

**Die Bedeutung von Phosphodiesterasen für den Histamineffekt an isolierten
Vorhofpräparaten Histamin-H₂-Rezeptor-transgener Mäuse**

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

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

von
Rafaela Voss
Geboren am 05.12.1994 in Ellwangen (Jagst)

Betreuer:
Herr Prof. Dr. med. Joachim Neumann

Gutachterinnen:
Frau apl. Prof. Britt Hofmann
Frau Prof. Aida Salameh, Leipzig

Datum der Eröffnung des Promotionsverfahrens: 05.07.2022

Datum der Verteidigung der Promotion: 01.02.2023

Referat

Histamin kann beim Menschen über Histamin-H₂-Rezeptoren die Konzentration des sekundären Botenstoffs cyclisches Adenosinmonophosphat (=cAMP) im Herzen erhöhen und so zu einer Zunahme der Kontraktionskraft sowie der Herzfrequenz führen. Bei Wildtyp-Mäusen (=WT) fehlt dieser positiv inotrope sowie positiv chronotrope Effekt von Histamin. H₂-transgene Mäuse (=H₂-TG), die den menschlichen Histamin-H₂-Rezeptor überexprimieren, können deshalb dazu genutzt werden, die Auswirkungen von Histamin auf die Kontraktilität und Herzfrequenz genauer zu untersuchen. Phosphodiesterasen (=PDEs) sind Enzyme, die cAMP abbauen und so inaktivieren können. Damit können PDEs den cAMP-abhängigen intrazellulären Signalweg verschiedener Botenstoffe verändern. Auf diese Weise könnten PDEs den positiv inotropen sowie positiv chronotropen Effekt des Histamins am Herzen antagonisieren. In dieser Arbeit soll der Einfluss von verschiedenen PDEs auf die Histaminwirkung an H₂-transgenen und WT-Mäusen untersucht werden. Dazu wurden Kontraktionsexperimente an isolierten elektrisch stimulierten linken Vorhofpräparaten zur Beurteilung der Kontraktionskraft sowie an isolierten spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten zur Beurteilung der Frequenz an H₂-transgenen Mäusen sowie deren Wildtyp-Geschwistertieren durchgeführt. Es wurde jeweils eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (=KWK) von Histamin in Abwesenheit und in Anwesenheit eines oder mehrerer PDE-Hemmstoffe durchgeführt. Für die Experimente wurden der PDE2-Hemmstoff EHNA, der PDE3-Hemmstoff Cilostamid, der PDE4-Hemmstoff Rolipram, der nicht-selektive PDE-Hemmstoff IBMX sowie verschiedene Kombinationen von PDE2-, PDE3- und PDE4-Hemmstoffen verwendet. In den Ergebnissen zeigte sich, dass sowohl die Hemmung der PDE3 als auch der PDE4 die KWK des positiv inotropen Effektes des Histamins zu niedrigeren Konzentrationen verschieben und damit die Potenz des Histamins an H₂-transgenen isolierten Vorhofpräparaten erhöhen konnte. Eine Verschiebung der Histaminwirkung zu niedrigeren Konzentrationen auf die Frequenz konnte nur durch eine Kombination der PDE2- und PDE4-Hemmstoffe erreicht werden. Somit scheinen funktionell unterschiedliche intrazelluläre Kompartimente mit einer unterschiedlichen Expression an Phosphodiesterasen für die Regulierung der Histamin-H₂-Rezeptorabhängigen Kraft- und Frequenzzunahme im Mausvorhof zuständig zu sein. Die Resultate dieser Arbeit tragen zu einem besseren Verständnis der Rollen von Histamin und PDEs am Säugetierherzen bei und könnten so zur Entwicklung neuer Therapien bei verschiedenen Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems dienen.

Inhaltverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeines zu Histamin	1
1.2	Histaminrezeptoren.....	2
1.3	Histamin und der H₂-Rezeptor im Herz-Kreislaufsystem.....	3
1.3.1	Vorkommen von Histamin am Herzen.....	3
1.3.2	Vorkommen von Histaminrezeptoren am Herzen.....	4
1.3.3	Wirkung von Histamin im Kreislauf und am Herzen.....	4
1.3.4	Signaltransduktion.....	5
1.3.5	Histamin und Pathophysiologie am Herzen	7
1.4	Phosphodiesterasen	8
1.5	Phosphodiesterasehemmer	10
2	Zielsetzung.....	12
3	Methoden.....	13
3.1	Tierhaltung	13
3.2	Generierung der Histamin-H₂-transgenen Versuchstiere	13
3.3	Genotypisierung	13
3.3.1	DNA-Extraktion.....	13
3.3.2	Messung der DNA-Konzentration	14
3.3.3	PCR-Amplifikation und Agarose-Gelelektrophorese	14
3.4	Kontraktionsversuche.....	15
3.4.1	Versuchsaufbau	15
3.4.2	Vorbereitung des Versuchs	16
3.4.3	Narkotisierung und Entnahme des Herzens	17
3.4.4	Präparation der Vorhöfe	17
3.5	Versuchsdurchführung.....	18
3.6	Versuchsauswertung und Statistik	20
4	Ergebnisse	22
4.1	Generierung des Tiermodells	22
4.2	Einfluss des Histamin-H₂-Rezeptors auf die Kontrollbedingungen.....	22
4.3	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Histamin allein	23
4.4	Experimente mit einzelnen PDE-Hemmstoffen.....	30
4.4.1	EHNA.....	30
4.4.2	Cilostamid	31

4.4.3	Rolipram.....	33
4.4.4	IBMX	35
4.5	Experimente mit Kombinationen von PDE-Hemmstoffen.....	37
4.5.1	Cilostamid + EHNA.....	37
4.5.2	Rolipram + Cilostamid.....	38
4.5.3	Rolipram + EHNA	43
4.5.4	Rolipram + Cilostamid + EHNA.....	45
4.6	Prävalenz von Arrhythmien.....	47
4.7	EC₅₀-Werte der Konzentrations-Wirkungs-Kurven.....	48
4.8	Anspannungs- und Relaxationszeiten der linken isolierten Vorhofpräparate von H₂-TG - und WT- Mäusen.....	49
5	Diskussion.....	51
5.1	Diskussion der Methoden	51
5.1.1	H ₂ -Transgenes Tiermodell	51
5.1.2	Kontraktionsversuche.....	51
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	52
5.2.1	Einfluss des kardialen H ₂ -Rezeptors auf Basalbedingungen.....	52
5.2.2	Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Histamin ohne Zugabe von Phosphodiesterase-Hemmstoffen.....	52
5.2.3	Einfluss von PDEs auf Basalbedingungen in linken Vorhöfen.....	53
5.2.4	Einfluss von PDEs auf Basalbedingungen in rechten Vorhöfen.....	54
5.2.5	Einfluss von PDEs auf Histaminwirkung und Vergleich mit anderen positiv inotrop wirkenden Substanzen an linken Vorhöfen	55
5.2.6	Einfluss von PDEs auf Histaminwirkung und Vergleich mit anderen positiv chronotrop wirkenden Substanzen in rechten Vorhöfen	57
5.3	Fazit.....	58
5.4	Klinische Bedeutung und Ausblick.....	63
6	Zusammenfassung	66
7	Literaturverzeichnis.....	67
8	Thesen.....	76
	Anhang.....	
	Erklärungen	
	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

5'AMP	Adenosin-5'-monophosphat
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bpm	Beats per minute (Herzschläge pro Minute)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium ²⁺ -Ionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CaMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	Guanosin-3',5'-monophosphat
Cilo	Cilostamid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CK-MB	Isoenzym der Creatinkinase mit einer M- und einer B-Untereinheit
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dF/dT _{max}	Maximum der Kontraktionsgeschwindigkeit
dF/dT _{min}	Minimum der Kontraktionsgeschwindigkeit
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHNA	Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin
EPAC	exchange factor directly activated by cAMP 1 (=direkt von cAMP aktivierter Austauschfaktor)
g	Gramm
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
G _s -Protein	stimulierendes Guanosin-5'-triphosphat-bindendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
G-Protein	Guanosin-5'-triphosphat-bindendes Protein

