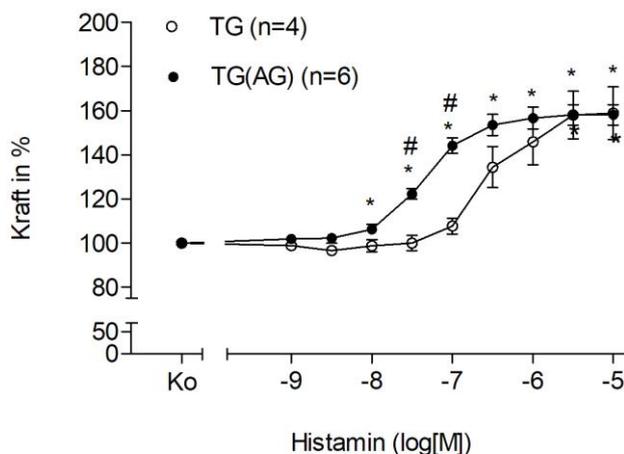


Abb. 10: Hemmung der Diaminoxidase mit Aminoguanidin

Dargestellt ist die Kraft [%] abhängig von der Histaminkonzentration, während einer Histamin-KWK von 1 nM bis 10 μ M. Zu sehen ist einmal die Kurve der Lösungsmittelkontrolle (\circ $n=4$), sowie die Kurve der mit 1 mM AG vorinkubierten Präparate (\bullet $n=6$). Es zeigt sich eine statistisch signifikante Linksverschiebung der AG-Kurve und somit ist die Potenz von Histamin nach Gabe des Diaminoxidasehemmers AG gesteigert. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert, # $p < 0,05$ TG(AG) vs. TG.

In der nächsten Versuchsreihe erfolgte die Hemmung der N-Methyltransferase mit Quinacrin (QAN). Die HMT leitet den zweiten Metabolisierungsweg von Histamin ein, indem sie die Metabolisierung von Histamin zum N-Methylhistamin katalysiert.

Nach einer 30-minütigen Inkubation mit 2 μ M QAN erfolgte die Erstellung einer KWK mit Histamin von 1 nM bis 10 μ M. Dazu wurde ein Teil der TG und WT-Vorhofpräparate mit QAN behandelt, der andere Teil zur Kontrolle mit dem Lösungsmittel.

Die transgenen, mit QAN vorinkubierten Vorhöfe besaßen eine basale Kraft von $7,79 \pm 0,162$ mN ($n=7$). Diese stieg im Laufe der kumulativen Histaminapplikationen auf einen Maximalwert von $12,59 \pm 0,29$ mN bei einer Histaminkonzentration von 1 μ M an. Bei einer Konzentration von 0,3 μ M Histamin im Organbad zeigte sich ein Kraftanstieg auf $9,80 \pm 0,48$ mN. Der pEC_{50} Wert lag bei $7,39 \pm 0,12$.

Die transgene Kontrollgruppe hatte eine basale Ausgangskraft von $7,32 \pm 0,354$ mN ($n=5$) und erreichte einen Kraftanstieg auf $10,38 \pm 1,36$ mN bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ Histamin. Der pEC_{50} Wert betrug $7,15 \pm 0,23$ und der maximale positiv inotrope Effekt wurde bei $30\mu\text{M}$ Histamin mit $12,59 \pm 0,64$ mN erreicht (Abb. 11).

Bei den mituntersuchten WT kam es im Laufe der kumulativen Histaminapplikationen, wie schon in Kapitel 4.2.3. beschrieben ist, zu keinem Effekt.

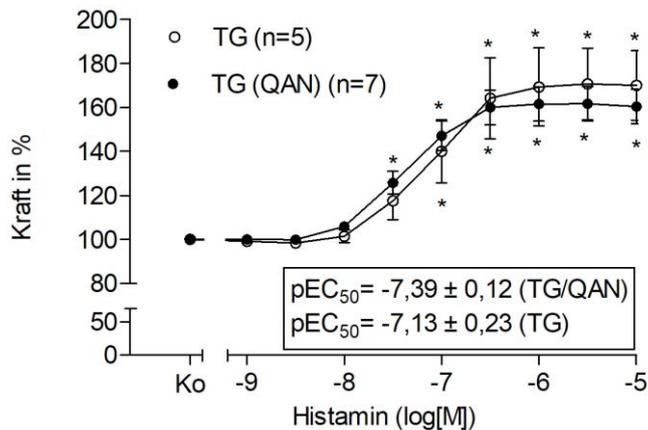


Abb. 11: Hemmung der N-Methyltransferase mit Quinacrin

Dargestellt ist die Kraft [%] abhängig von der Histaminkonzentration, während einer Histamin-KWK von 1 nM bis 10 μM . Zu sehen ist einmal die Kurve der Lösungsmittelkontrolle ($\circ n=5$), sowie die Kurve der mit $2 \mu\text{M}$ QAN vorinkubierten Vorhofpräparate ($\bullet n=7$). * $p<0,05$ vs. Kontrollwert.

Nachfolgend wurde die Auswirkung der Hemmung beider abbauender Wege überprüft werden. Dazu wurden die Hemmstoffe AG und QAN kombiniert appliziert und die Vorhöfe für 40 Minuten (10 min AG alleine, dann Zugabe von QAN für weitere 30 min) mit den Hemmstoffen inkubiert. Danach wurde erneut eine Histamin-KWK erstellt.

Bereits die Inkubation mit den Hemmstoffen erzeugte bei den TG-Vorhofpräparaten einen positiv inotropen Effekt ($n=7$). Dabei kam es ausgehend von einer basalen Kraft von $5,61 \pm 0,14$ mN während der 10-minütigen, alleinigen AG-Inkubation bereits zu einer Kraftzunahme von $11,5 \pm 2,3$ %. Nach der Zugabe von QAN und einer 30 Minuten andauernden, gemeinsamen Inkubationszeit stieg die Kraft weiter bis zu einer Kraft von $6,89 \pm 0,21$ mN (= Kraftzunahme von $20,4 \pm 4,8$ %) (Abb. 12).

Dahingegen kam es bei den mit QAN und AG inkubierten WT-Vorhofpräparaten zu keiner relevanten Kraftänderung ($+ 5,2 \pm 2,3$ %, $n=4$). Die transgenen Kontrollpräparate verloren während der Inkubationsdauer $5,67 \pm 1,47$ % an Kraft ($n=5$) und die WT-Kontrollpräparate sanken ebenso um $14,23 \pm 5,65$ % ($n=5$).

Ausgehend von einer basalen Kraft nach Hemmstoffinkubation von $6,89 \pm 0,21$ mN stieg die Kraft der vorinkubierten, transgenen Vorhofpräparate auf einen Maximalwert von $11,72 \pm$

0,27 mN bei einer Histaminkonzentration von 1 μM . Der pEC_{50} Wert lag bei $7,45 \pm 0,12$. Die transgenen Kontrollpräparate besaßen eine Ausgangskraft von $4,84 \pm 0,27$ mN und erreichten einen Kraftanstieg auf $9,86 \pm 1,44$ mN bei einer Histaminkonzentration von 0,1 μM (n=5). Die maximale Kraft von $11,72 \pm 0,80$ mN wurde bei 10 μM Histamin erreicht. Der pEC_{50} Wert lag bei $7,02 \pm 0,24$.

Vergleichend kam es durch die Inkubation mit AG und QAN zu einer Linksverschiebung der Histamin-KWK.

Bei den mituntersuchten WT-Vorhofpräparaten kam es im Laufe der kumulativen Histaminapplikationen, wie schon in Kapitel 4.2.3. beschrieben ist, zu keinem Effekt.

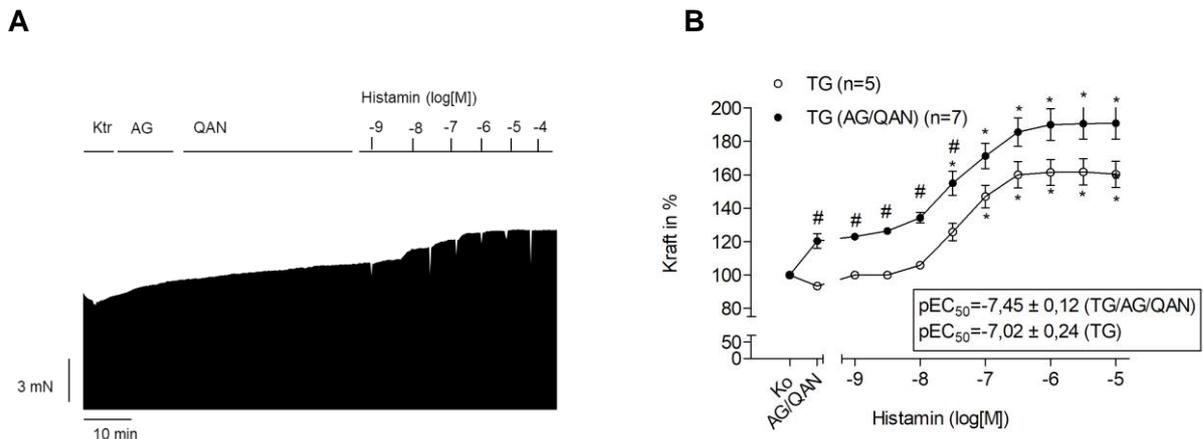


Abb. 12: Hemmung der Diaminoxidase und der N-Methyltransferase durch Aminoguanidin und Quinacrin (A)

A: Abgebildet ist ein originales Mechanogramm eines linken, transgenen Vorhofpräparats mit der Zugabe von 1 mM AG und 2 μM QAN mit anschließender Histamin-KWK von 1 nM bis 10 μM .

B: Dargestellt ist die Kraft [%] abhängig von der Histaminkonzentration, während einer Histamin-KWK von 1 nM bis 10 μM . Zu sehen ist einmal die Kurve der Lösungsmittelkontrolle (\circ n=5), sowie die Kurve der mit 1 mM AG und 2 μM QAN vorinkubierten Vorhofpräparate (\bullet TG n=7). Die Abbildung zeigt einen signifikanten ($\#$ $p < 0,05$) Unterschied zwischen beiden Kurven und somit eine höhere Potenz. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert.

Die zuletzt beschriebene Versuchsanordnung mit der kombinierten Inkubation von AG und QAN wurde auch in Zusammenhang mit einer kumulativen Gabe von Histidin (von 0,1 μM bis 0,01M) durchgeführt. Dabei kam es weder bei den transgenen noch bei den Wildtyp-Vorhofpräparaten zu einem relevanten Kraftanstieg (Abb. 13).

Die mit QAN und AG vorinkubierten TK-Vorhofpräparate besaßen eine basale Kraft von $6,10 \pm 0,48$ mN (n=5) und verloren im Verlauf der KWK kontinuierlich an Kraft. Diese lag zum Ende des Versuchs bei $4,50 \pm 0,50$ mN. Auch die TG-Kontrollpräparate verloren ausgehend von Ihrer basalen Kraft von $5,09 \pm 0,47$ mN (n=5) im Verlauf an Kraft und endeten bei $4,63 \pm 0,44$ mN. Bei den mituntersuchten WT-Vorhofpräparaten kam es im Laufe der kumulativen Histaminapplikationen, wie schon in Kapitel 4.2.3. beschrieben ist, zu keinem Effekt.

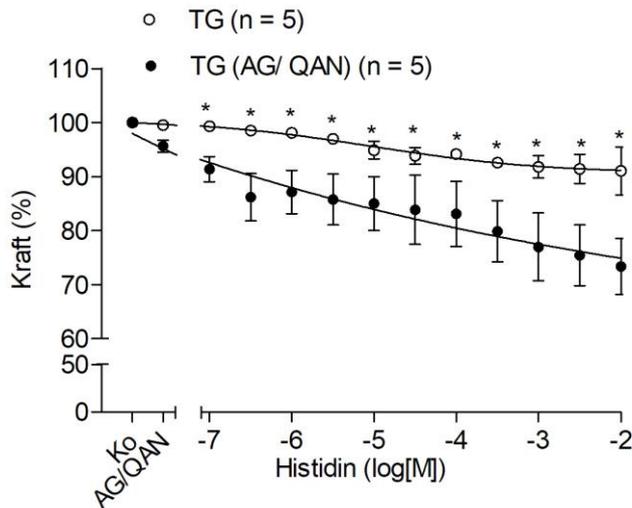


Abb. 13: Hemmung der Diaminoxidase und der N-Methyltransferase durch Aminoguanidin und Quinacrin (B)

Dargestellt ist die Kraft [%] abhängig von der Histidin Konzentration.

Zu sehen ist einmal die Kurve der Lösungsmittelkontrolle (\circ n = 5), sowie die Kurve der mit 1 mM AG und 2 μ M QAN vorinkubierten Vorhofpräparate (\bullet TG n=5). Die vorbehandelten Vorhofpräparate zeigen einen, im Vergleich zu den Kontrollpräparaten, größeren Abfall der Kraft während der Histidin-KWK. * p < 0,05 TG vs. TG(AG/QAN)

Im letzten Versuchsprotokoll wurde die Auswirkung der Hemmung von MAO untersucht. Im Herzen kommen MAO-A und MAO-B vor. Tranylcypromin ist ein unselektiver Hemmstoff der MAO. Die MAO-B ist das Enzym, dass sich der N-Methyltransferase im Histaminmetabolismus anschließt (s. Abb.1). Deswegen beziehen sich die folgenden Betrachtungen nur auf die MAO-B. Dazu wurden die Vorhofpräparate mit 10 μ M Tranylcypromin vor inkubiert. Anschließend erfolgte die kumulative Histaminapplikation von 1 nM bis 10 μ M (Abb. 14).

Während der Inkubationszeit mit Tranylcypromin zeigte sich bei keiner Gruppe eine relevante Änderung der Kraft. Die TG- Kontrollpräparate besaßen eine Ausgangskraft von $5,47 \pm 0,54$ mN und erreichten bei einer Histaminkonzentration von 30 μ M ihre maximale Kraft von $9,83 \pm 0,21$ mN (n=3). Der pEC₅₀ lag bei $7,15 \pm 0,45$. Die mit Tranylcypromin vorbehandelten Vorhofpräparate besaßen eine Ausgangskraft von $6,33 \pm 0,53$ mN. Die Kraft stieg auf einen Maximalwert von $12,29 \pm 0,28$ mN (n= 4). Der pEC₅₀ Wert lag bei $- 7,42 \pm 0,08$.

Im Vergleich der beiden Gruppen kommt es durch die Zugabe des Hemmstoffs Tranylcypromin zu einer Steigerung der Effizienz und Potenz von Histamin (Abb. 14). Bei den mituntersuchten WT-Vorhofpräparaten kam es im Laufe der kumulativen Histaminapplikationen, wie schon in Kapitel 4.2.3. beschrieben ist, zu keinem Effekt.

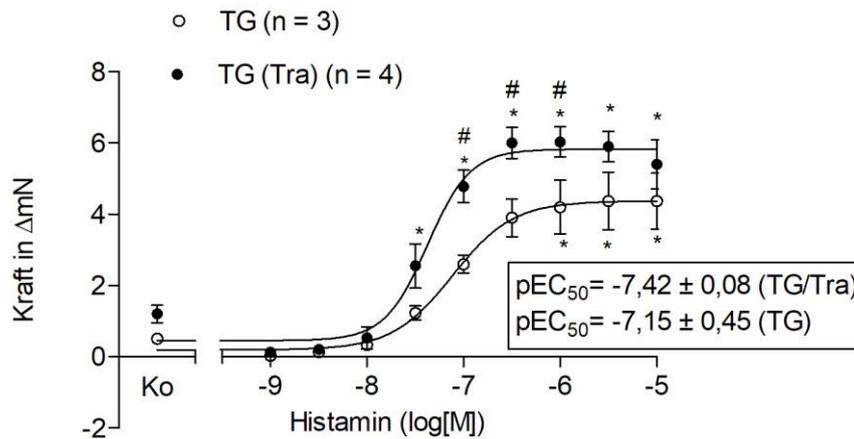


Abb. 14: Hemmung der Monoaminoxidase durch Tranylcypromin

Abgebildet ist die Kraft in ΔmN einer KWK von TG-Kontrollpräparaten (\circ ; $n=3$) und TG-Vorhofpräparaten mit Tranylcypromin Vorinkubation (\bullet ; $n=4$). Zu erkennen ist der positiv inotrope Effekt bei steigenden Histaminkonzentrationen, sowie die Steigerung der Potenz und Effizienz nach der Applikation von Tranylcypromin. * $p < 0,05$ TG (Tra) vs. Ko; # $p < 0,05$ TG (Tra) vs. TG/Ko

Zusammenfassend kam es mit Blick auf die der pEC_{50} Werte (siehe Kap. 4.9.) bei der gemeinsamen Inkubation mit AG und QAN zu dem größten Effekt ($pEC_{50} = 7,45 \pm 0,45$). Bei der Vorinkubation mit Tranylcypromin, sowie mit AG fällt eine Steigerung der Effektivität gegenüber den Kontrollpräparaten auf.

4.3. Kontraktionsversuche an rechten Vorhofpräparaten

4.3.1. Wirkung von Isoprenalin

Die Wirkung des nicht-selektiven β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin wurde an den rechten Vorhofpräparaten, identisch zu den linken, anhand einer kumulativen KWK von 0,1 nM bis 1 μM Isoprenalin untersucht. Beginnend von einer basalen Frequenz von 349 ± 22 bpm zeigte sich bei steigenden Isoprenalkonzentrationen ein positiv chronotroper Effekt. Die Frequenz stieg dabei auf einen Maximalwert von $565,60 \pm 3,88$ bpm ($n=8$). Der pEC_{50} Wert lag bei $8,77 \pm 0,27$.

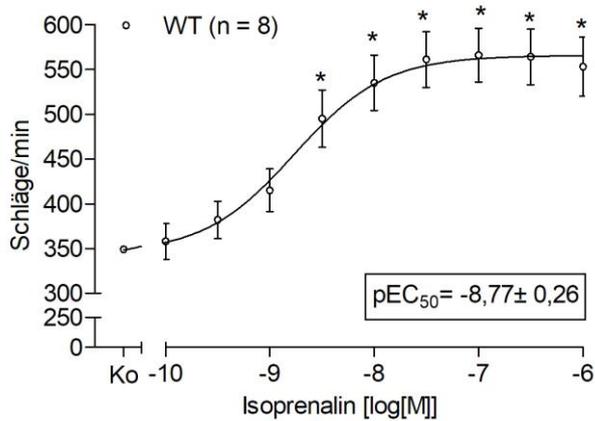


Abb. 15: Wirkung von Isoprenalin an isolierten rechten Vorhofpräparaten

Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM der Frequenz in bpm für die kumulative Zugabe von Isoprenalin (von 0,1 nM bis 1 μ M) zu spontan schlagenden rechten WT-Vorhofpräparaten (n=8). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Ko), Ordinate: Frequenz, Abszisse: Isoprenalinkonzentration.

4.3.2. Wirkung von Histidin und Histamin

Durch die kumulative Gabe von Histidin wurde an den rechten, TG-Vorhofpräparaten keine relevante Änderung erreicht (nicht dargestellt).

Anschließend erfolgten die kumulativen Histaminapplikationen zu den rechten isolierten Vorhofpräparaten.

Die basale Frequenz bei den WT-Vorhofpräparaten lag bei $335,50 \pm 17,2$ bpm. Zum Ende der kumulativen Histaminapplikationen hatten die Vorhofpräparate eine Frequenz von $339,51 \pm 19,2$ bpm (n= 6). Die basale Frequenz der rechten, TG-Vorhofpräparate lag bei $282,00 \pm 42,3$ bpm (n=6). Diese blieb bis zu einer Histaminkonzentration von 30 nM relativ konstant und begann danach zu steigen. Die Maximale Frequenz betrug $350,20 \pm 23,41$ bpm (nicht dargestellt).

Die Durchführung der Versuchsprotokolle, identisch zu den linken Vorhofpräparaten war erschwert. Es konnte aufgrund zahlreicher Arrhythmien der rechten Vorhofpräparate keine statistische Auswertung erfolgen (siehe Kap. 4.4.).

4.4. Arrhythmien während der Versuche mit transgenen und Wildtyp-Mäusen

Im Laufe der Experimente mit den rechten Vorhofpräparaten kam es gehäuft zu Arrhythmien, die eine korrekte Auswertung erschwerten. Dabei wurde zwischen basalen Arrhythmien, die bereits zu Beginn des Versuchs festgestellt wurden und späten Arrhythmien, die im Verlauf des Experiments neu auftraten, unterschieden. Untersucht wurden im Rahmen dieser Dissertation insgesamt 118 Mäuse (63 TG und 55 WT). Dabei traten bei 40 TG-, rechten

Vorhofpräparaten und bei 17 rechten WT-Vorhofpräparaten basale Arrhythmien auf ($p < 0,05$ TG vs. WT). Bei den linken Vorhofpräparaten wurden hingegen bei nur 2 WT- und 3 TG-Vorhofpräparaten basale Arrhythmien beobachtet.

Im Verlauf der Versuche kam es bei den linken, TG-Vorhofpräparaten nur bei der Applikation von 1mM Aminoguanidin zu Arrhythmien ($n=2$). Bei den rechten Vorhofpräparaten konnte für das Auftreten der späten Arrhythmien keine Häufung gezeigt werden. Sie entstanden in den meisten Fällen bei WT- und TG-Vorhofpräparaten während den steigenden Histaminkonzentrationen im Laufe der durchgeführten KWKs (WT=15 rechte Vorhofpräparate; TG=8 rechte Vorhofpräparate). Auf Grund der häufigen Arrhythmien konnten, vor allem bei der Auswertung der rechten Vorhofpräparate jeweils nur geringe Probenmengen (n) berücksichtigt werden.

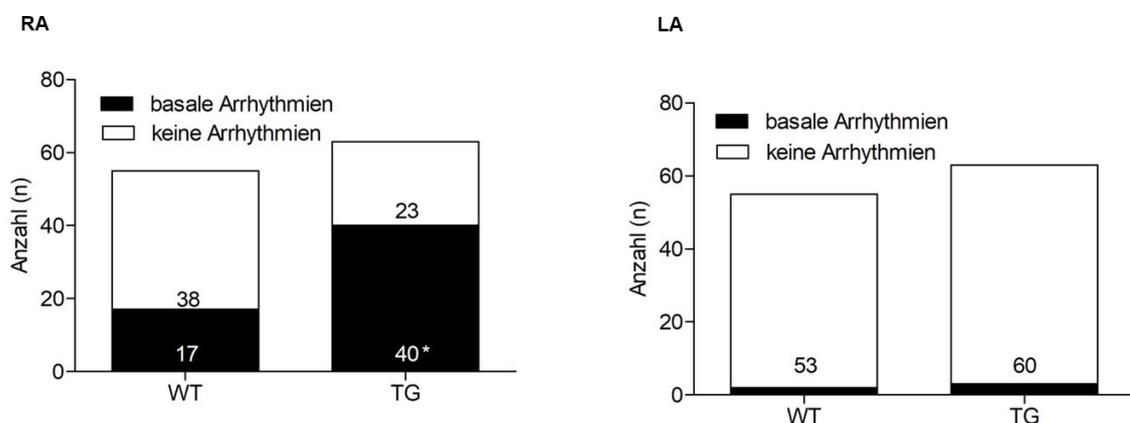


Abb. 16: Arrhythmien der rechten und linken Vorhofpräparate

Dargestellt sind die Vorhofpräparate mit basalen Arrhythmien (■) und die, die initial keine Arrhythmien (□) zeigten. Dabei werden im linken Diagramm die rechten Vorhofpräparate (RA) und im rechten Diagramm die linken Vorhofpräparate (LA) gezeigt.

Die basalen Arrhythmien traten gehäuft bei den TG-, rechten Vorhofpräparaten auf (63,5 %; $*p > 0,05$ vs. WT). Wogegen nur 32,1 % der rechten WT-Vorhofpräparate basale Arrhythmien hatten.

Bei den linken Vorhofpräparaten zeigten sich insgesamt weniger Arrhythmien. So hatten lediglich zwei der linken WT-Vorhofpräparaten und drei der linken TG-Vorhofpräparate basale Arrhythmien.

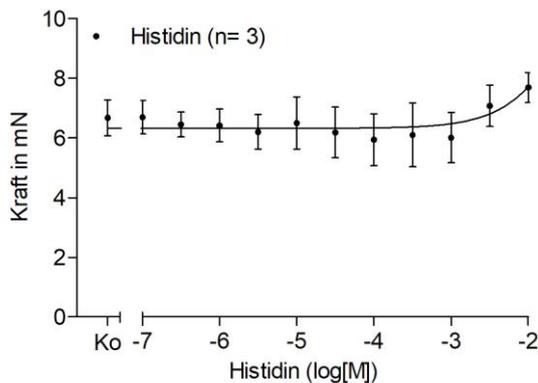
4.5. Kontraktionsversuche an menschlichen Vorhofpräparaten

Ergänzend zu den bisher beschriebenen Versuchen am Mausmodell, wurden einige der Versuchsabläufe an menschlichen Vorhofpräparaten durchgeführt. Dazu wurde, wie in 3.5.5. beschrieben, das menschliche Gewebe, das während einer geplanten Herzoperation entnommen wurde, aufgearbeitet. Die menschlichen Vorhofpräparate wurden, identisch den tierischen Vorhofpräparaten, in die Versuchsvorrichtung eingespannt und die Kraft aufgezeichnet.

In den durchgeführten Versuchen wurde die Wirkung von Histidin auf das menschliche Vorhofgewebe untersucht. Dazu wurde eine Histidin-KWK von 0,1 μ M bis 0,01M Histidin im Organbad erstellt. Die Abstände der Einzelgaben betragen dabei jeweils ca. 5 Minuten.

Die basale Kraft lag bei $6,46 \pm 0,37$ mN ($n= 10$). Während der KWK kam es zu keiner Veränderung der Kraft. In der Zusammenschau fiel, ab einer Konzentration von 0,1 mM Histidin im Organbad, bei drei der Untersuchten menschlichen Vorhofpräparate ein positiv inotroper Effekt auf. Dieser ist beispielhaft in der Abb. 17 B in Form eines Originalmechanogramms dargestellt. Man kann somit zwischen Respondern und Non-Respondern unterscheiden. Eine Häufung dieses Effektes konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht dargestellt werden.

A



B

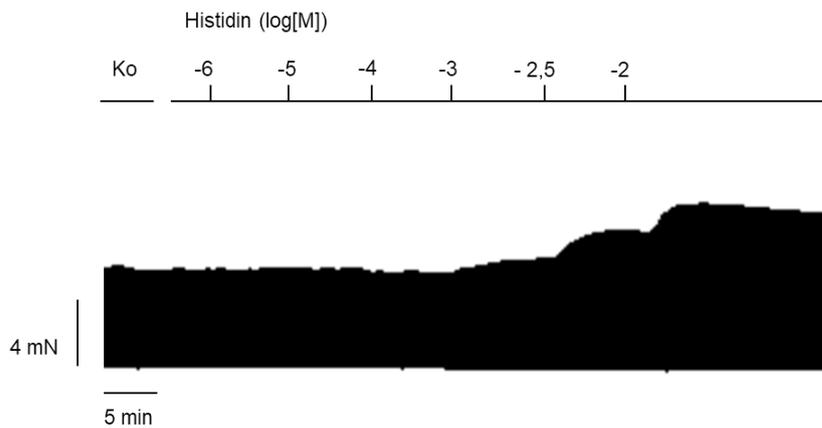
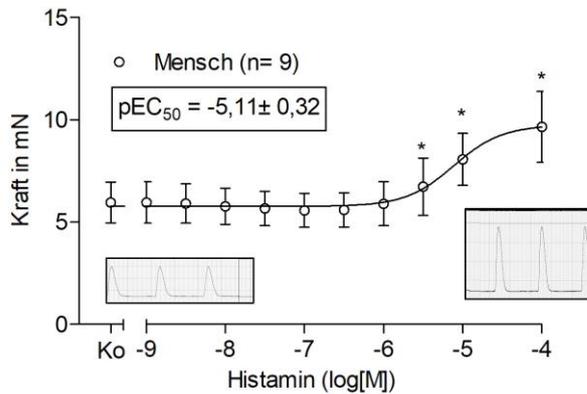


Abb. 17: Wirkung von Histidin an menschlichen Vorhofpräparaten

A: Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM die Kraft in mN für die kumulativ steigenden Konzentrationen von Histidin zu menschlichen Vorhofpräparaten ($n= 10$). **B** zeigt ein Originalmechanogramm eines der untersuchten Vorhofpräparate, bei dem es am Ende der KWK zu einem positiv inotropen Effekt kam (an 3 von 14 Vorhofpräparaten wurde ein positiv inotroper Effekt beobachtet). Ordinate: Kraft in mN, Abszisse: Histidinkonzentration.

Anschließend erfolgte die Erstellung einer Histamin-KWK (von 1 nM bis 0,1 mM Histamin im Organbad). Ausgehend von einer basalen Kraft von $5,95 \pm 0,99$ mN kam es ab $30 \mu\text{M}$ Histamin im Organbad zu einem positiv inotropen Effekt ($n=9$). Die maximale Kraft lag dabei bei $10,09 \pm 1,14$ mN und der pEC_{50} bei $5,11 \pm 0,32$.

A



B

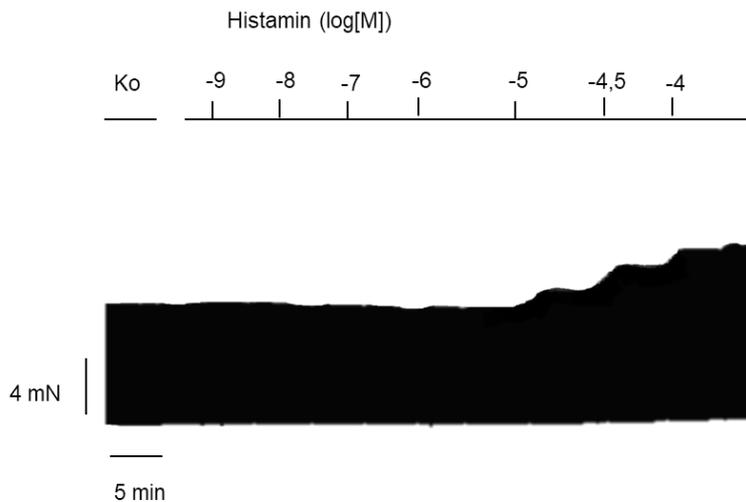


Abb. 18: Wirkung von Histamin an menschlichen Vorhofpräparaten

A Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM der Kraft in mN für die kumulativ steigenden Konzentrationen von Histamin zu menschlichen Vorhofpräparaten ($n=9$). Abgebildet sind weiterhin Einzelkontraktionen eines Versuchs: links während der Kontrollmessung und rechts bei einer Histaminkonzentration von $0,1$ mM.

B zeigt ein Originalmechanogramm eines der untersuchten Präparate.