H ₂ -Rezeptor	Histamin-H ₂ -Rezeptor
H ₂ -TG	transgene Maus mit kardialer Überexpression des humanen Histamin-H ₂ -Rezeptors
HCN-Kanal	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (Hyperpolarisation-aktivierte cyclonukleotid-regulierte Kationenkanäle)
His	Histamin
Hz	Hertz
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-xanthin
IgE	Immunglobulin E
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Iso	Isoprenalin
kg	Kilogramm
Ktr	Kontrolle
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
Log	Logarithmus zur Basis 10
LTCC	spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanal
M	Molar (Mol pro Liter)
mA	Milliampere
max.	maximal
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
Mg	Magnesiumionen
MHC	myosin heavy chain (schwere Kette des Myosins)
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromolar (Mikromol pro Liter)
mm	Millimeter
mM	Millimolar (Millimol pro Liter)
mmol	Millimol
mN	Millinewton ($10^{-3} \cdot (1 \text{ kg} \cdot \text{m/s}^2)$)
ms	Millisekunden
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
Na	Natriumionen

nm	Nanometer
nM	Nanomolar (Nanomol pro Liter)
NO	Stickstoffmonoxid
n.b.	nicht berechenbar
O ₂	Molekularer Sauerstoff
p-Wert	Signifikanzwert/Überschreitungswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pEC ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus der EC ₅₀
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PMCA4	Plasmamembran-Calciumpumpe 4
pmol	Pikomol
Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
Roli	Rolipram
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RyR	Ryanodin-Rezeptor (Ca ²⁺ -Freisetzungskanal)
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SDS	Natrium-Laurylsulfat
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6 (Signalwandler und Aktivator der Transkription 6)
t ₁	Anspannungszeit bzw. Kontraktionszeit
t ₂	Erschlaffungszeit bzw. Relaxationszeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
u.a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
vs.	versus
WT	Wildtyp-Maus
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zu Histamin

Im Jahre 1907 gelang es Naturwissenschaftlern in Freiburg im Breisgau erstmals Histamin, in der chemischen Nomenklatur β -Imidazolyl-äthylamin, künstlich zu synthetisieren (Windaus und Vogt 1907). Einige Jahre später wurde gezeigt, dass Bakterien Histidin zu β -Imidazolyl-äthylamin abbauen können (Ackermann 1910). Ebenfalls 1910 gelang der Nachweis von Histamin als körpereigene Substanz und es wurden mögliche Eigenschaften als Transmitter im Herz-Kreislauf-System und seine Rolle bei Anaphylaxie beschrieben (Dale und Laidlaw 1910). Dale und Laidlaw stellten auch einen positiv inotropen und positiv chronotropen Effekt von Histamin am Herzen fest (Dale und Laidlaw 1910).

Histamin reguliert als Monoamin im Körper zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse. So ist Histamin beteiligt an der Regulation von Zellproliferation, Embryogenese, Hämatopoese, Regeneration und Wundheilung (Jutel et al. 2009). Histamin soll eine wichtige Rolle bei immunologischen und allergischen Vorgängen sowie bei Prozessen der Autoimmunität und Entstehung von malignen Läsionen spielen (Akdis und Blaser 2003). Weiterhin vermittelt Histamin pathologische immunologische Prozesse wie allergische Rhinitis, atopische Dermatitis, allergisches Asthma, Pruritus und andere allergische Erkrankungen (Thangam et al. 2018). Physiologisch soll Histamin im zentralen Nervensystem Einfluss auf die Regulation von Schlafen und Erwachen, zirkadiane Rhythmen, lokomotorische Aktivitäten, Nahrungsaufnahme, Lernen und Gedächtnis haben (Haas et al. 2008). Die veränderte Funktion von Histamin im zentralen Nervensystem wird mit der Pathophysiologie von Parkinson, Alzheimer-Demenz, zerebraler Ischämie, Narkolepsie und Schlafstörungen in Verbindung gebracht (Hu und Chen 2017). Im Magen-Darm-Trakt regt Histamin die Produktion von Magensäure an und beeinflusst sowohl die gastrointestinale Motilität sowie die Ionensekretion der Mukosa (Sander et al. 2006). Die Wirkungen von Histamin am Herzen und im Herz-Kreislauf-System werden im Kapitel 1.3 gesondert besprochen, da diese einen Schwerpunkt dieser Arbeit darstellen.

Im Körper wird Histamin hauptsächlich durch die Pyridoxalphosphat-abhängige Decarboxylierung von Histidin mithilfe der L-Histidin-Decarboxylase hergestellt (Schayer 1956). Außerdem kann Histamin über die Nahrung aufgenommen werden, wobei sich in mikrobiell fermentierten Produkten wie gereiftem Käse, Wein, Sauerkraut oder prozessiertem Fleisch besonders hohe Konzentrationen finden (Maintz und Novak 2007). Histamin-Unverträglichkeit kann klinisch relevante Symptome wie Kopfschmerzen und Magenkrämpfe verursachen (Maintz und Novak 2007). Die Hauptmenge des Histamins kommt in Mastzellen und Basophilen vor, aber auch enterochromaffin-ähnliche Zellen im Magen und histaminerge Neurone gelten als klassische Histaminquellen (Tiligada und Ennis 2020). Die Angaben zur Histaminkonzentration im Plasma variieren in der Literatur, in einer klinischen Studie betrug sie weniger als 90 nM (Coelho et al.

1991). Die Freisetzung von Histamin und die Degranulation von Mastzellen und Basophilen ist ein komplexer Prozess, der durch IgE-abhängige und nicht-IgE-abhängige Stimuli initiiert werden kann (Borriello et al. 2017). Histamin wird hauptsächlich durch die Histamin-N-Methyltransferase zu unwirksamen N4-Methylhistamin abgebaut (Bovet 1937) oder durch die oxidative Diaminoxidase inaktiviert (Maintz und Novak 2007).

1.2 Histaminrezeptoren

Im Folgenden werden die (patho-)physiologischen Funktionen der Histamin-Rezeptoren und (mögliche) Angriffspunkte verschiedener Therapeutika auf Histaminrezeptoren erläutert. Die Wirkung des Histamins wird durch vier G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Histamin-H₁-Rezeptor, Histamin-H₂-Rezeptor, Histamin-H₃-Rezeptor, Histamin-H₄-Rezeptor) vermittelt (Panula et al. 2015).

Der als erstes beschriebene und deshalb als Histamin-H₁-Rezeptor benannte Histamin-Rezeptor wurde zuerst 1937 mithilfe eines Antagonisten beschrieben (Bovet 1937). Die Stimulierung des G_{q/11}-Protein-gekoppelten Histamin-H₁-Rezeptors führt im Gefäßendothel über die Aktivierung der Phospholipase C und zahlreicher weiterer Zwischenschritte zu Vasodilatation, Hautrötung und erhöhter Permeabilität (Jones und Kearns 2011; Hattori et al. 2017). In afferenten C-Fasern hat die Bindung von Histamin an Histamin-H₁-Rezeptoren Juckreiz zur Folge (Greaves 2010). In der Lunge kann die Applikation von Histamin bei Asthmatikern über Histamin-H₁-Rezeptoren zur Bronchokonstriktion führen (Togias 2003). Im zentralen Nervensystem hat der Histamin-H₁-Rezeptor Einfluss auf Schlafen und Erwachen (Thakkar 2011) sowie auf den Rhythmus der Nahrungsaufnahme (Masaki und Yoshimatsu 2010). H₁-Antihistaminika der ersten Generation werden unter anderem zur Behandlung von Übelkeit und Schwindel eingesetzt (Simons und Simons 2011). H₁-Antihistaminika der zweiten Generation kommen bei der Behandlung von allergischer Rhinitis, allergischer Konjunktivitis und bei Urtikaria zum Einsatz (Simons und Simons 2011).

Der Histamin-H₂-Rezeptor und der erste Histamin-H₂-Rezeptorantagonist Burimamid wurden erstmals 1972 beschrieben (Black et al. 1972). Der Histamin-H₂-Rezeptor kann sowohl über den Adenylylcyclase-Weg wirken als auch die Phosphoinositol-Signalkaskade aktivieren und die Genexpression des Transkriptionsfaktor c-fos stimulieren (Akdis und Simons 2006). Der G_s-gekoppelte Histamin-H₂-Rezeptor, der G-Protein-gekoppelt (=GTP-bindende Proteine-gekoppelt) stimulierende Signale in das Zellinnere weiterleitet (Abb. 1), wird unter anderem in gastroparietalen Zellen, den glatten Muskelzellen der Gefäßwand, Nervenzellen und verschiedenen Immunzellen mehrerer Säugetiere exprimiert (Thangam et al. 2018). Der Histamin-H₂-Rezeptor kann weiterhin die Histaminfreisetzung in Basophilen und Mastzellen inhibieren sowie die Antikörpersynthese, T-Zell-Proliferation und Zytokin-Produktion herunterregulieren (Shahid et al. 2009). Über Histamin-H₂-Rezeptoren stimuliert Histamin die Sekretion von Magensäure (Thangam et al. 2018). H₂-Antihistaminika sind zur Behandlung der

gastroösophagealen Refluxkrankheit und Magengeschwüren beim Menschen geeignet (Hershcovici und Fass 2011).

Der Histamin-H₃-Rezeptor soll an der Regulierung von Kognition, Schlaf-Wach-Rhythmus, Entzündung und Energiehomöostase beteiligt sein (Jutel et al. 2009). Über Histamin-H₃-Rezeptoren kann Histamin im zentralen Nervensystem die Ausschüttung von Histamin selbst, Serotonin, Acetylcholin und Noradrenalin regulieren (Panula et al. 2015). Somit könnte der Histamin-H₃-Rezeptor in Zukunft vor allem für die Behandlung von neuropsychiatrischen Krankheitsbildern wie Morbus Parkinson, Schizophrenie, ADHS und Morbus Alzheimer eine Rolle spielen (Nieto-Alamilla et al. 2016).

Der Anfang der 2000er entdeckte Histamin-H₄-Rezeptor (Oda et al. 2000) wird unter anderem in T-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Basophilen und Mastzellen exprimiert und kann die Chemotaxis von Eosinophilen und Mastzellen induzieren (Parsons und Ganellin 2006). Der Histamin-H₄-Rezeptor vermittelt vermutlich Immunantworten oder entzündliche Reaktionen, weshalb eine Antagonisierung Therapiemöglichkeiten für allergische und entzündliche Erkrankungen aufzeigen könnte (Esch et al. 2005).

1.3 Histamin und der H₂-Rezeptor im Herz-Kreislaufsystem

1.3.1 Vorkommen von Histamin am Herzen

Der Histamingehalt linker und rechter menschlicher Ventrikel liegt nach Explantation bei etwa 5 µg/g (Patella et al. 1995). In ventrikulären menschlichen Papillarmuskeln beträgt die Histaminkonzentration 707 ± 100 ng/g (Eckel et al. 1982) und befindet sich damit in der gleichen Größenordnung wie die Noradrenalin-Konzentration in rechten und linken Ventrikeln des menschlichen Herzens (Petch und Nayler 1979). Die Konzentration von Histamin im rechten menschlichen Vorhof beträgt etwa 1035 ± 65 ng/g (Gristwood et al. 1981). Bei Mäusen wird die Histaminkonzentration im Herzen bei etwa 11 pmol/mg (=1,1 µg/g) bemessen (Zimmermann et al. 2011). In aus Operationen gewonnenen menschlichen rechten Vorhofpräparaten wurde mithilfe eines Massenspektrometers eine Histaminkonzentration von 845 ± 60.5 ng/g (=7,6 µM) gemessen (Neumann et al. 2021a). Kardiales Histamin stammt zum Teil aus Mastzellen im Herzen, welches mit der Substanz 48/80 freigesetzt werden kann (Patella et al. 1995). Kardiomyozyten der Maus und des Menschen sind fähig Histamin zu produzieren und wieder abzubauen (Neumann et al. 2021a). Ein Teil des im Herzen vorkommenden Histamins liegt auch in kardialen menschlichen Nervenganglien vor (Singh et al. 1999). Auch bei Mäusen ist Histamin in sympathischen Nervenganglien nachgewiesen worden (He et al. 2012). Histaminkonzentrationen im Herzen unterliegen Speziesunterschieden, wobei Meerschweinchen und Hunde die höchsten Konzentrationen aufweisen, Ratten und Menschen folgen. Die Konzentration von Histamin in Mäuseherzen ist dabei am geringsten (Wolff und Levi 1986). Die geringe Histaminkonzentration in Mäusen wird auf die geringe Anzahl an Mastzellen im Organismus der Maus zurückgeführt (Wolff und Levi 1986). Weiterhin ist die Konzentration von

Histamin im Herzen bei Maus, Ratte und Mensch ist von der Region abhängig (Wolff und Levi 1986). Die höchsten Konzentrationen findet man im rechten Vorhof, dann in absteigender Reihenfolge im linken Vorhof, rechten Ventrikel und linken Ventrikel (Wolff und Levi 1986).

1.3.2 Vorkommen von Histaminrezeptoren am Herzen

Die Expression der H₁- und H₂-Rezeptoren bei Säugetieren ist abhängig von der Spezies und der Lokalisation im Herzen (Matsuda et al. 2004). Beim Menschen finden sich im Vorhof und im Ventrikel sowohl H₁- als auch H₂-Rezeptoren. H₂-Rezeptoren sind im Vergleich zu H₁-Rezeptoren vermehrt vorhanden (Matsuda et al. 2004). Des Weiteren ist die RNA-Expression von H₂-Rezeptoren im Vorhof des Menschen höher als im Ventrikel, während dies bei Histamin-H₁-Rezeptoren genau umgekehrt ist (Matsuda et al. 2004). Ähnliche Tendenzen lassen sich bei Kaninchen beobachten, wobei sich die Verteilung und die Menge der H₁- und H₂-Rezeptoren genau umgekehrt zu der des Menschen verhält (Matsuda et al. 2004). Die Expression der H₁- und H₂-Rezeptoren soll auch abhängig vom Alter sein (Agata et al. 2010). H₃- und H₄-Rezeptoren kommen im Herzen in kardialen Ganglien vor und sollen die Ausschüttung von Katecholaminen hemmen (Chan et al. 2012).

1.3.3 Wirkung von Histamin im Kreislauf und am Herzen

Intravenös verabreichtes Histamin bedingt beim Menschen und anderen Säugetieren eine Senkung des arteriellen Blutdrucks und einen verminderten Gefäßwiderstand. Dies wird sowohl über Histamin-H₁- als auch über Histamin-H₂-Rezeptoren vermittelt (Hattori et al. 2017). Die spezifischen Wirkungen von Histamin an Gefäßen sind abhängig von der Dosierung, der Administrationsroute, der Spezies, der Lokalisation, der Art des Gefäßes sowie der Rezeptorbesetzung (Levi et al. 1991; Hattori et al. 2017). An glatten Muskelzellen in Blutgefäßen führte Histamin an Histamin-H₁-Rezeptoren eher zu einer Vasokonstriktion, während über Histamin-H₂-Rezeptoren eine Vasodilatation zu beobachten ist (Marshall 1984). In arteriosklerotischen humanen Koronargefäßen verursachte Histamin über Histamin-H₁-Rezeptoren eine Kontraktion der vaskulären glatten Muskelzellen und initiierte eine rhythmische, phasische Aktivität während die Aktivierung des Histamin-H₂-Rezeptoren eine leichte Relaxation herbeiführte (Ginsburg et al. 1980). In den Koronararterien eines isolierten Meerschweinchenherzens vermittelte der Histamin-H₁-Rezeptor ebenfalls eine Vasokonstriktion, während die Stimulierung des Histamin-H₂-Rezeptor zu einer Koronardilatation führte (Baumann et al. 1982).