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle (Ko), Ordinate: Kraft, Abszisse: Histaminkonzentration.

4.6. Histologische Untersuchungen der Herzen

Die gesamten Herzen von WT- und TG-Mäusen, samt Vorhöfe und Ventrikel, wurden am Ende jedes Versuches eingefroren, um pathologische Veränderungen der Herzgewebe, z.B. Fibrosierung, histologisch auszuschließen. Desweiteren wurden immunhistochemische

Untersuchungen durchgeführt, um die Verteilung der hier untersuchten Enzyme in WT- und TG-Gewebe zu vergleichen.

Mit den wie in 3.2.6. und 3.2.7. beschriebene Methoden wurden die Präparate der WT- und TG-Mäuser Herzen untersucht. Dabei stellten sich nach der Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Masson-Goldner-Trichomfärbung keinerlei Anzeichen von Fibrose im Gewebe von WT- und TG-Herzgewebe dar.

Desweiteren erbrachte die immunhistochemische Untersuchung mit Antikörpern (siehe Tab.1) ebenso keinen Unterschied zwischen den WT- und den TG-Geweben. Es zeigte sich bei allen getesteten Antikörpern eine homogene sarkoplasmatische Färbung des Myokards. Die Antikörper gegen Diaminoxidase, Monoaminoxidase A und B, sowie N-Methyltransferase reagierten außerdem mit dem Endothel der Kapillaren und Arteriolen.

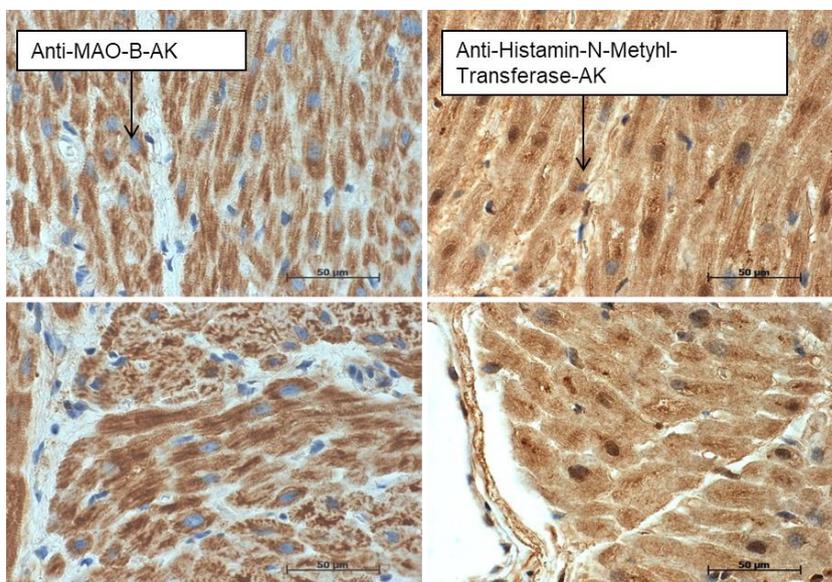


Abb. 19: Immunhistochemische Untersuchung zum Nachweis von Histamin abbauenden Enzymen im murinen Vorhofpräparationen

Abgebildet sind die Ergebnisse von immunhistochemischen Untersuchungen an murinen Herzen. Untersucht wurden Vorhofpräparate von WT- und TG-Mäusen. Es wurden verschiedene Antikörper verwendet, um die Histamin abbauenden Enzyme darzustellen (Antikörpern gegen die N-Methyltransferase, Monoaminoxidase-B). Immunhistochemisch konnten keine Unterschiede zwischen den WT- und TG-Proben gezeigt werden.

Die Untersuchung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Igor B. Buchwalow aus dem Institut für Hämatopathologie in Hamburg.

4.7. Nachweis der Histamin auf- und abbauenden Enzyme

An Ventrikelpollen von WT-Mäusen wurde untersucht, ob die Histamin metabolisierenden Enzyme prinzipiell im Herzen exprimiert sind. Wie in Kapitel 3.2.6. beschrieben, wurden

Western-Blot-Analysen durchgeführt, um die Enzyme des Histaminmetabolismus im Gewebe nachzuweisen. In der Abbildung 10 sind exemplarisch einige Ergebnisse der Untersuchungen abgebildet. Es wurden die Histidindecaboxylase (HDC), Monoaminoxidase-B (MAO-B), die Histamin-N-Methytransferase (HNMT) und die Diaminoxidase (DAO) nachgewiesen.

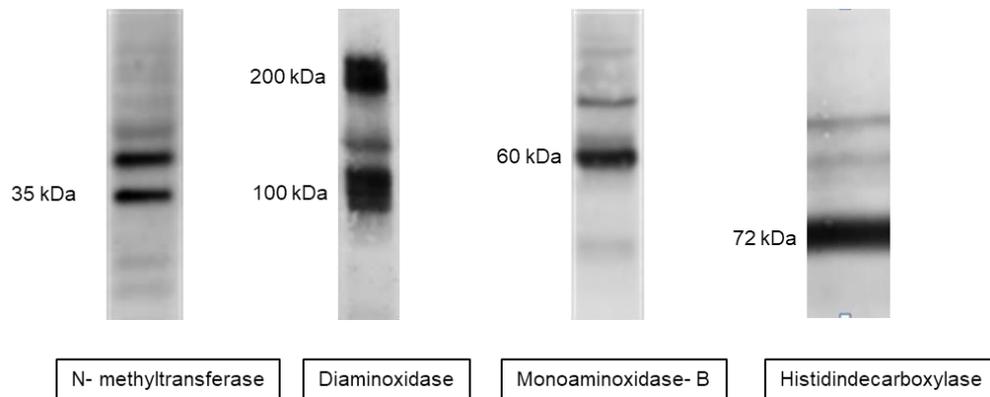


Abb. 20: Westernblot

Dargestellt sind die Western-Blot-Analysen verschiedener Enzyme des nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese mit nachfolgendem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern. Verwendet wurde Herzgewebeprobe von WT-Mäusen. Die theoretischen Molekulargewichte der untersuchten Enzyme sind in kDa neben der dazugehörigen Bande angegeben.

4.8. Messung von Histamingehalt und Enzymaktivitäten

Mittels radioenzymatischer Messungen wurden die Enzymaktivitäten der MAO-A und MAO-B an menschlichen Vorhofpräparaten bestimmt. Ebenso wurde der Histamingehalt bestimmt (siehe Tab. 3 A).

Desweiteren wurde ebenso mittels radioenzymatischer Messung die Enzymaktivität der HMT, MAO-B und DAO an murinen Gewebe gemessen (siehe Tab. 3 B).

Der Histamingehalt wurde mittels HPLC gemessen (siehe Tab. 4).

Tab. 3: Radioenzymatisch gemessene Enzymaktivitäten und Histamingehalt am menschlichen und murinen Herzen

A

Patienten- Nummer	MAO-A [pmol/min/mg protein]	MAO-B [pmol/min/mg protein]	Histamin [ng/g]
1	912	961	993
2	823	811	782
3	262	903	761

B

	HMT [pmol/min/mg protein]			MAO-B [pmol/min/mg protein]			DAO [pmol/min/mg protein]
	LA	RA	Ventrikel	LA	RA	Ventrikel	Ventrikel
TG	60,42 ± 0,21	80,44	83,21 ± 1,05	1147,35	879,48	903,53 ± 50,80	1,078
WT	68,11 ± 4,74	114,26	79,06 ± 3,51	1759,88	1056,65 ± 152,04	869,34 ± 27,60	1,45

A Dargestellt sind die Enzymaktivitäten der MAO-A und MAO-B in pmol/min/mg Protein und der Histamingehalt in ng/g. Gemessen wurde an menschlichen Herzgewebe.

Man erkennt in der Aktivität der MAO-A und MAO-B keine wesentlichen Unterschiede und würde somit von individuellen Variationen sprechen. Der niedrige Histamingehalt bei den ersten Patienten ist am Wahrscheinlichsten auf eine Fibrose des Herzgewebes zurückzuführen.

B Zeigt die Enzymaktivitäten der MAO-A und MAO-B und der DAO in pmol/min/mg protein gemessen an murinen rechten (RA) und linken (LA) Vorhofpräparaten, sowie an Ventrikeln von WT-Mäusen (WT) und H₂-Histamin Rezeptor überexprimierenden Mäusen (TG).

Die Messungen wurden von Frau Prof. Fogel im Institut für Biochemie an der medizinischen Universität in Lodz, Polen durchgeführt.

Tab. 4: Histamingehalt gemessen mittels HPLC

Spezies	Probenart	Histamingehalt
Maus	Herzgewebe	
	a) Mit Blut b) perfundiert	a) 0,177 pmol/mg Gewebe b) 0,038 pmol/mg Gewebe
Maus	isolierte Kardiomyozyten	
	a) 21.08.2013 b) 22.08.2013	a) 1,28 pmol b) 1,90 pmol
Maus	a) Vollblut b) Serum	a) 38,8 pmol/ml b) 16,46 pmol/ml

Die Spiegel von Histamin und N-Methylhistamin wurden mittels *high-performance liquid chromatography* (HPLC) mit flourometrischer Messung bestimmt. Dazu wurden Herzgewebe, isolierte Kardiomyozyten, sowie Serum und Vollblut von Mäusen untersucht.

Diese Messung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie Hannover unter der Leitung von Herr Prof. Dr. Volkhard Kaever.

4.9. EC₅₀-Werte

Die Potenz eines Pharmakons beschreibt die Wirkstärke, d.h. die gemessene Konzentration bei der eine signifikante Wirkung eintritt. Um sie zu vergleichen wird die effektive Konzentration (effective concentration, EC₅₀) des verwendeten Wirkstoffs herangezogen, die die Konzentration beschreibt, bei der die Hälfte der maximalen Wirkung erreicht wird.

In der folgenden Tabelle (Tab. 5) sind die EC₅₀-Werte aller, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche aufgelistet:

Die linken Vorhofpräparate der Kontrollgruppe, d.h. der Gruppe, die ohne Vorinkubation mit einem Wirkstoff eine Histamin-KWK beginnend von 1 nM bis 10 µM Histamin im Organbad erhielten, zeigten einen EC₅₀-Wert von $-7,07 \pm 0,0,14$. Im Laufe der durchgeführten Experimente wurden vor der Erstellung einer Histamin-KWK verschiedene Hemmstoffe des Histaminmetabolismus für 10 - 30 Minuten inkubiert. Der Histaminabbau kann, wie in 6.2. erläutert, durch zwei verschiedene Wege erfolgen. In den Versuchen wurde zum einem der DAO-Hemmer AG eingesetzt, der das erste Enzym des einen Abbauewegs hemmt, sowie Tranylcypromin und QAN, die beide unterschiedliche Enzyme des zweiten Abbauewegs hemmen, eingesetzt (s. Abb.1).

Die Histamin-KWKs mit der singulären, vorherigen Inkubation mit Aminoguanidin, Tranylcypromin, sowie der kombinierten Inkubation mit Aminoguanidin und Quinacrin zeigen signifikant erhöhte EC₅₀-Werte. Lediglich die Einzelgabe von Quinacrin vor der Histamin-KWK führt nicht zu einem signifikanten Anstieg.

Tab. 5: EC₅₀ und maximale Effekte der rechten und linken Vorhofpräparate

		EC ₅₀ linke Vorhöfe [-(log[M])]	EC ₅₀ rechte Vorhöfe [-(log[M])]	Maximaler Effekt linke Vorhöfe [mN]	Maximaler Effekt rechte Vorhöfe [bpm]
--	--	---	--	--	--

WT	Isoprenalin-KWK	8,18 ± 0,26	8,77 ± 0,27	7,75 ± 0,07 *	565,60 ± 30,00 *
-----------	------------------------	-------------	-------------	---------------	------------------

TG	Histamin-KWK	7,07 ± 0,14	6,80 ± 0,05	11,37 ± 0,33 *	350,20 ± 23,41 *
	+ Aminoguanidin	7,39 ± 0,19 #	-	13,46 ± 0,45 *	549,30 ± 75,87 *
	+ Quinacrin	7,39 ± 0,12	-	12,59 ± 0,29 *	365,20 ± 111,60
	+ Aminoguanidin/ Quinacrin	7,45 ± 0,12 #	-	11,72 ± 0,27 *	434,40 ± 36,1 *
	+ Tranylcypromin	7,42 ± 0,45 #	-	12,29 ± 0,28 *	-

Mensch	Histamin-KWK	5,11 ± 0,32		10,09 ± 1,14 *	
---------------	---------------------	-------------	--	----------------	--

Dargestellt sind die EC₅₀-Werte, sowie die maximalen Effekte der einzelnen Versuche bei linken und rechten murinen Vorhofpräparaten, sowie an menschlichen Vorhofpräparaten (WT= Wildtyp-Maus; TG= transgene Maus).

Verwendete Substanzen: 1 mM Aminoguanidin, 2 µM Quinacrin, 10 µM Tranylcypromin. Diese Substanzen wurden jeweils vor einer Histamin-KWK von 1 nM bis 10 µM appliziert.

*p < 0,05 vs. Kontrolle zu Beginn des jeweiligen Versuches; #p < 0,05 vs. TG/Histamin.

5. Diskussion

Das Vorhandensein von Histamin im Maus- und Menschenherzen, sowie die Existenz des zur Histaminsynthese notwendigen Enzyms Histidin-Decarboxylase (HDC) ist bereits beschrieben worden (Patella et al. 1995; He et al. 2012). Ergänzend wurde nun untersucht, ob es zu einer kontraktile relevanten Produktion von Histamin aus seinem Vorläufer Histidin im Herzen kommt. Weiterhin wurde untersucht, in wie weit sich die Hemmung der Histamin abbauenden Enzyme (N-Methyl-Transferase, MAO-B und Diaminoxidase) auf die Kraft bzw. Frequenz am Herzen ausüben. In der Abb. 21 sind der Histaminmetabolismus, sowie die Signaltransduktion über den H₂-Histamin-Rezeptor schematisch dargestellt. Histamin hat am Herzen über den H₂-Histamin-Rezeptor eine positiv inotrope- und chronotrope Wirkung (Dale und Laidlaw 1910).

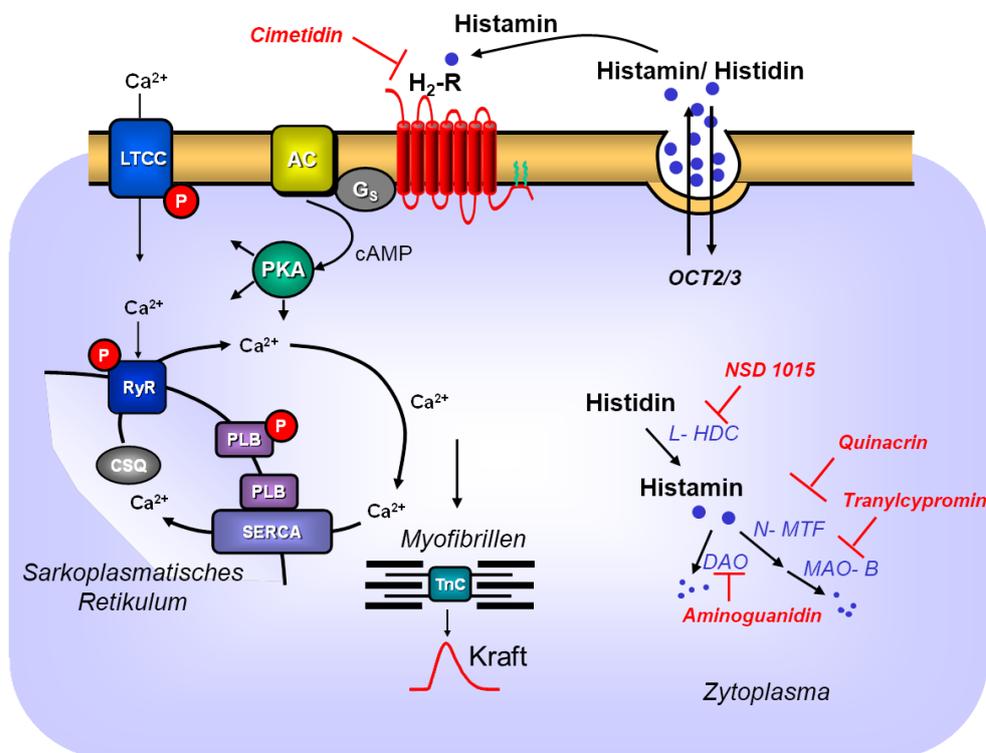


Abb. 21: Histaminmetabolismus und Signaltransduktion über den H₂-Histamin Rezeptor an Kardiomyozyten

Dargestellt ist die Signaltransduktion über den H₂-Histamin Rezeptor, sowie der Histaminmetabolismus und seine Hemmstoffe.