Beim gesunden Menschen verursacht die intervenöse Infusion von Histamin in vivo einen Anstieg der Herzfrequenz, ein erhöhtes Herz-Zeit-Volumen sowie eine Steigerung der ersten Ableitung des Drucks im linken Ventrikel (Vigorito et al. 1983). Isolierte Präparate von humanen linken und rechten Vorhöfen und Ventrikeln zeigten einen dosisabhängigen positiv inotropen Effekt des Histamins, der mit Cimetidin, einem selektiven H₂-Antagonisten, antagonisiert werden konnte (Ginsburg et al. 1980). Ein Histamin-H₂-Rezeptor-vermittelter konzentrationsabhängiger positiv

inotroper Effekt von Histamin auf menschliche Papillarmuskeln wurde nachgewiesen (Eckel et al. 1982). Diese Effekte unterlagen keiner Desensitivierung (Eckel et al. 1982), während bei Ginsburg eine Desensitivierung beobachtet werden konnte (Ginsburg et al. 1980). In rechten menschlichen Vorhöfen wurde experimentell ein positiv inotroper Effekt von Histamin über den H₂-Rezeptor festgestellt, der mit der Erhöhung der Adenylylcyclase-Aktivität einherging (Zerkowski et al. 1993). An isoliertem, spontan schlagendem menschlichen rechtem Vorhofgewebe wurde eine konzentrationsabhängige Steigerung der Schlagfrequenz und eine erhöhte Anzahl an Arrhythmien über H₂-Rezeptoren durch die Gabe von Histamin beobachtet (Levi et al. 1981; Sanders et al. 1996). An isolierten elektrisch gereizten humanen rechten Vorhöfen wurde ein H₂-vermittelter positiv inotroper Effekt sowie eine gesteigerte atriale Erregbarkeit ermittelt, die in ihrer Sensitivität vergleichbar mit Noradrenalin waren (Gristwood et al. 1980). Histamin soll über H₁-Rezeptoren im menschlichen Vorhofmyokard zumindest bei einigen Patienten einen negativ inotropen und chronotropen Effekt haben (Genovese et al. 1988). Im menschlichen Herzmuskel führt IgE-vermittelte Hypersensitivität zu einer Histaminfreisetzung, die einen positiv inotropen und chronotropen Effekt zur Folge hat, welcher vermutlich über den H₂-Rezeptor vermittelt wird (Graver et al. 1986). Bei der Wirkung von Histamin auf das Herz sind spezieabhängige Unterschiede zu beobachten. So soll zum Beispiel der positiv inotrope Effekt von Histamin am linken Vorhof von Meerschweinchen über den H₁-Rezeptor vermittelt und unabhängig vom cAMP-Spiegel sein (Reinhardt et al. 1977). Bei Ratten wird der positiv inotrope Effekt von Histamin im linken Vorhof nicht über H₁- oder H₂-Rezeptoren vermittelt, sondern einer indirekten Wirkung durch Katecholaminfreisetzung zugeschrieben: Eine Reserpin-Vorbehandlung der Ratten oder zusätzliche Gabe der β -Adrenorezeptorantagonisten Propranolol konnte den Histamineffekt vollständig aufheben (Laher und McNeill 1980). Dennoch kann die mRNA und das Protein für den H₂-Rezeptor bei Ratte und Maus im Herzen nachgewiesen werden (Fitzsimons et al. 2001; Matsuda et al. 2004).

In einer Studie erhöhte Histamin konzentrationsabhängig die Kontraktionskraft in linken Maus-Vorhöfen, während bei β -Adrenorezeptor-überexprimierenden Mäusen kaum eine Steigerung zu beobachten war (Liu et al. 2002). In früheren Arbeiten am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gab es bei Wildtyp-Mäusen weder bei linken isolierten Vorhofpräparaten einen positiv inotropen Effekt noch bei rechten isolierten Vorhofpräparaten einen positiv chronotropen Effekt (Gergs et al. 2019; Gergs et al. 2020; Gergs et al. 2021). Ausgehend davon generierte die Arbeitsgruppe eine transgene Maus mit herzspezifischer Überexpression des humanen kardialen Histamin-H₂-Rezeptors. Diese zeigte einen konzentrations- und zeitabhängigen positiv inotropen und positiv chronotropen Effekt auf Histamin (Gergs et al. 2019).

1.3.4 Signaltransduktion

Die Steigerung der Kontraktionskraft und der Frequenz durch Histamin wird durch die Aktivierung des G_s-Protein-gekoppelten H₂-Rezeptors und dem damit verbundenen Anstieg der

intrazellulären cAMP-Konzentration erklärt (Johnson et al. 1979; Hill et al. 1997; Ganellin and Parsons 2013). Bereits Anfang der 70er-Jahre konnte nachgewiesen werden, dass Histamin die Adenylylcyclase im Myokard des Herzens von Meerschweinchen und Menschen aktiviert (Klein und Levey 1971). Durch die Gabe von Histamin an isolierten elektrisch gereizten menschlichen Vorhofpräparaten im Organbad wurde, neben eines gesteigerten cAMP-Spiegels als direkte Folge, auch eine erhöhte Aktivität der PKA (=cAMP-abhängige Proteinkinase) festgestellt (Sanders et al. 1996). Histamin führt durch die Aktivierung des G_s -cAMP-PKA-Signalwegs über eine Phosphorylierung von L-Typ Calciumkanälen zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle (Wellner-Kienitz et al. 2003). Diese Ergebnisse sowie die Ähnlichkeit der positiv inotropen und chronotropen Wirkung von Histamin am Herzen mit der von β -Adrenorezeptor-Agonisten (Hattori 1999; Hattori et al. 2017; Gergs et al. 2021) deuten darauf hin, dass Histamin zumindest zum Teil den gleichen intrazellulären Signalweg wie β -Adrenorezeptor-Agonisten (Abb.1) benutzt (Eckel et al. 1982).

Der Ablauf der Signaltransduktion beim ebenfalls G_s -gekoppelten β -Adrenorezeptor ist gut untersucht (Abb. 1). Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor wird an der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins GTP gegen GDP ausgetauscht (Zhang et al. 2015). Die daraufhin dissoziierende α -Einheit aktiviert die membranständige Adenylylcyclase. Die Adenylylcyclase katalysiert den Abbau von ATP zum sekundären Botenstoff 3',5'-cyclo-AMP (cAMP) und Pyrophosphat. cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit der PKA, woraufhin die katalytische Untereinheit der PKA dissoziiert (Salazar et al. 2007). Diese phosphoryliert unter anderem den spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal, den Ryanodin-Rezeptor, Phospholamban und die inhibitorische Untereinheit des Troponins und kann so die Kontraktilität von Myozyten erhöhen (Salazar et al. 2007). L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle aktivieren den Ryanodin-Rezeptor, was zu einer Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung führt (Bers 2002). Durch Anstieg der freien interzellulären Ca^{2+} -Konzentration bindet das freie Ca^{2+} an die Calcium-bindende Untereinheit des Troponins, worauf die Bindungsstelle zwischen Aktin und Myosin freigegeben wird und dadurch zur Kontraktion der Myofilamente führt (Bers 2002). Die Phospholamban-Phosphorylierung ist direkt assoziiert mit der Steigerung der Ca^{2+} -Affinität der SERCA2 (=Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums) und damit einer Verbesserung der Relaxation der Herzmuskelzellen (Bers 2002; Salazar et al. 2007).