AC: Adenylcyklase
 CSQ: Calsequestrin
 G_s: stimulatorische G-Protein
 LTCC: L-Typ-Kalzium Kanal
 PKA: Proteinkinase A
 PLB: Phospholamban
 RyR: Ryanodin- Rezeptor
 SERCA: SR Kalzium ATPase
 OKT: organische Kationen
 Transporter
 L-HDC: L-Histidin-Decarboxylase
 N-MTF: N-Metyltransferase

MAO-B: Monoaminoxidase-B
 DAO: Diaminoxidase

5.1. Diskussion der Methoden

5.1.1. Genetische Veränderung

Für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente wurden isolierte linke und rechte Herzvorhofpräparate von Mäusen verwendet. Dabei handelte es sich zum Einem um CD1-Wildtyp-Mäuse (WT) und zum Anderem um transgene Tiere (TG) mit einer kardialen Expression des menschlichen H₂-Histamin-Rezeptors. Mittels funktioneller Versuche im Rahmen der Kontraktionsexperimente wurde die Expression nachgewiesen. Die WT-Mäuse exprimieren keine funktionell wirksamen H₂-Histamin-Rezeptoren. Es sind somit zwischen den zwei hier verwendeten Maus-Typen vergleichende Aussagen möglich. Es wurden bereits einige Studien durchgeführt, bei denen mittels α -MHC Promotern eine herzspezifische Expression des zu untersuchenden Gens (H₂) erreicht wurde (Gergs et al. 2019; 2020). Eine genaue Aussage zur H₂-Histamin-Rezeptordichte kann aktuell jedoch noch nicht gemacht werden, da es momentan keinen kommerziellen Antikörper gibt mit welchem man diesen Rezeptor tatsächlich nachweisen könnte. Bereits 2010 stand man in einer Studie, bei der Mäuse mit einer kardialen Überexpression des humanen 5-HT₄-Rezeptors untersucht wurden, vor diesem Problem (Gergs et al. 2010).

5.1.2. Transgene Mausmodelle

Versuche an menschlichem Herzgewebe sind schwer durchzuführen. Es stehen lediglich Gewebeproben, die im Rahmen von notwendigen Herzoperationen bei entsprechenden Vorerkrankungen entnommen werden können, zur Verfügung. Eine Vergleichbarkeit der Proben wäre somit, im Sinne einer Studie, nicht zu erreichen. In Tiermodellen hingegen ist es möglich, die Vergleichbarkeit der Proben neben den identischen Versuchsaufbau auch auf den Ausgangszustand der Proben auszuweiten. Dabei sind u.a. Geschlecht, Größe, Alter, Lebensweise und Gesundheitszustand, sowie die standardisierte Entnahmetechnik und extrakorporale Lagerungsbedingungen wichtige Parameter, die eine Vergleichbarkeit der Proben gewährleisten.

Weiterhin besteht bei menschlichen Herzpräparaten nicht die Möglichkeit, einen intakten Sinusknoten zu untersuchen. Dies ist jedoch bei Tiermodellen, wie z.B. hier an murinen Herzpräparaten möglich.

Tiermodelle sind im Allgemeinen im Rahmen der Grundlagenforschung etabliert. Über die klinische Relevanz der gewonnenen Daten muss in jedem Fall ausführlich diskutiert werden, da Tiermodelle nicht die tatsächliche Situation im menschlichen Organismus widerspiegeln können. Das murine Herz stellt in diesem Fall, da es dem menschlichen Herz strukturell

ähnelt, ein gutes Modell dar (London 2001; Lerman et al. 2019). Es kann jedoch trotzdem lediglich Hinweise auf die Situation im menschlichen Herzen geben.

Die hier durchgeführten Experimente bezogen sich auf den H₂-Histamin-Rezeptor, welcher im menschlichen Herzen nachgewiesen wurde (Jutel et al. 2009). Letztlich lässt sich jedoch nicht ausschließen, ob für die Wirkung des Histamins am menschlichen Herzen auch die weiteren Histamin Rezeptoren (H₁-, H₃- und H₄-Histamin-Rezeptoren) mitverantwortlich sind (Matsuda et al. 2004). Dazu wurden bereits Studien durchgeführt. Darin wurde auch gezeigt wurde, dass Histamin eine anti-entzündliche Rolle spielt, in dem es die Cytokin-Genexpression durch den H₃-Histamin-Rezeptor unterdrückt (Moriguchi und Takai 2020).

5.1.3. Kontraktionsexperimente

Die Kontraktionsversuche wurden an isolierten rechten und linken Vorhofpräparaten durchgeführt. Dies setzt eine sehr präzise Präparation voraus, da bereits geringe Schädigungen an dem sensiblen Gewebe zu fehlerhaften Messungen führen können. Bei den rechten Vorhofpräparaten wurden Fehler gehäuft deutlich durch von Beginn an bestehenden Arrhythmien. Die linken Vorhofpräparate zeigten bei präparationsbedingten Schäden u.a. eine eingeschränkte Kontraktilität, die sich bei vor allem an geringen Kraftanstiegen bei Kontrollmessungen am Ende der Versuchsreihen mit Isoprenalin und Calciumchlorid äußerten.

Die Mäuse wurden vor der Organentnahme mit Pentobarbital, einem mittellangwirkenden Barbiturat, welches in der Tiermedizin zum Einschlafen verwendet wird, narkotisiert. In einer Untersuchung der Arbeitsgruppe um Chong Han (Chong et al. 2017) wurden die Auswirkungen der verwendeten Narkosemittel auf die Sauerstoffsättigung und im Elektrokardiogramm (EKG) an Mäusen untersucht. Verglichen wurden Inhalationsnarkotika, wie Sevofluran und Isofluran und intraperitoneal applizierte Narkotika, wie Pentobarbital. Es zeigte sich nach der Narkotisierung mit Pentobarbital eine Verringerung der Herzfrequenz und der Sauerstoffsättigung, sodass die Inhalationsnarkose in dieser Studie für geeigneter zur Beurteilung von kardialen Untersuchungen an Mäusen eingeschätzt wurde. Jedoch ist die Anwendbarkeit der Inhalationsnarkose komplexer. Es werden spezifische Geräte, wie Verdampfer und Durchflussmesser, sowie effiziente Spülsysteme zur Vermeidung von Verschmutzungen der Raumluft benötigt. (Gargiulo et al. 2012)

Des Weiteren dauerten die Versuchsabläufe teilweise bis zu sechs Stunden, sodass es im Laufe des Experiments kontinuierlich zu einer Abschwächung der Kontraktilität kam. Dies

wurde vor allem an dem geringeren Ansprechen der Vorhofpräparate auf die am Ende der Versuche applizierten Kontrollgaben von 1 μ M Isoprenalin und 0,01 M Calciumchlorid und an der kontinuierlichen Kraftabnahme, z.B. während einer KWK, festgestellt. Kraft- oder Frequenzabnahmen während der KWKs oder Inkubationszeiten können auch durch eine unzureichende Vorspannung der Vorhofpräparate bedingt sein. Dies war vor allem dann anzunehmen, wenn es bei den Vorhofpräparaten zu einem kontinuierlichen Abfall der Kraft oder Frequenz von Beginn der Untersuchungsdauer kam.

Wie in 4.4. erläutert, zeigten sich bei den rechten Vorhofpräparaten gehäuft basale arrhythmische Veränderungen. Diese können, wie bereits erwähnt, präparationsbedingt oder aufgrund einer myokardschädigenden Unterbrechung der Sauerstoff- oder Elektrolytversorgung im Laufe der Präparation auftreten. Jedoch könnte man, da die Arrhythmien häufiger an TG-Vorhofpräparaten auftraten ($p < 0,05$ TG vs. WT) vermuten, dass es sich um Veränderungen aufgrund der H_2 -Histamin-Rezeptor-Expression handelt. Dazu wurden bereits weiterführende Untersuchungen durchgeführt und gezeigt, dass eine Überexpression des H_2 -Histamin-Rezeptors zu Arrhythmien führen kann (Gergs et al. 2021a).

Hinzu kommt, dass Histamin selbst auch ein hohes arrhythmogenes Potenzial zugeschrieben wird (Cirkel et al. 1994). Dies würde vor allem die Arrhythmien erklären, die im Verlauf der kumulativen Histaminapplikationen aufgetreten sind.

Da nur isolierte Vorhofpräparate verwendet wurden, kann kein sicherer Rückschluss auf die Auswirkung der Substanzgaben auf das komplette Herz gezogen werden. Die Ergebnisse können somit nur auf die Funktion des Sinusknoten, bzw. der Myokardzellen des Vorhofpräparates bezogen werden. Um die Wirkung auf das gesamte Herz beurteilen zu können, wurden bereits Untersuchungen an z.B. an einer Langendorff-Anlage mit isolierten, kompletten murinen Herzen durchgeführt. Darin konnte die positiv inotrope Wirkung des Histamins gezeigt werden (Gergs et al. 2019).

5.2. Diskussion der Ergebnisse

Histamin ist an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen des Organismus beteiligt. Es wurden bisher zahlreiche Studien dazu an Mäusen durchgeführt. Die Arbeitsgruppe um Zimmermann hat die Konzentrationen von Histamin in verschiedenen Organen der Maus mittels high-performance liquid chromatography (HPLC) gekoppelt an eine Massenspektrometrie (HPLC-MS) gemessen (Zimmermann et al. 2011). Histamin wurde dabei in allen Organen nachgewiesen. Die höchste Konzentration von Histamin fand

man im Magen, Lymphknoten und Thymus (ca. 10 - 40 pmol/mg). Mittlere Konzentrationen von Histamin wurden in Herz, Nieren und Milz gemessen (ca. 2 - 10 pmol/mg). Die geringste Konzentration fand sich im Gehirn, Leber, Lunge und Darm (ca. 0,5 pmol/mg) (Zimmermann et al. 2011). In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Volkhard Kaefer (Medizinische Hochschule Hannover) wurden Herzproben von hier verwendeten Mäusen mittels HPLC-MS untersucht. Dabei wurde u.a. in Herzgewebe ein Histamingehalt von ca. 0,18 pmol/mg gemessen (siehe Tab. 4) (Neumann et al. 2021a). Dies liegt unter dem Wert der bereits erwähnten Studie und auch unter dem Ergebnissen, welche Wolff und Levi 1986 bestimmt haben (ca. 3,60 pmol/mg) (Wolff und Levi 1986). In deren Studie wurden darüber hinaus festgestellt, dass der höchste Gehalt von Histamin in Herzen von Meerschweinchen und Hunden (ca. 38,7 pmol/mg) vorliegt. Danach folgen Ratten, Menschen und Affen (ca. 14,40 - 34,18 pmol/mg). Die geringste Konzentration wurde in Mausherzen gemessen. Den geringen Histamingehalt der Maus erklärten sie anhand der ebenfalls geringen Menge an Mastzellen im Herzen der Maus (Wolff und Levi 1986). Der geringe Histamingehalt der hiesigen Proben, könnte u.a. an der kleinen Probenanzahl liegen (= exemplarische Messungen).

5.2.1. Wirkung von Histamin und Histidin

Die im Vorfeld erwartete positiv inotrope Wirkung von Histamin konnte mit den durchgeführten Versuchen bestätigt werden. Es zeigte sich bei den TG-Vorhofpräparaten eine Kraftzunahme während steigende Histaminkonzentrationen appliziert wurden. Bei WT-Vorhofpräparaten zeigte sich kein Effekt bei kumulativen Gaben von Histamin. Dies wurde bereits bei der Erstbeschreibung dieses Tiermodells erläutert (Gergs et al. 2019). Davon abgeleitet ergibt sich die Hypothese, dass die Applikation des Histaminvorläufers Histidin ebenso zu einer Kraftzunahme bei TG-Vorhofpräparaten führt. Jedoch ließ dieser Effekt im Rahmen dieser Dissertation nicht darstellen.

Histidin wird über die L-Histidindecaboxylase (HDC), die das Schlüsselenzym der Histaminsynthese ist, zu Histamin umgewandelt (Jutel et al. 2009). Im Jahr 2001 beschrieb die Arbeitsgruppe um Ohtsu, dass die HDC das wichtigste Histaminproduzierende Enzym bei den Säugetieren ist. Bei Messungen der Histaminkonzentration in der Peritonealflüssigkeit der Maus fiel die Histaminkonzentration nach der Deletion der HDC von 50 pmol/ml auf unter die Nachweisgrenze ab (Ohtsu et al. 2001). Das Vorhandensein der HDC in den Herzen der hier verwendeten Mäuse, wurde mittels Westernblot (siehe Kapitel 4.7.) nachgewiesen. In den ersten Versuchen sollte eine mögliche Funktion der L-Histidindecaboxylase für die Inotropie und/oder Chronotropie des Herzens untersucht werden. Es wurde ein positiv inotroper bzw. chronotroper Effekt an den isolierten

Vorhofpräparaten erwartet, da die Histaminkonzentration durch die Gabe von Histidin bei dem Vorhandensein einer relevanten HDC-Aktivität ansteigen müsste. Dies war jedoch in den hier durchgeführten Experimenten nicht darstellbar. Es kam zu keiner aussagekräftigen Änderung in der Kraft oder Frequenz (s. Kap. 4.2.4.). Um dies zu erklären sind mehrere Hypothesen denkbar:

Zum Einem könnte die Aufnahme von Histidin in die Zelle zu gering sein. Dies könnte man überprüfen, indem man den Histidingehalt an TG-Vorhofpräparaten misst. Dabei sollte man Gewebe untersuchen, welches bereits Histidin appliziert bekommen hat und im Vergleich dazu unbehandeltes Gewebe.

Ein weiterer Punkt wäre, dass die Aktivität der HDC zu gering ist und es somit zu keinem kontraktil wirksamen Anstieg der Histaminkonzentration kommt. Dies könnte man in weiterführenden Versuchen durch die Erstellung von Western-Blots und Enzymmessungen überprüfen. In der Literatur sind Polymorphismen der HDC beschrieben, deren Bedeutung bisher noch unklar sind und u.a. in Zusammenhang mit dem Tourette-Syndrom gebracht werden (Ercan-Sencicek et al. 2010). Es könnte sich somit auch um eine Form der HDC in den Kardiomyozyten handeln, die nur langsam oder in geringen Mengen Histamin aus Histidin synthetisiert. Weiterführend könnte man den Metabolismus an isolierten Kardiomyozyten untersuchen. Eine weitere Hypothese wäre, dass die HDC nicht bzw. nicht nur in den Kardiomyozyten vorkommt, sondern auch in anderen Zelltypen des Herzens. So wird in einer Veröffentlichung 2018 beschrieben, dass es zu einem erhöhten Histaminspiegel und begleitend zu einem Zuwachs von HDC-exprimierenden myeloischen Zellen im Serum von Patienten und im Mausmodell mit akutem Myokardinfarkt kommt (Ding et al. 2018). Somit wird eine Betrachtung von Geweben/Zellen bezüglich der HDC-Aktivität und der Histaminspiegel bei verschiedenen Erkrankungen denkbar.