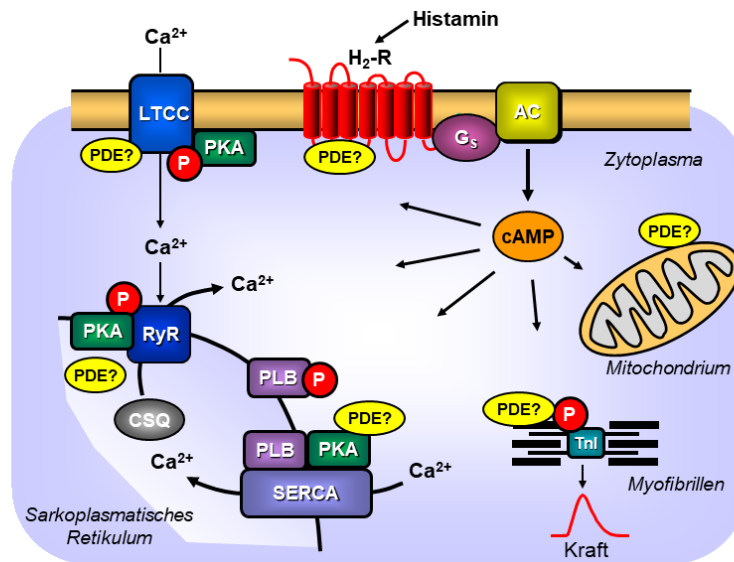


Abb. 1: Signaltransduktion von Histamin über Stimulation des H₂-Rezeptors

Histamin bindet an den H₂-Rezeptor, woraufhin an der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins GTP gegen GDP ausgetauscht wird. Die α -Untereinheit dissoziiert und aktiviert die membranständige Adenylcyclase, die wiederum die Bildung von cAMP katalysiert. Dies führt zu einer Stimulation der cAMP-abhängigen Proteinkinase A, die daraufhin Phospholamban, Ryanodin-Rezeptoren (=RyR), L-Typ-Ca²⁺-Kanäle, Troponin I und weitere regulatorische Proteine phosphoryliert. L-Typ-Ca²⁺-Kanäle aktivieren den Ryanodin-Rezeptor, was über eine Ca²⁺-induzierte-Ca²⁺-Freisetzung zur Aktivierung der Kontraktion der Myofilamente führt. Die Phospholamban-Phosphorylierung führt zu einer Steigerung der Ca²⁺-Affinität der SERCA2 (=Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums) und damit einer Verbesserung der Relaxation der Herzmuskelzellen. Dadurch nimmt die Kontraktionskraft der Herzmuskelzelle zu und die Relaxation wird beschleunigt. PDEs (=Phosphodiesterasen) können theoretisch auf diesen Prozess entgegenwirken, indem sie durch Hydrolyse des cAMPs den intrazellulären cAMP-Spiegel senken (Neumann et al. 2021c).

1.3.5 Histamin und Pathophysiologie am Herzen

An der Pathophysiologie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wird eine Beteiligung von Histamin vermutet (Monczor und Fernandez 2016). In Kaninchen konnte eine erhöhte Konzentration von Histamin nach Gabe des kardiotoxischen Anthrazyklins nachgewiesen werden (Bristow et al. 1983). Bei Studien an Wistar-Ratten konnte der H₂-Rezeptor-Antagonist Famotidin nach einer Applikation von Doxorubicin den oxidativen und nitrosativen Stress sowie kardiale Stressmarker wie CK-MB und Troponin-Spiegel senken und die myokardiale Funktion in der Echographie verbessern und somit die Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität, die vermutlich über den H₂-Rezeptor vermittelt wird, senken (Kondru et al. 2018). Bei Mäusen, bei denen mittels einer transversalen Konstriktion der Aorta eine druckabhängige kardiale Hypertrophie erzeugt worden war, zeigten H₂-Rezeptor-Knockout-Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (WT) eine größere linksventrikuläre Verkürzungsfraction, einen höheren Kontraktilitätsindex, einen niedrigeren linksventrikulärem enddiastolischen Druck sowie eine geringer ausgeprägte Stauungslunge (Zeng et al. 2014). Die Knockout-Tiere wiesen in histologischen Untersuchungen des Herzens einen geringeren Grad an Fibrose und Apoptose auf. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass das Fehlen des H₂-Rezeptors einen Schutz gegen Herzversagen darstellen könnte (Zeng et al. 2014). Eine Blockade des H₂-Rezeptors bei Hunden mit Schrittmacher-induzierter Herzinsuffizienz

verbesserte die systolische Herzfunktion zusätzlich zur Gabe von β -Rezeptor-Blockern (Takahama et al. 2010). Eine Therapie von männlichen hypertensiven Ratten mit dem H_2 -Rezeptor-Blocker Famotidin reduzierte Blutdruck, Hypertrophie, Marker für Herzschädigung sowie die Kollagenisierung, wodurch vermutet werden kann, dass Histamin über den H_2 -Rezeptor auch eine Rolle bei kardialen Umbauprozessen durch Hypertension zu spielen scheint (Potnuri et al. 2018). Die Histaminkonzentration nach einem Myokardinfarkt ist um mehr als das Doppelte erhöht (Luo et al. 2013). Die Aktivierung des H_2 -Rezeptors nach einem Myokardinfarkt könnte die mitochondriale Dysfunktion im Myokard fördern und so möglicherweise die Permeabilität im kardiovaskulären Endothel steigern, wodurch eventuell die Ischämie-Reperfusionsschädigung noch verstärkt werden könnte (Luo et al. 2013). Histamin könnte jedoch bei Mäusen nach Auslösung eines Myokardinfarkts durch den STAT6-Signalweg einen endogenen Schutz gegen Ischämie-bedingtes kardiales Remodeling darstellen (Chen et al. 2017). H_3 - und H_4 -Rezeptoren sollen bei Ischämie des Myokards einen protektiven Effekt haben und kardiale Dysfunktion verhindern (Hattori et al. 2017). Histamin kann in menschlichen rechten Vorhöfen vermutlich über H_2 -Rezeptoren späte Nachdepolarisationen auslösen und Arrhythmien verursachen (Levi et al. 1981).

1.4 Phosphodiesterasen

3'-cyclic-Nucleotidphosphodiesterasen (PDEs) sind eine Subkategorie von Phosphodiesterasen, die 3',5'-zyklische Nucleotide hydrolytisch spalten. Damit spielen sie über den Abbau von cAMP und cGMP eine wichtige Rolle in der Regulation verschiedenster Zellfunktionen (Omori und Kotera 2007). Die PDEs von Säugetieren setzen sich aus 21 Genen zusammen. Basierend auf Sequenzhomologie, enzymatischen Eigenschaften und Sensitivität gegenüber Hemmstoffen sind elf verschiedene Isoenzyme beschrieben. Die zahlreichen Spleißvarianten der PDE-Isoenzyme variieren je nach gewebespezifischen Expressionsmustern, Genregulierung, enzymatischer Regulation durch Phosphorylierung und Regulatorproteine, subzellulärer Lokalisation und Interaktion mit assoziierten Proteinen (Omori und Kotera 2007). Im menschlichen Myokard sind PDE 1, 2, 3, 4, 5, 8 und 9 beschrieben (Kokkonen und Kass 2017). Die gewebespezifische relative Verteilung der PDEs kann durch verschiedene Faktoren variieren. Die Expression der verschiedenen Isoformen der PDEs im linken Ventrikel ist abhängig vom Alter, möglichen Vorerkrankungen sowie der Vorbehandlung mit PDE-Hemmstoffen (Nakano et al. 2017). PDEs befinden sich in separaten und voneinander räumlich getrennten Kompartimenten in der Zelle und sind funktionell an einen individuellen Rezeptor gekoppelt (Kokkonen und Kass 2017). Auf diese Weise kontrollieren sie den intrazellulären cAMP- und cGMP-Spiegel spezifisch vom Stimulus abhängig (Kokkonen und Kass 2017). PDE1 wird von Ca^{2+} /Calmodulin aktiviert und kann sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren, wobei die PDE1A und PDE1B eher cGMP als cAMP abbauen und die PDE1C etwa die gleiche Affinität zu cAMP und cGMP hat (Miller et al. 2009). PDE1A kann durch einen cGMP/PKG-abhängigen Signalweg und PDE1C durch einen cAMP/PKA-Mechanismus eine Rolle bei der Regulation der pathologischen Hypertrophie von Kardiomyozyten spielen (Miller et al. 2009; Chen et al. 2018). PDE5 hydrolysiert spezifisch

cGMP und ist in gesunden Herzmuskelzellen kaum nachzuweisen, jedoch ist die PDE5-Proteinexpression im hypertrophen Herzen bei der Maus und in geringerem Maße auch beim Menschen erhöht (Vandeput et al. 2009). PDE8 katalysiert spezifisch die Hydrolyse von cAMP (Knight und Yan 2013). Sie spielt eine Rolle bei der Regulation der Ca^{2+} -Signalübertragung, aber eine spezifische Rolle bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen konnte noch nicht nachgewiesen werden (Knight und Yan 2013). Die PDE9A reguliert das NO-unabhängige cGMP in Herzmuskelzellen und könnte durch ihre Rolle bei stressinduzierten Herzerkrankungen ein potentiell therapeutisches Ziel sein (Lee et al. 2015).

PDE2, 3 und 4 spielen in der Regulierung des cAMP-Haushalts im Herzen eine wesentliche Rolle (Knight und Yan 2013) und sollen deshalb im Zuge dieser Arbeit genauer betrachtet werden. Die PDE2 kann sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren, wobei die Bindung von cGMP an das katalytische Zentrum der PDE die Aktivität um das bis zu 30-fache steigern kann (Knight und Yan 2013). PDE2 kann in Herzmuskelzellen des Ventrikels via NO und cGMP dem, von Katecholaminen verursachten, cAMP-Anstieg entgegenwirken und so den positiv inotropen Effekt aufheben (Mongillo et al. 2006). Im humanen Vorhof senkt die PDE2 vermutlich über einen cGMP-abhängigen Abbau von cAMP den Strom durch den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal und wirkt damit ebenfalls dem Effekt von Isoprenalin entgegen (Knight und Yan 2013). Die Expression der PDE2 wird bei Herzinsuffizienz deutlich hochreguliert (Mehel et al. 2013). Dies wird als Schutzmechanismus bei kardialen Stress interpretiert, um der pathologischen Überstimulation von β -Rezeptoren entgegenzuwirken (Mehel et al. 2013). Die PDE-vermittelte cAMP-Hydrolyse kann die Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten beschleunigen (Vettel et al. 2014). PDE3 hydrolysiert cAMP mit einer höheren Affinität als cGMP (Kokkonen und Kass 2017). Dabei inhibiert cGMP den cAMP-Abbau durch PDE3 (Kokkonen und Kass 2017). Die PDE3A soll für die basale Regulation der Kontraktilität verantwortlich sein indem es die PKA-abhängige Phospholamban-Phosphorylierung und damit Ca^{2+} -Beladungen und Ca^{2+} -Ströme beeinflusst (Beca et al. 2013). Dies geschieht durch die selektive Regulation des cAMP-Spiegels in Mikrodomänen des SR, die makromolekulare Komplexe aus PDE3A, SERCA, Phospholamban, PKA, Proteinphosphatase 2 und Ankerprotein der Proteinkinase A 18 beinhalten (Beca et al. 2013). Die Hemmung der PDE3 soll einen Anstieg des kardialen Auswurfs und der Kontraktilität sowie eine Verminderung des peripheren Gefäßwiderstands bewirken, wodurch Symptome einer Herzinsuffizienz abgeschwächt werden könnten (Ding et al. 2005; Knight und Yan 2013). Die Aktivität von PDE3A in hypertrophen Kardiomyozyten ist vermindert (Abi-Gerges et al. 2009). PDE4 katalysiert spezifisch die Spaltung von cAMP und ist am Herzen möglicherweise verantwortlich für Regulierung der basalen Kontraktilität (Kokkonen und Kass 2017). Bei Mäusen führt die reduzierte Aktivität von PDE4D zu einer fehlerhaften Funktion des RyR2-Kanals, die mit Herzversagen und Arrhythmien assoziiert sein soll (Lehnart et al. 2005). Auch im menschlichen Vorhof soll PDE4 die Arrhythmieanfälligkeit vermindern (Molina et al. 2012).

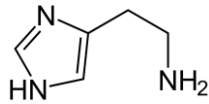
1.5 Phosphodiesterasehemmer

Phosphodiesterasehemmer (PDE-Hemmer) sind eine heterogene Substanzgruppe, die PDEs spezifisch oder unspezifisch hemmen. Sie werden therapeutisch bei verschiedenen Krankheitsbildern eingesetzt und dienen der Erforschung der physiologischen oder pathophysiologischen Rolle der PDEs im Körper (Maurice et al. 2014; Nadur et al. 2021). Die Hemmung der PDE-Wirkung führt zu einem Anstieg des cAMP/cGMP-vermittelten Effekts, worauf man indirekt auf die Funktion der einzelnen PDEs schließen kann.

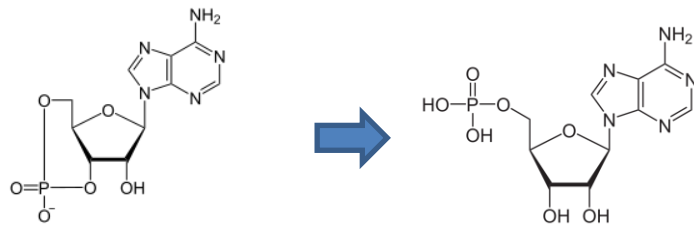
PDE-Hemmstoffe finden in der Behandlung verschiedener Krankheitsbilder eine Anwendung. Der unspezifische PDE-Hemmer Theophyllin wird bei Asthma eingesetzt und PDE4-Hemmer haben einen klinischen Nutzen bei COPD und Psoriasis (Baillie et al. 2019). PDE5-Hemmer sind als Pharmaka für die Behandlung der erektilen Dysfunktion und der pulmonalen Hypertension zugelassen (Baillie et al. 2019). Weitere therapeutische Möglichkeiten werden derzeit erforscht und umfassen u. a. die Behandlung von Alzheimer, Parkinson, Schizophrenie, Tumoren, Vitiligo, Tinnitus und Typ 2-Diabetes (Baillie et al. 2019). Für die akute Katecholamin-refraktäre Herzinsuffizienz oder als Überbrückung bis zu einer Herztransplantation bzw. eines Herzunterstützungssystem kann der PDE3-Hemmstoff Milrinon verwendet werden (Chong et al. 2018). Eine chronische Gabe wird aufgrund der erhöhten Arrhythmie-bedingten Mortalität (Packer et al. 1991) nicht mehr empfohlen (Chong et al. 2018). Der PDE3-Hemmer Levosimendan kann zur Therapie der akuten dekompensierten chronischen Herzinsuffizienz verabreicht werden (Bouchez et al. 2018). Ein protektiver Nutzen von PDE5-Hemmern für die erniedrigte Linksherzfunktion nach einem akuten Myokardinfarkt soll untersucht werden (Hutchings et al. 2018). Für die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden etablierte PDE-Hemmer (Maurice et al. 2014) eingesetzt, die bereits in vergleichbaren Arbeiten verwendet wurden (Afzal et al. 2008; Neumann et al. 2019). Als Hemmer der PDE2 wurde Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin-hydrochlorid (EHNA) verwendet, als spezifischer PDE3-Hemmstoff diente Cilostamid und für die Hemmung der PDE4 wurde Rolipram benutzt. IBMX (3-Isobutyl-1-methyl-xanthin) wurde als unspezifischer PDE-Hemmer eingesetzt (Maurice et al. 2014) (Abb. 2).