Schließlich könnte der Abbau des entstandenen Histamins so schnell ablaufen, so dass es zu keiner messbaren und somit kontraktil wirksamen Erhöhung der Histaminkonzentration kommt. Diese Hypothese kann durch weiterführende Versuche überprüft werden, indem z.B. vor einer Histidin-KWK ein Hemmstoff des Histaminabbaus appliziert wird. Dieser Versuchsablauf wurde im Rahmen dieser Dissertation mit Quinacrin und Aminoguanidin an H₂-Histamin-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.4.) Eine Kraft- bzw. Frequenzzunahme und somit ein kontraktil wirksamer Anstieg der Histaminkonzentration konnte jedoch nicht dargestellt werden. In weiteren Versuchen könnte ergänzend die Wirkung von anderen Hemmstoffen des Histaminabbaus, z.B. Tranylcypromin, getestet werden.

Wie in Kapitel 4.2.3. kam es bei den Histidin-KWKs ab einer Histidinkonzentration von 0,001 M Histidin zu einem initial negativ inotropen Effekt mit anschließendem positiv inotropem Effekt. Dieser war bei linken WT- und TG-Vorhofpräparaten zu sehen und schließt

damit einen H₂-Histamin-Rezeptor vermittelten Effekt aus. Vielmehr ist anzunehmen, dass es sich um einen pH-Wert abhängigen Effekt handeln könnte. Histidin wirkt in hohen Konzentrationen sauer (Hakason und Liedberg 1971). Durch die Applikation von NaOH könnte der Effekt auf den pH-Wert bei hoher Histidinkonzentration verringert werden. Interessant wäre, ob damit der beschriebene Effekt an WT- und TG-Vorhofpräparaten aufhebbar ist. Dazu sind weitere Untersuchungen nötig.

5.2.2. Wirkung von Cimetidin und NSD 1015

Der Hemmung des H₂-Histamin-Rezeptors wird eine kardioprotektive Wirkung bei Patienten mit chronischen Herzerkrankungen zugeschrieben. Dazu konnte in Untersuchungen an Hundeherzen gezeigt werden, dass sich die Blockade des H₂-Histamin-Rezeptors günstig bei ischämischen Herzerkrankungen auswirkt (Asanuma et al. 2006). In diesen Versuchen sollte überprüft werden, wie sich die Hemmung des H₂-Histamin-Rezeptors auf die Kraft des Herzens auswirkt. Eine signifikante Änderung der Kraft und Frequenz konnte nicht dargestellt werden. Anzunehmen ist in diesem Fall eher ein langsames Abschwächen der Kraft im Laufe des Experiments als ein Effekt auf das applizierte Cimetidin. In weiterführenden Experimenten könnte man, um den Effekt von Cimetidin besser darzustellen, eine Histamin-KWK nach einer 30-minütigen Inkubationszeit mit Cimetidin anfügen.

NSD 1015 ist ein Hemmstoff der HDC und führt somit zu einer verminderten Synthese von Histamin aus Histidin und könnte sich so ebenfalls bei chronischen Herzerkrankungen positiv auswirken (Asanuma et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte nach der Vorbehandlung mit NSD 1015 keine signifikante Veränderung der Kraft oder der Frequenz gezeigt werden. In ergänzenden Untersuchungen könnte man andere Hemmstoffe der HDC einsetzen. Als spezifischster Hemmstoff ist z.B. α -Fluoromethylhistidin beschrieben und würde sich dazu anbieten (Garbarg et al. 1980).

Interessant war bei den durchgeführten Versuchen ein positiv inotroper und chronotroper Effekt, der bei der 30-minütigen Inkubationszeit mit NSD 1015 auftrat. Dieser Effekt trat bei WT- und TG-Vorhofpräparaten auf und wurde so bereits schon in vorherigen Versuchen im hiesigen Institut beschrieben (Jung 2019). Der dafür ursächliche, vom H₂-Histamin-Rezeptor-Status unabhängige Mechanismus ist bisher noch nicht identifiziert. Es könnte sich um einen catecholaminbedingten Effekt handeln.

5.2.3. Wirkung von Aminoguanidin, Quinacrin und Tranycypromin

Histamin wird im Gewebe entweder durch Methylierung des Imidazolrings durch die HMT oder durch die oxidative Desaminierung der primären Aminogruppe über die DAO inaktiviert (Schwelberger et al. 2017).

Immunhistochemisch ließ sich das Vorhandensein der DAO und HMT im Endothel der Kapillaren und Arteriolen, sowie in den Zellkernen darstellen (siehe Kapitel 4.6). Bereits 1985 wurde in Messungen des Histamingehalt im Urin von Ratten beschrieben, dass die Hemmung der DAO einen höheren Effekt besitzt als die Hemmung der HNMT (Hui und Taylor 1985). Auch bei den hier durchgeführten Experimenten wurde dies deutlich: Bei den Versuchen mit dem DAO-Hemmer AG zeigte sich eine signifikante Potenzsteigerung während der durchgeführten Histamin-KWK ($pEC_{50} -7,39 \pm 0,19$ vs. Histamin allein $pEC_{50} -7,07 \pm 0,14$). Dieser Effekt konnte durch die gemeinsame Vorbehandlung mit Quinacrin, den Hemmstoff der HMT noch leicht verstärkt werden ($pEC_{50} -7,45 \pm 0,12$). Jedoch zeigte sich bei der alleinigen Gabe von Quinacrin vor den Histaminapplikationen keine signifikante Veränderung der Kraft gegenüber den Kontrollpräparaten ($pEC_{50} -7,39 \pm 0,12$). Interessanterweise wurden in radioenzymatischen Messungen der Enzymaktivität, die vom Institut für Biochemie in Lodz durchgeführt wurden, nur sehr geringe Werte der DAO in murinen Ventrikeln gemessen (s. Tab. 3). Das lässt sich damit erklären, dass die DAO eher dafür gedacht ist extrazelluläres Histamin, z.B. im Darm, abzubauen (Sattler et al. 1988). Die HMT-Aktivität konnte im gesamten Herzen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stellt die Frage, in wie weit die hier erhaltenen Ergebnisse auf einer Hemmung der DAO zurückzuführen sind, da deren Aktivität in den murinen Herzgeweben nicht nachgewiesen werden konnte. Um erst einmal auszuschließen, dass Aminoguanidin über andere Mechanismen (z.B. über die Ausschüttung von Katecholaminen) zu den Veränderungen an den Präparaten geführt hat, könnte man in nachfolgenden Experimenten zum Einem Propranolol oder zum Anderen einen neueren und selektiveren Hemmstoff der DAO, z.B. Berenil einsetzen. Weiterhin könnte man die DAO weiter charakterisieren. Dazu hat die Gruppe um Schwelberger bereits Untersuchungen angestellt. Sie haben monoklonale Antikörper entwickelt, die spezifisch für die menschliche DAO und HNMT sind, um deren Expression und zelluläre Lokalisierung genauer darzustellen (Schwelberger et al. 2017; Schwelberger et al. 2018). Ziel der Arbeitsgruppe ist es auch Enzymvarianten, welche bereits 2002 als Einzelnucleotidpolymorphismus (= single nucleotide polymorphisms (SNPs)) beschrieben wurden (Petersen et al. 2002), zu detektieren. Dies wäre wichtig um genauere Untersuchung von Krankheiten, die mit einem beeinträchtigten Histaminabbau einhergehen (z.B. Colitis ulcerosa und Morbus Crohn), durchzuführen (Petersen et al. 2002; Schwelberger et al. 2017).

Auffällig war ein positiv inotroper Effekt während der gemeinsamen Inkubation mit $2 \mu\text{M}$ Quinacrin und 1 mM Aminoguanidin, der sich bei den linken Vorhofpräparaten der transgenen Mäuse darstellt. Ursächlich dafür könnte endogen vorhandenes Histamin sein, welches während der 30-minütigen Inkubation mit Aminoguanidin und Quinacrin freigesetzt

wird und so einen positiv inotropen Effekt erzielt. Um dies weiter zu prüfen, könnte man den Histaminspeicher z.B. mittels hohen Dosen von Reserpin entleeren und nach anschließenden, gründlichen Spülen der Vorhofpräparate mit Tyrode-Lösung, erneut Quinacrin und Aminoguanidin applizieren.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass sie die Effektivität während einer Histamin-KWK durch die vorherige Inkubation mit 10 μ M Tranylcypromin steigern lässt. Tranylcypromin ist ein unselektiver Hemmstoff der MAO. Im Histaminmetabolismus ist die MAO-B für die Umwandlung von N-Methylhistamin in N-Methylimidazol-4-yl-essigsäure zuständig. Die MAO besitzt zwei Isoenzyme, MAO-A und MAO-B, welche in verschiedenen, benachbarten Genen auf den kurzen Arm des X-Chromosoms codiert sind. Sie bestehen zu 70 % aus identischen Aminosäuresequenzen und werden in den meisten Geweben des Organismus exprimiert, jedoch unterscheidet sich die Verteilung je nach Region. Ebenso unterscheiden sich die beiden Isoenzyme in ihrer Substratselektivität (Garcia-Miralles et al. 2016, Özdemir et al. 2021). Es werden einige Erkrankungen mit einer veränderten Aktivität der MAO-A und MAO-B in Verbindung gebracht. Eine Dysregulation der MAO-A Aktivität wird mit psychiatrischen Erkrankungen, wie Depressionen, Autismus und Angststörungen in Verbindung gebracht, wohingegen die MAO-B Aktivität bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Parkinson involviert sein soll. Veränderungen in beiden Isoformen wurden in Gewebe von Patienten mit Chorea Huntington nachgewiesen (Garcia-Miralles et al. 2016). Desweiteren ist bereits bekannt, dass die Hemmung der MAO-A das Auftreten einer Herzinsuffizienz bei Mäusen mit druckbelasteten Herzen verhindern kann (Kaludercic et al. 2014). Die Rolle der MAO-B am Herzen wurde in den letzten Jahren ebenso untersucht und es wurde gezeigt, dass sie für den Katecholaminabbau und die Aufrechterhaltung der Herzfunktion mitverantwortlich ist. Die MAO-B-Aktivität führt, z.B. bei druckbelasteten Herzen, zur Entstehung von oxidativem Stress, sowie funktionalen und strukturellen Veränderungen am Herzgewebe. In Experimenten mit Mäusen, die einen MOA-B-Mangel haben, konnte gezeigt werden, dass es bei diesen Mäusen zu weniger strukturellen und funktionellen Umbauten unter Druckbelastung kam (Kaludercic et al. 2014). Im Rahmen dieser Dissertation konnte immunhistochemisch und mittels Western-Blot das Vorhandensein von MAO-A und MAO-B in dem untersuchten Herzgewebe dargestellt werden (s. Kapitel 4.6. und 4.7.). Ebenso wurde in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Fogel die Enzymaktivität der MAO-B in rechten und linken Vorhöfen und Ventrikeln von WT- und TG-Mäusen bestimmt (s. Tab. 3).

Es stellt sich nun die Frage, ob wirklich nur die MAO-B am Histaminmetabolismus beteiligt ist oder ob die MAO-A auch involviert ist. Deswegen ist es für weitere Versuche denkbar, diesen Versuchsablauf mit einem für die MAO-B selektiveren Inhibitor, z.B. Pargylin,

durchzuführen (Özdemir et al. 2020). Um darüber hinaus zu zeigen, dass der Histaminabbau nur über die MAO-B stattfindet, könnte außerdem als Negativkontrolle ein selektiver MAO-A-Hemmer, z.B. Clorgylin, getestet werden (Özdemir et al. 2020).

5.2.4. Menschliche Herzvorhöfe

Die Menge an Histamin, die im menschlichen Herzen vorkommt wurde bereits 1989 im rechten Vorhof des Menschen radioenzymatisch untersucht und ein Histamingehalt von $2,81 \pm 1,04 \mu\text{g/g}$ und im linken Ventrikel von $0,71 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ Herzgewebe gefunden (Baller und Huchzermeyer 1989; Eckel et al. 1982) und 1995 von der Arbeitsgruppe um Patella mit etwa $5 \mu\text{g/g}$ beschrieben (Patella et al. 1995). In Zusammenarbeit mit Frau Prof. Fogel (Institut für Biochemie an der medizinischen Universität in Lodz, Polen) wurden menschliche Proben, die im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurden, auf ihren Histamingehalt untersucht (s. Tab. 4). Dabei wurde eine Histaminmenge von etwa $0,85 \mu\text{g}$ ermittelt.

Dieser Wert entspricht dem, der zuvor genannten Ventrikelwerten aus der Literatur. Der Unterschied zu dem oben genannten Vorhofwert lässt sich auf verschiedene Weise erklären. Zum Einem könnte dieser durch eine fortgeschrittene Fibrosebildung des untersuchten Gewebes bedingt sein. Eine Untersuchung an gesunden, menschlichen Herzgewebe ist jedoch nicht einfach umzusetzen, da es sich um im Rahmen von notwendigen Herzoperationen entnommene Proben handelt. Andererseits könnte die Menge der im Gewebe vorhandenen Mastzellen verschieden sein. Zuletzt können die verwendete Analysemethoden, sowie die vor der Analyse durchgeführten Untersuchungen mit z.B. Histaminapplikationen, einen Einfluss auf den gemessenen Histamingehalt haben.

Durch die kumulativen Gaben von Histidin konnte in den hiesigen Versuchen keine Kraft- oder Frequenzsteigerung an murinen Vorhofpräparaten gezeigt werden. Jedoch sah man bei einigen der untersuchten, menschlichen Vorhofpräparate einen Kraftanstieg nach der Applikation von Histidin (= Responder). Dies könnte an einer großen Variabilität des Herzgewebes liegen. So sah man bei Untersuchungen an Ratten, dass Histidin auf die Kraft der Myokardkontraktionen bei nicht schwangeren Ratten keinen Einfluss hat. Dahingegen konnte jedoch eine Kraftsteigerung bei trächtigen Ratten gezeigt werden. Somit ist von einem Einfluss, von in der Schwangerschaft erhöhten Hormonspiegel (z.B. Östrogen) auf die Wirkung des Histidins am kardialen Gewebe auszugehen (Victor et al. 2018). Desweiteren sind in der Literatur Polymorphismen der HDC beschrieben, welche zu einer verringerten Aktivität der HDC und somit niedrigeren Histaminspiegel führt (He et al. 2016).

Weiterführend wurde in Versuchsreihen kumulativ Histamin zu den menschlichen Vorhofpräparaten gegeben. Der EC_{50} -Wert der menschlichen Vorhofpräparate lag bei $5,11 \pm$

0,32, der der murinen Vorhofpräparate bei $7,07 \pm 0,14$ (s. Tab. 4). Dies könnte an einer schnellen Verstoffwechslung des exogen zugeführten Histamins liegen. In der Literatur ist beschrieben, dass der Abbau des Histamins sofort beginnt und somit Halbwertszeiten von maximal drei Minuten gemessen wurden (Teloh et al. 2018; Kuefner et al. 2002).

In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2018 wurde der Histidin-, Histamin- und N-Methylimidazolessigsäuregehalt im Urin von Patienten vor, während und im Verlauf nach einem kardiochirurgischen Eingriff, bei dem eine Bretschneider-Kardioplegie durchgeführt wurde, gemessen (Teloh et al. 2018). In der besagten Bretschneider-Lösung (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat) ist eine hohe Histidinkonzentration, von ca. 198 mM Histidin enthalten. Diese soll als Puffer in der ischämischen Phase des induzierten kardialen Arrestes wirken. In den Messungen zeigte sich ein initialer Anstieg der Histidinausscheidung der schnell zurückging. Dem Gegenüber stieg die Ausscheidung von Histamin und vor allem von N-Methylimidazolessigsäure, einem Endprodukt des Histaminabbaus, signifikant an. Somit ist von einer raschen Verstoffwechslung von exogen zugeführtem Histidin im Organismus auszugehen (Teloh et al. 2018). Desweiteren wurde nach der Applikation der Kardioplegielösung eine Histidinkonzentration von ca. 60 mM im Blut erwartet. Jedoch zeigte sich in den Messungen nur ein Anstieg auf ca. ein Drittel der berechneten Konzentration (Teloh et al. 2016). Dies legt die Vermutung nahe, dass die restlichen zwei Drittel des exogen applizierten Histidins in Zellen transportiert wurden. Dort erfolgt die Verstoffwechslung über die HDC zu Histamin. Dabei erhöht die Substratkonzentration die Geschwindigkeit der Histidin-Decarboxylierung bis zur Sättigung und führt somit bei hohen Plasma-Histidin-Konzentrationen zu einer raschen Synthese von Histamin (Teloh et al. 2018). Die hier verwendeten menschlichen Präparate stammen auf kardiochirurgischen Eingriffen. Somit erfolgte vor Entnahme eine Vorbehandlung des Gewebes mit verschiedenen Substanzen. Im Falle der Verwendung der o.g. Bretschneider-Lösung könnte eine Sättigung des Gewebes mit Histidin und Histamin bereits initial bestehen. Dies könnte eine mögliche Erklärung der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Ergebnisse geben.

An den murinen Vorhofpräparaten wurden im Rahmen dieser Dissertation, Experimente gemacht, die die Wirkung von Hemmstoffen des Histaminmetabolismus auf die Kraft bzw. die Frequenz untersuchten. Es wurde auch begonnen an menschlichen Vorhofpräparaten die Wirkung von Aminoguanidin und Quinacrin zu überprüfen. Es zeigte sich keine Signifikanz.

Dies könnte z.B. an den Polymorphismen der am Histamin-Stoffwechsel beteiligten Enzyme liegen. Polymorphismen der DAO und HNMT werden u.a. mit den Auftreten von

gastrointestinalen Erkrankungen, wie Sprue, M. Crohn und Colitis ulcerosa und Asthma bronchiale, in Verbindung gebracht (Maintz und Novak 2007; Stolze et al. 2010).

Eine ausreichend große Anzahl an verwertbaren Versuchen wurde im Rahmen dieser Versuchsreihen nicht erreicht. Eine Fortführung dieser Versuche am menschlichen Vorhofgewebe ist jedoch sinnvoll, um genauer Aussagen treffen zu können, in wie weit sich die am murinen Herz erhaltenen Ergebnisse auf menschliches Gewebe übertragen lassen. Dabei sollten die Medikamente, die vorher auf den Organismus eingewirkt haben mit berücksichtigt werden.

5.3. Klinischer Ausblick

Histamin spielt bei einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen des Organismus eine Rolle. In der Vergangenheit wurde Histamin deswegen in zahlreichen Studien untersucht (Tiligada und Ennis 2020). Es sind im Laufe der Zeit vier Histamin-Rezeptoren beschrieben wurden, die alle G-Protein gekoppelt sind (Oda et al. 2002). Der H₂-Histamin Rezeptor ist vor allem aus der Behandlung von gastrointestinalem Reflux bekannt. Desweiteren kommt er am Herzen vor und wirkt positiv chronotrop und inotrop (Leary et al. 2016), wie auch in den hier durchgeführten Experimenten gezeigt wurde.

In Studien mit HDC- knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese eine verbesserte kardiale Funktion hatten und weniger Fibrose entwickelten (Chen et al. 2017). Außerdem wird die H₂-Histamin-Rezeptor-Aktivierung mit einer Erhöhung der mitochondrialen Permeabilität in Myozyten in Verbindung gebracht und soll somit die Anfälligkeit der kardialen Myozyten auf Stress erhöhen (Leary et al. 2016; Luo et al. 2013). Die Genese von kardialen Arrhythmien durch das Einwirken von Histamin auf den H₂-Histamin-Rezeptor ist ebenso bekannt (Wolff und Levi 1986; Bristow et al. 1982).

Die Arbeitsgruppe um Fitzsimons beschrieb 2001, dass die Expression des H₂-Histamin-Rezeptors abhängig von der Menge des endogenen und exogenen Histamins ist und somit veränderbar ist (Fitzsimons et al. 2001). In Patienten, die an allergischer Rhinitis leiden, konnte eine Erhöhung der H₂-Histamin-Rezeptor mRNA festgestellt (Hirata et al. 1999).

Es wird somit deutlich, dass Histamin und seine Rezeptoren gesamten Organismus vorhanden sind und an zahlreichen Prozessen beteiligt sind. Die Untersuchung der Wirkungsweise von Arzneistoffen auf den Histaminmetabolismus anhand von Tiermodellen ist daher sinnvoll. Vor allem wenn es sich, wie in diesem Fall, um spezifische Rezeptorbetrachtungen handelt.

6. Zusammenfassung

In menschlichen Herzmuskelpräparaten ist Histamin vorhanden und wirkt positiv inotrop. Dazu erfolgten Untersuchungen an Wildtyp-Mäusen und an transgenen Mäusen, die den humanen H₂-Histamin-Rezeptor kardial überexprimierten. Weiterhin fanden Untersuchungen an menschlichen Trabekelmuskeln statt.

Eine kontraktile wirksame Histaminsynthese aus dem Vorläufer Histidin über die L-Histidindecarboxylase konnte nicht dargestellt werden, obwohl die L-Histidindecarboxylase in Kardiomyozyten nachgewiesen werden konnte (Jutel et al. 2009). An menschlichen Trabekelmuskeln zeigten sich Non-Responder, die bei Histidingaben keinen positiv inotropen Effekt zeigten und Responder, bei denen die Kraft bei steigenden Histidinkonzentrationen zunahm.

Histamin führte bei den transgenen Vorhofpräparaten zu Kraft- und Frequenzanstiegen und bei den menschlichen Vorhofpräparaten zu einem Kraftanstieg. An Wildtypmäusen konnten diese Effekte durch die Applikation von Histamin nicht erzielt werden.

Histamin wird grundsätzlich über verschiedene Wege enzymatisch abgebaut. Das Vorhandensein, der in den Versuchen gehemmten Enzyme (Diaminoxidase, Histamin-N-Methyltransferase und Monoaminoxidase-B) wurde mittels Western-Blot, Aktivität und Immunhistologie nachgewiesen.

Die Hemmung der Diaminoxidase durch Aminoguanidin führte in der Histamin-Konzentration-Wirkungskurve bereits ab 10 nM Histamin zu einer signifikanten Kraftzunahme, wohingegen die Kontrollen ohne Aminoguanidin erst ab 3 µM einen signifikanten Anstieg zeigten. Weiterhin wurde der zweite Abbauweg von Histamin, die Histamin-N-Methyltransferase durch Quinacrin gehemmt. Hierbei konnte jedoch kein signifikanter Effekt gezeigt werden. Dahingegen führte die Kombination aus Aminoguanidin und Quinacrin wiederum zu einer signifikanten Kraftzunahme der linken Vorhöfe ($p < 0,05$).

Die Applikation von Tranylcypromin, einen Hemmstoff der Monoaminoxidase, führte im Vergleich zu den Kontrollen in der Histamin-Konzentration-Wirkungskurve zu einer Effektivitätssteigerung.

Es findet ein Metabolismus von Histamin im Herzen statt und er kann durch die Gabe verschiedener Substanzen beeinflusst werden. Das Wissen über die kardiale Auswirkung von Medikamenten, die den Histaminspiegel beeinflussen können, ist von großer Bedeutung und sollte bei der Neueinstellung von Patienten auf Medikamente mit beachtet werden.

7. Literatur

- Aktories/Förstermann/Hofmann/Starke (2017) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag, München; ISBN: 9783437425257.
- Ansari P (2013) Die Therapieggeschichte der Depression und die Einführung der antidepressiven medikamentösen Therapie in der BRD im Zeitraum von 1945-1970. Dissertation. Institut für Geschichte, Ethik und Philosophie in der Medizin Hannover; DOI: 10.26068/mhhrpm/20190628-001.
- Asanuma H, Minamino T, Ogai A, Ogai A, Kim J, Asakura M, Komamura K, Sanada S, Fujita M, Hirata A, Wakeno M, Tsukamoto K, Yoshiro S, Myoishi M, Takashima S, Tomoike H, Kitakaze M (2006) Blockade of histamine H₂ receptors protects the heart against ischemia and reperfusion injury in dogs. *Journal of molecular and cellular cardiology*; DOI: 10.1016/j.yjmcc.2006.02.001.
- Baller D, Huchzermeyer H. (1989) Histaminwirkungen am Herzen unter besonderer Berücksichtigung kardialer Nebenwirkungen von H₂-Rezeptor-Antagonisten. *Klinische Wochenschrift*, Auflage 67:743-755; DOI: 10.1007/bf01745343.
- Best CH, Dale HH, Dudley HW und Thorpe WV (1927) The nature of the vaso-dilator constituents of certain tissue extracts. *J. Physiol.* 62(2):397-417; DOI: 10.1113/jphysiol.1927.sp002369.
- Blum A, Siewert JR (1981) Refluxtherapie: Gastrooesophageale Refluxkrankheit: Konservative und operative Therapie (Interdisziplinäre Gastroenterologie); Springer Verlag; Seiten 170-192; ISBN: 3540101799.
- Bristow M, Ginsburg R, Harrison DC. (1982) Histamine and the Human Heart: The Other Receptor System. *The American Journal of cardiology*, Auflage 49; 249-251; DOI: 10.1016/0002-9149(82)90298-3.
- Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC (2011) Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutic 13th edition. McGraw-Hill New York 2017. ISBN: 978-1259584732.
- Buchwalow IB, Böcker W. (2010) Immunohistochemistry: Basics and Methods. Springer Verlag.; ISBN: 978-3-642-04608-7.
- Ciepluch K, Ziemia B, Janaszewska A, Appelhans D, Klajnert B, Bryszewska M, Fogel WA (2012) Modulation of biogenic amines content by poly(propylene imine) dendrimers in rats. *J Physiol Biochem* (2012) 68:447–454; Doi: 10.1007/s13105-012-0158-y.
- Chen J, Hong T, Ding S, Deng L, Abudupataer M, Zhang W, Tong M, Jia J, Gong H, Zou Y, Wang TC, Ge J, Yang X (2017) Aggravated myocardial infarction-induced cardiac remodeling and heart failure in histamine-deficient mice; *Scientific Reports*; DOI: 10.1038/srep44007.
- Chong H, Ogata Y, Niwa H, Kushikata T, Watamabe H, Imaizumi T, Hirota K, Ono K, Ohba T, Murakami M (2016) The Cardiorespiratory responses to inhalation and entobarbital anesthesia in the mouse. *Hirosaki Med. Journal* (2016) 67:77-85.
- Christ, JB (2019) Die G-Protein-Rezeptor-Kinase 2 bei der homologen Desensitivierung von humanen 5-HT_{4a}-Rezeptoren in Herzvorhöfen von transgenen Mäusen. Dissertation. Martin-Luther-Universität, Halle. Pharmakologie und Toxikologie; DOI: <http://dx.doi.org/10.25673/13918>.

- Cirkel J, Schütz A, Baumert JH, Adt M (1994) Arrhythmias during CABG-surgery-are they partly histamine-induced? Published by Elsevier Inc; DOI: /10.1016/1053-0770(94)90578-9.
- Dale HH, Laidlaw PP (1910) The physiological action of β -iminazolyethylamine. *J. Physiol.* 41(5):318-344.
- Ding S, Abudupataer M, Zhou Z, Chen J, Li H, Xu L, Zhang W, Zhang S, Zou Y, Hong T, Wang TC, Yang X, Ge J(2018) Histamine deficiency aggravates cardiac injury through miR-206/216b-Atg13 axis-mediated autophagic-dependant apoptosis. *Cell Death and Disease* 9:69; DOI 10.1038/s41419-018-0723-6.
- Dluzen D, Reddy R, McDermott J (1992) The aromatic amino acid decarboxylase inhibitor, NSD- 1015, increases release of dopamine: Response characteristics; *Neuropharmacolog* (1992) 31: 1223-1229; DOI: 10.1016/0028-3908(92)90050-Y.
- Eckel L, Gristwood R, Nawrath H, Owen DAA, Satter P (1982) Inotropic and ctrophysiological effects of histamine on human ventricular heart muscle. Published: *J. Physiol.* (1982) 330: 111-123; DOI: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014332>.
- Eijgenraam TR, Boukens BJ, Boogerd CJ, Schouten EM, van de Kolk CWA, Stege NM, Te Rijdt WP, Hoorntje ET, van der Zwaag PA, van Rooij E, van Tintelen JP, van den Berg MP, van der Meer P, van der Velden J, Silljé HHW, Boer RA de (2020) The phospholamban p(Arg14del) pathogenic variant leads to cardiomyopathy with heart failure and is unresponsive to standard heart failure therapy. *Scientific reports* (2020) Article 9819; DOI: 10.1038/s41598-020-66656-9.
- Einis W (1913) Über die Wirkung des Pituitrins und β -Imidazoläthylamins (Histamins) auf die Herzaktion. *Biochem. Zeitschrift* 52:96-117.
- European Medicines Agency (2018) Ceplene Histamin dihydrochlorid. An overview of Ceplene and why it is authorised in the EU. EMA/486869/2018 EMEA/H/C/000796.
- Ercan-Sencicek AG, Stillman AA, Ghosh AK, Bilguvar K, O'Roak BJ, Mason CE, Abbott T, Gupta A, King RA, Pauls DL, Tischfield JA, Heiman GA, Singer HS, Gilbert DL, Hoekstra PJ, Morgan TM, Loring E, Yasuno K, Fernandez T, Sanders S, Louvi A, Cho JH, Mane S, Colangelo CM, Biederer T, Lifton RP, Gunel M, State MW (2010) L-Histidine decarboxylase and tourette's syndrome. *The new england journal of medicine*; 362:1901-1908; DOI: 10.1056/NEJMoa0907006.
- Freissmuth, Offermanns, Böhm (2012) *Pharmakologie & Toxikologie*. ISBN 978-3-642-12354-2.
- Fitzsimons CP, Lazar-Molnar E, Tomoskozi Z, Buzás E, Rivera ES, Falus A (2001) Histamine deficiency induces tissuespecific downregulation of histamine H₂ receptor expression in histidine decarboxylase knockout mice. *Febs letters* 2001; 508,S. 245–248. DOI: 10.1016/s0014-5793(01)03070-8.
- Galice S, Xie Y, Yang Y, Sato D, Bers DM (2018) Size Matters; Ryanodine Receptor Cluster Size Affects Arrhythmogenic Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release. *Journal of the American Heart Association* (2018) Vol.7; DOI: 10.1161/JAHA.118.008724.
- Garbarg M, Barbin G, Rodergas E, Schwartz JC (1980) Inhibition of histamine synthesis in brain by α -Fluoromethylhistidine, a new irreversible inhibitor: In vitro and in vivo studies. *Journal of Neurochemistry*; 35(5):104- 1052; DOI: 10.1111/j.1471-4159.1980.tb07858.x.