A

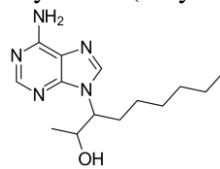
Histamin

**B**

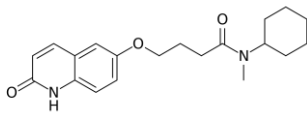
cAMP → 5'AMP

**C**

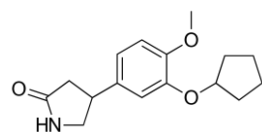
Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin-hydrochlorid (EHNA, PDE2-Hemmer)



Cilostamid (PDE3- Hemmstoff)



Rolipram (PDE4-Hemmstoff)



3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX, unselektiver PDE-Hemmstoff)

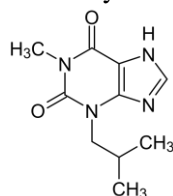


Abb. 2: Strukturformeln

(A) Histamin

(B) cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) wird durch Phosphodiesterasen (PDE) zu inaktiven Adenosin-5'-monophosphat (5'AMP) abgebaut

(C) Strukturformeln der verwendeten PDE-Hemmstoffe; Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenin-hydrochlorid (EHNA), Cilostamid, Rolipram, 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX)

2 Zielsetzung

Histamin spielt im kardiovaskulären System eine bedeutende Rolle: Im menschlichen Herzen kann Histamin die Kontraktionskraft erhöhen und zu einem Frequenzanstieg führen (Ginsburg et al. 1980; Vigorito et al. 1983). Auch bei der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz scheint Histamin von Bedeutung zu sein (Leary et al. 2018). Phosphodiesterasen (=PDEs) sind entscheidend, um cAMP-vermittelten Effekten am Herzen entgegenzuwirken (Omori und Kotera 2007).

In dieser Arbeit soll die Wirkung der spezifischen Phosphodiesterasen 2, 3 und 4 auf den Effekt des Histamins am Histamin-H₂-Rezeptor des rechten und linken Säugetier-Vorhofs genauer untersucht werden. Die Ergebnisse ermöglichen ein genaueres Verständnis des Signalwegs von Histamin am Herzen und somit Rückschlüsse auf die (Patho-)Physiologie des Histamins und der verschiedenen PDEs zu ziehen. PDE-Hemmer dienen zur indirekten Beschreibung der PDE-Funktion und könnten perspektivisch, wie bereits für einige Indikationen zutreffend, als Therapeutika genutzt werden. Wie schon in vorangegangenen Experimenten für Serotonin gezeigt (Neumann et al. 2019), hat auch Histamin an isolierten Vorhofpräparaten von Wildtyp-Mäusen keine Kraft- und Frequenz-steigernde Wirkung (Gergs et al. 2019). Um die Wirkung von Histamin über den Histamin-H₂-Rezeptor genauer zu untersuchen und Erkenntnisse über den Effekt von Histamin am menschlichen Herzen zu gewinnen, wurden transgene Mäuse, die den humanen H₂-Rezeptor herzspezifisch überexprimieren, generiert (Gergs et al. 2019). In dieser Arbeit wird die Auswirkung einzelner PDE-Hemmer sowie verschiedener Kombinationen der PDE-Hemmstoffe auf die Kontrollbedingungen sowie die Veränderung der Histamineffekte unter Einfluss von PDE-Hemmern bei transgenen Mäusen mit überexprimiertem humanem H₂-Rezeptor untersucht (=H₂-TG). Wildtypen (=WT), die diesen Rezeptor nicht exprimierten, fungieren bei den Experimenten als Kontrollgruppe, da sich bei ihnen keine Histamin-induzierte positive Inotropie bzw. Chronotropie zeigt (Gergs et al. 2019). Die Kontraktilität wird hierbei am elektrisch stimulierten isolierten linken Vorhofpräparat der Maus untersucht, während die Frequenz und das Auftreten von Arrhythmien am spontan schlagenden isolierten rechten Vorhofpräparat betrachtet wird.

3 Methoden

3.1 Tierhaltung

Für die Versuche wurden Wildtyp-Mäuse (=WT) und Histamin-H₂-transgene Mäuse (=H₂-TG) des Stammes CD1 verwendet. Die Tiere wurden mit handelsüblichem Labortierfutter und Leitungswasser ad libitum in schallisolierten, klimatisierten Räumen im 12:12 Hell-Dunkel-Zyklus durch die Zentrale Tierhaltung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entsprechend der gesetzlichen Vorschriften gehalten und versorgt (Nummer der Genehmigung für Versuchsdurchführungen: 42502-02-691 MLU).

3.2 Generierung der Histamin-H₂-transgenen Versuchstiere

Neben Wildtyp-Mäusen wurden in den Versuchen auch transgene Mäuse verwendet, die herzspezifisch den humanen Histamin-H₂-Rezeptor überexprimierten. Zur Herstellung der H₂-transgenen Tiermodells wurde die cDNA des menschlichen Histamin-H₂-Rezeptors (GeneBank Accession Number AY136744) verwendet, die dem Institut freundlicherweise von Professor Dr. Seifert (Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt wurde. Die cDNA des H₂-Rezeptors zusammen mit der C-terminalen 6xHistidin-Markierung wurde mithilfe der Restriktionsendonukleasen Hind III und XbaI aus dem mütterlichen Plasmid herausgeschnitten. Die Fragmentenden wurden mit der Klenow-Polymerase geglättet. Daraufhin wurde die cDNA in die Eco-ICR-Stelle in eine Expressionskassette eingefügt. Dafür wurde ein herzspezifischer Promoter der Maus, die α -Isoform der schweren Kette des Myosins (α -MHC), verwendet. Die korrekte Ausrichtung der DNA wurde mit einer Sequenzierung überprüft. Als Terminierungssequenz wurde eine Poly-A-Sequenz des Simian-Virus 40 verwendet. Das H₂-Rezeptor-cDNA-Promoter-Konstrukt wurde mit dem Restriktionsenzym NruI aus dem Plasmid herausgeschnitten und mit einer Cäsium-Chlorid-Gradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Daraufhin wurde die Expressionskassette in die Pronuklei einer befruchteten Eizelle des Mausstammes FVB/N eingefügt (Gergs et al. 2019). Die so erzeugten transgenen Histamin-H₂-Rezeptor überexprimierenden Tiere wurden in einen CD1-Hintergrund eingekreuzt.