- Garcia-Miralles M, Ooi J, Ferrari BC, Tan JL, George M, Drum CL, Yanping R, Hayden MR, Pouladi MA (2016) Treatment with the MAO-A inhibitor clorgyline elevates monoamine neurotransmitter levels and improves affective phenotypes in a mouse model of Huntington disease. *Experimental Neurology*(2016) 278:4-10; DOI: 10.1016/j.expneurol.2016.01.019.
- Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, Esposito S, Affuso A, Brunetti A, Vesce G (2012) Mice Anesthesia, Analgesia, and Care, Part I: Anesthetic Considerations in Preclinical Research. Published in *ILAR Journal* (2012) 53: 55–69; DOI: 10.1093/ilar.53.1.55.
- Gekle M (2010) Taschenlehrbuch Physiologie; ISBN: 978-3-13-144982-5.
- Gergs U, Baumann M, Böckler A, Buchwalow IB, Ebel H, Fabritz L, Hauptmann S, Keller N, Kirchhof P, Klöckner U, Pönicke K, Rueckschloss U, Schmitz W, Werner F, Neumann J (2010) Cardiac overexpression of the human 5-HT₄ receptor in mice. *J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H788–H798; DOI: 10.1152/ajpheart.00691.2009.
- Gergs U, Bernhardt G, Buchwalow IB, Edler H, Fröba J, Keller M, Kirchhefer U, Köhler F, Mißlinger N, Wache H, Neumann J (2019) Initial characterization of transgenic mice overexpressing human histamine H₂ receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* S. 129–141; DOI: 10.1124/jpet.118.255711.
- Gergs U, Kirchhefer U, Bergmann F, Künstler B, Mißlinger N, Au B, Mahnkopf M, Wache H, Neumann J (2020) Characterization of stressed transgenic mice overexpressing H₂-histamine receptors in the heart. *J Pharmacol Exp Ther.*; S. 479–488; DOI:10.1124/jpet.120.000063.
- Gergs U, Weisgut J, Griethe K, Mißlinger N, Kirchhefer U, Neumann J (2021 a) Human histamine H₂ receptors can initiate cardiac arrhythmias in a transgenic mouse. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (2021) 394:1963–1973; DOI: 10.1007/s00210-021-02098-y.
- Gergs U, Gerigk T, Wittschier J, Schmidbaur CT, Röttger C, Mahnkopf M, Edler H, Wache H, Neumann J (2021b) Influence of Serotonin 5-HT₄ Receptors on Responses to Cardiac Stressors in Transgenic Mouse Models. *Biomedicines* (2021) 9; 569; DOI: 10.3390/biomedicines9050569.
- Gründemann D, Köster S, Kiefer N, Breidert T, Engelhardt M, Spitzenberger F, Obermüller N, Schömig E (1998) Transport of Monoamine Transmitters by the Organic Cation Transporter Type 2, OCT2; *J. Biol. Chem.* (1998) 47:30915-30920; DOI: 10.1074/jbc.273.47.30915.
- Hakason R, Liedberg G (1971) Mechanism of activation of rat stomach histidine decarboxylase after vagal denervation. *European Journal of Pharmacology* (1971) 16: 78-89; DOI:10.1016/0014-2999(71)90059-8.
- He G, Hu J, Li T, Ma X, Meng J, Jia M, Lu J, Ohtsu H, Chen Z, Luo X (2012) Arrhythmogenic effect of sympathetic histamine in mouse hearts subjected to acute ischemia. *J Molecular medicine* (2012) 18:1-9; DOI: 10.2119/molmed.2011.00225.
- He GH, Cai WK, Zhang JB, Ma CY, Yan F, Lu J, Xu GL (2016) Associations of Polymorphisms in HRH₂, HRH₃, DAO, and HNMT Genes with Risk of Chronic Heart Failure. *BioMed research international*; DOI: 10.1155/2016/1208476.
- Helm K. (2014) Synthese und funktionelle In-vitro-Pharmakologie neuer Liganden des 5-HT_{2A}-Rezeptors aus der Klasse der Tryptamine. Dissertation; der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg; DOI: 10.5283/epub.30387.

- Hirasawa N (2019) Expression of Histidine Decarboxylase and Its Roles in Inflammation; Published in International Journal of Molecular Sciences (2019) 20(2):376; DOI: 10.3390/ijms20020376.
- Hirata N, Takeuchi K, Ukai K, Jin C, Yoshida T, Salakura Y (1999) Expression and localization of histamine H₂ receptor messenger RNA in human nasal mucosa. *J allergy clin immunol* (1999) 103:944-949; DOI: S0091-6749(99)70443-4.
- Hori Y, Nihei Y, Kurokawa Y, Kuramasu A, Makebe-Kobayashi Y, Terui T, Doi H, Satomi S, Sakurai E, Nagay A, Watanabe T, Ohtsu H (2002) Accelerated clearance of *Escherichia coli* in experimental peritonitis of histamine-deficient mice. *Journal of immunology* (2002) 169:1978–1983. DOI:10.4049/jimmunol.169.4.1978.
- Hui JY, Taylor SL (1985) Inhibition of in viv histamine metabolism in rats by foodborne and pharmacologic inhibitors of diamine oxidase, histamine N-Methyltransferase, and Monoamine Oxidase. *Toxicology and applied Pharmacology* (1985) 81: 241- 249; DOI: 10.1016/0041-008x(85)90160-7.
- Iversen LL (1965) The uptake of adrenaline by the rat isolated heart. *Journal of Pharmacology* (1965) 24:387-394; DOI: 10.1111/j.1476-5381.1965.tb01726.x.
- Jäger F (1913a) Ein neuer, für die Praxis brauchbarer Sekaleersatz (Tenosin). *Münchener Medizinische Wochenschrift* (1913) 31:1714–1715.
- Jäger F (1913b) Versuche zur Verwendung des β-Imidazolyläthylamins in der Geburtshilfe. *Zentralblatt für Gynäkologie* (1913)8:265-269.
- Jung F (2019) Metabolismus von Serotonin und kontraktile Wirkung an 5-HT_{4a}-Rezeptoren in Vorhöfen von Herzen transgener Mäuse. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale). *Pharmakologie und Toxikologie*. DOI: <http://dx.doi.org/10.25673/13921>
- Jutel M, Akdis M, Akdis C A (2009) Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *J. Clinical & Experimental Allergy* (2009)39: 1786–1800; DOI: 10.1111/j.1365- 2222.2009.03374.x.
- Kaludercic N, Mialet-Perez J, Paolucci N, Parini A, Di Lisa F (2014) Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart. *J. of Molecular and Cellular Cardiology*(2014) 73: 34-42; DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.12.032.
- Kubas H, Stark H (2007) Medizinische Chemie von Histamin-H₂-Rezeptorantagonisten. *Klassische Wirkstoffentwicklung. Pharm. Unserer Zeit* 36:24-32; DOI:10.1002/pauz.200600201
- Kuefner MA, Schwelberger HG, Ulrich P, Hahn EG, Raithel M (2002) Total histamine degradation capacity (THDC) as an important biological marker of histamine metabolism in human colonic mucosa; *Inflammation Research* (2002) 51:87-88; DOI: 10.1007/pl00022461.
- Kobayashi T, Inoue I, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Watanabe T (1996) Cloning, RNA Expression, and Chromosomal Location of a Mouse Histamine H₂ Receptor Gene. *J. Genomics*. 37(3):390-4. DOI: 10.1006/geno.1996.0575.
- Langguth F (2016) Altersabhängige Expression Ca²⁺-regulierender Proteine im menschlichen Herzvorhof. Dissertation. Martin-Luther-Universität, Halle. *Pharmakologie und Toxikologie*; DOI: <http://dx.doi.org/10.25673/1763>.

- Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, Ellison DH, Chade AR, Crowley SD, Mattson DL, Mullins JJ, Osborn J, Eirin A, Reckelhoff JF, Iadecola C, Coffman TM (2019) Animal Models of Hypertension; A Scientific Statement From the American Heart Association. *American Heart Association* (2019) 73:e87-e120; DOI: 10.1161/HYP.000000000000090.
- Leary PJ, Tedford RJ, Bluemke DA, Bristow MR, Heckbert SR, Kawut SM, Krieger EV, Lima JA, Masri CS, Ralph DD, Shea S, Weiss NS, Kronmal RA (2016) Histamine H₂ receptor antagonists, left ventricular morphology, and heart failure risk. *J. of American college of cardiology* (2016) 67:1544-155; DOI: 10.1016/j.jacc.2016.01.045.
- London B (2001) Cardiac arrhythmias: From (transgenic) mice to men. *J. of cardiovascular electrophysiology*, S.1089-109; DOI: 10.1046/j.1540-8167.2001.01089.x.
- Luo T, Chen B, Fukushima Y, Kitakaze M, Zhao Z, Dai M, Liao Y, He N (2013) Histamine H₂ receptor activation exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury by disturbing mitochondrial and endothelial function. *J. Research Support* (2013) 342:108; DOI: 10.1007/s00395-013-0342-4.
- Maintz L, Novak N (2007) Histamine and histamine intolerance. *J. American Society for Nutrition* (2007) 85:1185-1196; DOI: 10.1093/ajcn/85.5.1185.
- Matsuda N, Jesmin S, Takahashi Y, Hatta E, Kobayashi M, Matsuyama K, Kawakami N, Sakuma I, Gando S, Fukui H, Hattori Y, Levi R (2004) Histamine H₁ and H₂ receptor gene and protein levels are differentially expressed in the hearts of rodents and humans. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2004) 309:786-795; DOI: 10.1124/jpet.103.063065.
- Mißlinger N (2019) Charakterisierung isoliert perfundierter Herzen von Histamin-H₂-Rezeptor überexprimierenden Mäusen. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle- Wittenberg. Institut für Pharmakologie und Toxikologie; DOI: <http://dx.doi.org/10.25673/32173>.
- Moriguchi T, Takai J (2020) Histamine and histidine decarboxylase; Immunomodulatory functions and regulatory mechanisms. *J. Genes to Cells* (2020) 25:443-449; DOI:10.1111/gtc.12774.
- Neumann J, Grobe JM, Weisgut J, Schwelberger HG, Fogel WA, Marusáková M, Wache H, Bähre H, Buchwolow IB, Dhein S, Hofmann B, Kirchhefer U, Gergs U (2021a) Histamine can be formed and degraded in the human and mouse heart. *Frontiers* (2021) Article 582916; DOI: 10.3389/fphar.2021.582916.
- Neumann J, Kirchhefer U, Dhein S, Hofmann B, Gergs U. (2021b) Role of cardiovascular H₂-histamine-receptors under normal and pathophysiological conditions. *Frontiers* (2021) Article 732842; DOI:10.3389/fphar.2021.732842.
- Neumann J, Kirchhefer U, Dhein S, Hofmann B, Gergs U. (2022) Cardiac role of histamine and histamine receptors. *Nova Science Publishers, Horizons in World Cardiovascular Research*. Volume 22, ISBN: 978-1-68507-568-2. DOI: [org/10.52305/VGWV3099](https://doi.org/10.52305/VGWV3099).
- Nilsson B. (1999) Biological effects of aminoguanidine: An update; *Inflammation Research* (1999) 48:509-515; DOI: 10.1007/s000110050495.
- Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, Matsumoto S (2000) Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *The Journal of biological chemistry*(2000) 275:36781–36786; DOI:10.1074/jbc.M006480200.

- Oda T, Matsumoto S, Masuho Y, Takasaki J, Matsumoto M, Kamohara M, Saito T, Ohishi T, Soga T, Hiyama H, Matsushime H, Furuichi K (2002) cDNA cloning and characterization of porcine histamine H₄ receptor. *Biochimica et Biophysica Acta* (2002) 1575:135-138; DOI: S0167- 4781(02)00236-1.
- Ohtsu H, Tanakab S, Terui T, Hori Y, Makabe-Kobayashi Y, Pejler G, Tchougounova E, Hellman L, Gertsenstein M, Hirsawa N, Sakurai E, Buzás E, Kovács P, Csaba G, Kittel A, Okada M, Hara M, Mar L, Numayama-Tsuruta K; S Ishigaki-Suzuki S, Ichikawa A, Falus A, Watanabe T, Nagy A (2001) Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. *J. Elsevier Science B.V.* (2001) 502:53-56; DOI: 10.1016/s0014-5793(01)02663-1.
- Özdemir Z, Alagöz MA, Uslu H, Karakurt A, Erikci A, Ucar G, Uysal M (2020) Synthesis, molecular modelling and biological activity of some pyridazinone derivatives as selective human monoamine oxidase-B inhibitors. *J. Pharmacological Reports* (2020) 72:692-704; DOI: 10.1007/s43440-020-00070-w.
- Özdemir Z, Alagöz MA, Bahçecioğlu ÖF, Gök S (2021) Monoamine Oxidase-B (MAO-B) Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Current Medicinal Chemistry* (2021) 28: 6045-6065; DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867328666210203204710>
- Paijo J, Kaefer V, Kalinke U (2017) cGAMP Quantification in Virus-Infected Human Monocyte-Derived Cells by HPLC-Coupled Tandem Mass Spectrometry. *Innate Antiviral Immunity* (2017) 1656:153-166; DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7237-1_9.
- Patella V, Marin I, Lamparter B, Genovese A, Adt M, Gianni M (1995) Immunologic and non-immunologic release of histamine and tryptase from human heart mast cells. *J Pharmacol* (1995) 44:22-23; DOI: 10.1007/BF01674377.
- Petersen J, Raithel M, Schwelberger HG (2002) Histamine N-methyltransferase and diamine oxidase gene polymorphisms in patients with inflammatory and neoplastic intestinal diseases. *J. Inflammation research* (2002) 51:91-92; DOI: 10.1007/pl00022464.
- Reichel G, Neundörfer B (1996) Pathogenese und Therapie der peripheren diabetischen Polyneuropathien. *Deutsches Ärzteblatt* (12.04.1996) 93, Heft 15: 963–968.
- Rioux F, Kérouac R, St-Pierre S (1984) Neurotensin stimulates histamine release from the isolated, spontaneously beating heart of rats. *J. Life Sci* (1984) 35:423-431; DOI: 10.1016/0024-3205(84)90653-2.
- Porzio MA, Pearson AM (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochimica et biophysica acta* (1977) 490: 27-34; DOI: 10.1016/0005-2795(77)90102-7.
- Primeau JO, Armanious GP, Fisher ME, Young HS. The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase. *Subcell Biochem.* (2018) 87:229-258; DOI: 10.1007/978-981-10-7757-9_8. PMID: 29464562.
- Saad K (2013) Pharmakologische Charakterisierung der murinen Histamin H₁ und H₄ Rezeptoren. *Dissertation Tierärztliche Hochschule*; DOI: urn:nbn:de:gbv:95-103457.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning; A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6.

- Sattler J, Häfner D, Klotter HJ, Lorenz W, Wagner PK (1988) Food-induced histaminosis as an epidemiological problem: Plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents Actions*(1989) 27: 212–214; DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02222242>.
- Schenk P (1921) Über die Wirkungsweise des β -Imidazolyläthylamins (Histamin) auf den menschlichen Organismus. *Arch exp Pathol Pharmacol.* (19221)89:332-339; DOI:10.1007/bf01998687.
- Schwelberger HG, Feurle J, Houen G (2017) Monoclonal antibodies for human and porcine histamine N-methyltransferase (HMT) facilitate protein expression and localization studies. *J. Inflammation Research* (2017) 66:67-77; DOI: 10.1007/s00011-016-0987-1.
- Schwelberger HG, Feurle J, Houen G (2018) Mapping of the binding sites of human diamine oxidase (DAO) monoclonal antibodies. *J. Inflammation Research* (2018) 67:245-253; DOI: 10.1007/s00011-017-1118-3.
- Shaff RE, Beaven MA (1979) Increased sensitivity of the enzymatic isotopic assay of histamine: measurement of histamine in plasma and serum. *Anal Biochem* (1979) 94:425-430; DOI: 10.1016/0003-2697(79)90385-3.
- Sham JSK, Song LS, Chen Y, Deng LH, Stern MD, Lakatta EG, Cheng H (1998) Termination of Ca^{2+} release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (1998) 95:15096–15101. DOI:10.1073/pnas.95.25.15096.
- Stark H (2013) Histamine H_4 receptor. a Novel Drug Target For Immunoregulation and Inflammation. *De Gruyter* (2013)368 Seiten; DOI: 10.2478/9788376560564; ISBN: 9788376560564.
- Stolze I, Peters KP, Herbst RA (2010) Histaminintoleranz imitiert Anorexia nervosa. *Hautarzt* (2010)61:776-778; DOI: 10.1007/s00105-009-1869-z.
- Thangam EB, Jemima EA, Singh H, Baig MS, Khan M, Mathias CB, Church MK, Saluja R (2018) The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation; The Hunt for New Therapeutic Targets. *Front. Immunol.* (2018) 9, Article 1873; DOI 10.3389/fimmu.2018.01873.
- Teloh JK, Dohle DS, Petersen M, Verhaegh R, Waack IN, Roehrborn F, Jakob H, Groot H de (2016) Histidine and other amino acids in blood and urine after administration of Bretschneider solution (HTK) for cardioplegic arrest in patients; Effects on N-metabolism; *Amino Acids* (2016) 48:1423–1432; DOI: 10.1007/s00726-016-2195-2.
- Teloh JK, Ansoerge L, Petersen M, Demircioglu E, Waack IN, Brauckmann S, Jakob H, Dohle D-S (2018) Histidine metabolism after Bretschneider cardioplegia in cardiac surgical patients; published in *Physiol. Res.*(2018) 67: 209-216; DOI: 10.33549/physiolres.933691.
- Tiligada E, Ennis M (2020) Histamine pharmacology; From Sir Henry Dale to the 21st century. *British Journal of Pharmacology* (2020) 177: 469-489. DOI: 10.1111/bph.14524.
- Verta R, Gurrieri M, Borga S, Benetti E, Pollicino P, Cavalli R, Thurmond RL, Chazot PL, Pini A, Rosa AC, Grange C (2021) The Interplay between Histamine H_4 Receptor and the Kidney Function; The Lesson from H_4 Receptor Knockout Mice; *Biomolecules* (2021) 11, Article 1517; DOI: 10.3390/biom11101517.

- Victor T, Alexander N, Julia K, Grigorij K (2018) Influence of histidine on the contractility and adrenaline inotropic effect in the experiments with myocardium of right ventricular of Non pregnant and Pregnant Rats; Journal of Cardiology and Cardiovascular Medicine (2018) 3:84-103; DOI: 10.29328/journal.jccm.1001030.
- Wang Z, Storm D (2006) Extraction of DNA from mouse tails. Biotech.(2006)41:410-412; DOI:10.2144/000112255.
- Windaus A, Vogt W (1907) Synthese des Imidazolyl-äthylamins. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. (1907)40:3691-3695; DOI: 10.1002/cber.190704003164.
- Wolff AA, Levi R (1986) Histamine and cardiac arrhythmias. J. Circulation Research (1986) 58:1-16; DOI: 10.1161/01.res.58.1.1.
- Yoshikawa T, Naganuma F, Iida T, Nakamura T, Harada R, Mohsen AS, Kasajima A, Sasano H, Yanai K (2013) Molecular mechanism of histamine clearance by primary human astrocytes. J. Glia.(2013) 61:905-916; DOI: 10.1002/glia.22484.
- Yoshitomi I, Oishi R, Itoh Y, Saeki K, Senoo Y, Teramoto S(1989) α -Fluoromethylhistidine decreases the histamine content of the rat right atrium under the influence of sympathetic activity. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol (1989) 339:528-532; DOI: 10.1007/BF00167256.
- Zecharia AY, Yu X, Götz T, Ye Z, Carr DR, Wulff P, Bettler B, Vyssotski AL, Brickley SG, Franks NP, Wisden W(2012) GABAergic inhibition of histaminergic neurons regulates active waking but not the sleep-wake switch or propofol-induced loss of consciousness. The Journal of neuroscienc (2012)32:13062–13075; DOI:10.1523/JNEUROSCI.2931-12.2012.
- Zimmermann AS, Burhenne H, Kaever V, Seifert R, Neumann D(2011) Systematic analysis of histamine and N-methylhistamine concentrations in organs from two common laboratory mouse strains. J. Inflammation Research (2011) 60:1153-1159; DOI: 10.1007/s00011-011-0379-5.
- Quelle Strukturformel Abbildung 1 vom 08.02.2022:
 L-Histidin: <https://de.wikipedia.org/wiki/Histidin>
 Histamin: <https://de.wikipedia.org/wiki/Histamin>
 N-Methylhistamin: <https://www.wikiwand.com/de/Histamin>
 Imidazolessigsäure: <https://www.wikiwand.com/de/Histamin>
 1-Ribosyl-1H-imidazol-4-yl-essigsäure: <https://www.wikiwand.com/de/Histamin>
 N-Methylimidazol-4-yl-essigsäure: <https://www.wikiwand.com/de/Histamin>

8. Thesen

1. Histamin wirkt an isolierten Vorhofpräparaten von transgenen Mäusen, die den humanen H₂-Histamin-Rezeptor überexprimieren positiv inotrop und chronotrop.
2. Histidin führt an isolierten Vorhofpräparaten von transgenen Mäusen zu keinen positiv inotropen oder chronotropen Effekt.
3. Histamin hat keine Wirkung auf die Kraft oder Frequenz der Vorhofpräparate von Wildtyp-Mäusen.
4. Die Inkubation mit 10 µM NSD 1015 führt an Wildtyp und an transgenen Vorhofpräparaten zu einem positiv inotropen und chronotropen Effekt.
5. Die Vorbehandlung mit 1 mM Aminoguanidin führt zu einer Potenzsteigerung bei einer nachfolgenden Histamin-Konzentrations-Wirkungskurve.
6. Die gemeinsame Inkubation mit 1 mM Aminoguanidin und 2 µM Quinacrin führen bei linken Vorhofpräparaten von transgenen Mäusen zu einer Potenzsteigerung von Histamin.
7. Die Vorbehandlung mit 10 µM Tranylcypromin führt zu einer Effektivitätssteigerung von Histamin.
8. Ein erhöhter Histaminspiegel am Herzen führt zu einer erhöhten Arrhythmierate.
9. In Herzen von Patienten mit chronischen Herzerkrankungen wurde ein erhöhter Histamingehalts festgestellt.
10. Die Blockade von H₂-Histamin-Rezeptoren und der Einsatz von Wirkstoffen, die in den Histaminmetabolismus eingreifen sind Gegenstand aktueller Forschungen, z.B. von Behandlungsmöglichkeiten bei Erkrankungen wie Herzinsuffizienz.

9. Anhang

Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden in pro *analysis*-Qualität oder im Besten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, wurde das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser als Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage gewonnen.

Genotypisierung und Versuchstiere

Proteinase K-Lösung	Proteinase K 10 mg/ml
TE/SDS-Puffer	Tris HCL 50 mM, EDTA 100 mM, SDS 0,5 %, pH 8,0; Sterilisierung durch Autoklavieren
TE-Puffer	Tris HCL 10 mM, EDTA 0,25 mM; Sterilisierung durch Autoklavieren
Natriumacetat-Lösung	Natriumacetat 3M, pH 6,0
DEPC-Wasser	DEPC 0,1 % (V/V)
dNTP-Mix	
Agarosegel	Agarose 1 %, TAE-Puffer, Ethidiumbromis 0,01 %
TAE-Puffer	Tris Base 1,99 M, Eisessig 0,99 M, EDTA 59,5 mM
Ladepuffer	TAE-Puffer 50 %, Glycerol 50 %, Bromphenolblau

Nachweis von Proteinen mittels Westernblot

Probenpuffer	Tris-Base	0,125 M
	SDS	4 %
	Glycerol	20 %
	Bromphenolblau	0,002 %
	pH	6.8
Molekulargewichts- Standard	Lipidoxidase-Stock	4,17 %
	BSA-Stock	1,7 %
	Ovalbumin-Stock	2,5 %
	Carboanhydrase-Stock	1,7 %
	Chymotrypsinogen-Stock	2,5 %
	Ribonuclease-Stock	2,5 %
	Cytochrom C -Stock	2,5 %
	Probenpuffer	82,5 %

Für jede Substanz wurde eine Stocklösung aus 10 mg/ml Lämmli-Probenpuffer hergestellt.

10%iges Trenngel	Porziopuffer	47,39 %
	Acrylamid 30%	31,6 %
	Glycerol	7,9 %
	H ₂ O	12,64 %
	TEMED	0,08 %
4%iges Sammelgel	APS	0,38 %
	Sammelgelpuffer	24,73 %
	Acrylamid 30%	13,16 %

	H ₂ O	61,05 %
	TEMED	0,06 %
	APS	1 %
Porziopuffer	Tris-Base	0,2 M
	Glycin	0,6 M
	EDTA	0,12 mM
	SDS	0,2 %
	Glycerol	10 %
	Polyacrylamid	0,4 %
Sammelgelpuffer	Tris-Base	1,5 M
	SDS	0,4 %
	APS Ammoniumpersulfat	10 %(w/V)
	gelöst in aqua bidest.	
Elektrophoresepuffer	Tris-Base	0,4 M
10 x	Glycin	1,2 M
	SDS	0,4 %
	gelöst in aqua bidest.	
	zur Verwendung 1:10 verdünnt	
Transferpuffer	Na ² HPO ₄ x 2H ₂ O	40 mM
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	7,9 mM
TBST-Puffer	Tris-Base	10 mM
	NaCl	150 mM
	Tween	0,1 %
AP-Puffer	Triethanolamin	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	5 mM
Puffer A	Rinderserum-Albumin	2 %
	gelöst in TBST-Puffer	
Puffer B	Milchpulver	5 %
	gelöst in TBST-Puffer	
NBT-Lösung	NBT	50 mg/ml
	Dimethylformamid	70 % in
	Aqua bidest.	
BCIP-Lösung	Toluidin-Salz	50 mg/ml
	in Dimethylformamid	

Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen

Tyrode-Lösung

Stammlösung I	NaCl	17,5 %	(g/V)
	KCl	1,005 %	(g/V)
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,56 %	(g/V)
Stammlösung II	NaHCO ₃	5,00 %	(g/V)
Stammlösung III	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,29 %	(g/V)
	NaCl	119,8 mM	
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,1 mM	
	NaHCO ₃	22,6 MM	
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,42 mM	
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,8 mM	

Glucose	5,05 mM
Ascorbinsäure	0,28 mM
Na ₂ - EDTA, pH 7,4	0,05 mM

Verwendete Substanzen

5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) MBI	Fermentas, Heidelberg
Acrylamid 30%	Rotiphorese Gel 30 Roth, Karlsruhe
Agarose, Typ SeaKem	FCM bioproducts, philadelphia, USA
Aminoguanidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD
L (+) -Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt
Chloroform	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Cimetidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-Leiter	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
dNTP	MBI Fermentas, Heidelberg
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol 100 %	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Histamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Histidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heparin	Biochrom AG, Berlin
Isoamylalkohol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Isoprenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ - EDTA	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
NSD 1015	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pentoparbital	Merial GmbH, Halbergmoos
Phenol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Proteinkinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
Quinacrin	Sigma-Aldrich, Steinheim
PCR-Puffer, 15 mM MgCl ₂	Ampliqon, Odense, Dänemark
Taq-DNA-Polymerase	Ampliqon, Odense, Dänemark
HCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Tranlylcypromin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Fluka AG, Buch
Zinkchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim

Geräte und Bezugsquellen

PCR-Gerät Mastercycler gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Zentrifuge Modell 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Biophotometer Modell 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Elektrophoresekammer Typ Horizon 58	life Technologies, Gaithersburg, USA
Waage Typ AT261 DeltaRange	Mettler Instruments GmbH, Gießen
pH-Meter	WTW GmbH, STH 600, Weilheim
Kontraktionskraftmessanlage	Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim
- Verstärker und integrierter Schreiber	3101 Graphtec, Linearrecorder mark, VII, WR
- Reizgerät mit 4 Kanälen	7000 ELV Takt- und Impulsgenerator TIG
- Wärmebad	CS Lauda
- 4 Transducer	Kent, Scientific corporation, Isometric Transducer
- 8 Doppelwandgefäße, 8 Stative, 8 Elektroden, Halterungsstäbe, Haken	
Prism 5; GraphPad Software, San Diego, USA	

Primer

Forward-Primer	MHC-Seq-P1(5'-ACCCTTACCCCACATAGACC-3'),biomers.net GmbH, Ulm
Reverse-Primer	hH ₂ R-SEQ-P1R(5'-AGCAGGTCAGTGATAGCCAA-3'), biomers.netGmbH, Ulm

PCR-Programm

Denaturierung	94 °C	5 min	1 Zyklus
Denaturierung	94 °C	20 s	30 Zyklen
Annealing	60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Elongation	72 °C	5 min	1 Zyklus

Antikörper

- PP2Ca/β(sc-166662, Santa Cruz Biotechnology, Verdünnung 1:50)
- Anti-CSQ (Firma Acris, Verdünnung 1:1000)
- Anti-rabbit-IgG; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Anti-MAOA; Gene Tex, USA (N-Term)(Antikörper-online, 1:20)
- Anti-MAOB; Gene Tex, USA (GeneTx, 1:200)
- Anti-ABP-1; Gene Tex, USA (Acris, 1:100 und 1:500)
- Anti-HNMT, USA (Antikörper-online, 1:50 und 1:10)
- DOPA-Decarboxylase, USA (Acris, 1:100 und 1:500)
- Sheep anti-Tryptophan hydroxylase antibodies (Bio-Rad, 1:100)

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Juliane Martha Grobe, dass ich die eingereichte Dissertation mit dem Titel

Untersuchungen zur Histaminsynthese und kontraktilen Wirkung von Histamin an Vorhofpräparaten von transgenen Mäusen

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Neumann)

selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere hiermit, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Dissertation nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat vor mir unmittelbar oder mittelbar geldwertige Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Halle (Saale), den 15.03.2023

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, Juliane Martha Grobe, keine weiteren Promotionsversuche, weder im Inland noch im Ausland, unternommen zu haben. Die vorliegende Dissertation wird erstmalig eingereicht. Es wurde kein Antrag an einer anderen Universität oder Hochschule gestellt.

Halle (Saale), den 15.03.2023

Danksagung

Ich danke

Herrn Prof. Dr. med. Joachim Neumann und Herrn Dr. rer. nat. Ulrich Gergs für Ihre Unterstützung und Betreuung,

Frau Simmrodt und Frau Reber, sowie allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie und Pharmakologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Hilfsbereitschaft,

meiner Familie, allen voran meinen Eltern und meinen Freund für die Unterstützung und Motivation,

meinen Mitdoktoranden/Innen für die freundschaftliche Zusammenarbeit.