3.3 Genotypisierung

3.3.1 DNA-Extraktion

Zur Unterscheidung von WT und H₂-TG wurde eine Genotypisierung vorgenommen. Dazu wurde den Tieren im Alter von vier Wochen ein kleines Stück ihrer Schwanzspitze (circa. 1 cm) entfernt und ihnen zur Identifizierung eine Markierung ans Ohr gesetzt. Zur enzymatischen Zersetzung wurden die Präparate der Schwanzstücke jeweils 12 Stunden über Nacht in einer 700 μ l TE/SDS-Puffer und 20 μ l Proteinase K bei 55° C schüttelnd inkubiert. Die Gewinnung der DNA erfolgte mittels Phenolaufräumung aus dem Lysat. Durch mehrfach wiederholte Behandlung mit Chloroform und Phenol entstand eine obere wässrige Phase, die DNA enthielt, sowie eine untere organische Phase, die aus Proteinen und Verunreinigungen bestand. Dafür erfolgte zuerst die

Zugabe von 700 µl wassergesättigtem Phenol und eine 3-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm. Es folgte die Entnahme der oberen, wässrigen Phase, die die DNA enthielt, und die Überführung in ein neues Versuchsgefäß. Es wurden dann 700 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben. Nochmals wurde 3 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und die obere Phase entnommen. Zur DNA-Ausfällung und Reinigung von Phenolresten wurde das Gemisch mit 70 µl Natriumacetat und 770 µl reinem Ethanol versetzt. Es schloss sich eine zehnminütige Zentrifugation bei 14000 rpm an, woraufhin sich ein Sediment bildete, welches vom Überstand getrennt wurde. Das Sediment wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und bei 14000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Sediment wurde auf einem Heizblock bei 30-35°C getrocknet. Abschließend folgte die Inkubation mit einem 50 µl TE-Puffer für 15 Minuten bei 65° C. Die DNA wurde bis zur Weiterverwendung bei 4°C gelagert (Gergs et al. 2019).

3.3.2 Messung der DNA-Konzentration

Die Messung der DNA-Konzentration sowie der Reinheit erfolgte fotometrisch durch Messung der Absorption im UV-Spektrum zwischen 260 nm und 280 nm mit einem Biophotometer (Eppendorf). Nach einer Kontrollwertbestimmung wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen. Die Konzentration wurde nach der Formel $C [\mu\text{g/mL}] = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktionskoeffizient}$ berechnet, wobei der spezifische Extinktionskoeffizient für doppelsträngige DNA 50 betrug. Außerdem wurde zur Beurteilung der Reinheit eine Messung bei 280 nm durchgeführt. Der Quotient der Messwerte bei 260 und 280 gab Aufschluss über die Qualität der Probe. Wenn das Verhältnis A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0 lag, sprach dies für eine sauber extrahierte DNA. Ein Wert kleiner 1,8 deutete auf Verunreinigungen (z.B. durch Proteine) hin (Gergs et al. 2019).

3.3.3 PCR-Amplifikation und Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Polymerase-Kettenreaktion wurde dann die DNA mithilfe von DNA-Polymerasen in vitro zu Fragmenten bekannter Größe vervielfältigt. Die Agarose-Gelelektrophorese diente dann zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach Größe. Zur PCR-Amplifikation wurden 1 µl DNA-Probe im Thermocycler mit 19 µl Mastermix (8 µl entmineralisiertes Wasser, je 0,5 µl reverse- und forward-Primer, sowie 10 µl vorgefertigter 2-fach konzentrierter Enzymmix) inkubiert. Der Ansatz durchlief dann entsprechend des PCR-Protokolls (siehe Anhang) 30 Zyklen in einem Eppendorf „Mastercycler gradient“. Während der PCR-Zyklen wurde das 1%-ige Agarose-Gel vorbereitet. Dazu wurde 1 g Agarose auf 100 ml TAE-Puffer gegeben. Das Gemisch wurde aufgeköcht, mit 10 µl red safe (interkalierender DNA-Farbstoff) versetzt und in die Gelkammer gegeben. Die Kämme wurden je nach Probenanzahl eingesetzt. Daraufhin folgte eine Polymerisierung von mindestens 30 min und die Kämme wurden entfernt sowie das Gel in die Gelkammer mit TAE-Puffer überführt. 8 µl einer sogenannten DNA-Leiter (1 kb oder 100 bp) wurden als Kontrolle des Laufs und zur Größenbestimmung in die erste Tasche geladen. Von den

PCR-Produkten wurden 15 μ l in die Taschen gefüllt. Der Gellauf erfolgte bei 100 mA. Nach etwa 20 bis 30 Minuten wurde das Gel unter UV-Licht angesehen und das Ergebnis fotografisch festgehalten. Bei transgenen Mäusen, bei denen der Histamin-H₂-Rezeptor-überexprimiert war, konnte dabei die entsprechende Bande mit 555 bp nachgewiesen werden, was bei WT nicht der Fall war. Diese Genotypisierung wurde bei allen Tieren, die zu den Versuchen verwendet wurden, durchgeführt. Dadurch erfolgte die Unterscheidung die Tiere nach ihrem genetischen Status in Bezug auf den Histamin-H₂-Rezeptor in WT und H₂-TG (Gergs et al. 2019).

3.4 Kontraktionsversuche

3.4.1 Versuchsaufbau

Bei den Kontraktionsversuchen wurden isolierte rechte und isolierte linke Vorhofpräparate von Wildtyp (=WT) und H₂-transgenen-Mäusen (H₂-TG) verwendet und die Kontraktionskraft und Frequenz im Organbad aufgezeichnet. Die isolierten rechten Vorhofpräparate schlugen spontan, wenn der Sinusknoten als Frequenzgeber bei der Präparation erhalten wurde. Die isolierten linken Vorhofpräparate wurden mit einer Frequenz von 1 Hz elektrisch stimuliert.

Im Zentrum des Versuchs stand ein Doppelwandgefäß (Abb. 3B). Im äußeren Gefäß befand sich ein Bad, welches als Wasserbad für das Organbad fungierte und auf 37° temperiert war. Im inneren Gefäß befand sich das Organbad mit 10 ml Tyrodelösung und durchgehender Carbogenversorgung. Die Tyrodelösung ist eine Lösung von Elektrolyten und Glucose in Wasser, die annähernd die physiologischen Verhältnisse widerspiegeln soll. Zur Anlage gehörte auch ein Reizgerät, dessen Reizelektroden das isolierte linke Vorhofpräparat mit einer Reizfrequenz von 1 Hz und Rechteckimpulsen von 5 ms Dauer stimulierten. Dabei lag die Spannung etwa 10-20 % oberhalb der Reizschwelle, sodass auf einen Reiz eine Kontraktion der linken Vorhofpräparate erfolgte. Die isolierten Vorhofpräparate waren mittels Haken und festen Metallstäben an einem Kraftaufnehmer befestigt. Der Kraftaufnehmer war mit einem Brückenverstärker verbunden und die digitalisierende Hardware übertrug die Messung anschließend auf einen PC. Auf dem Bildschirm wurde die Messung dann mithilfe der Software LabChart Pro v.8.1.8 23.08.2017 ADInstruments, Sidney, Australien) dargestellt und aufgezeichnet (Neumann et al. 2003; Gergs et al. 2013).

A



B

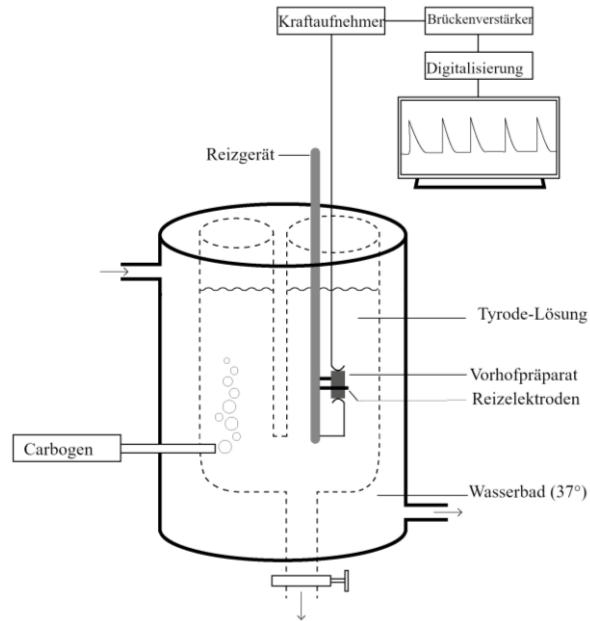


Abb. 3: Präparation der Vorhöfe und Versuchsaufbau

A Fotografien der Präparation der Vorhöfe:

Foto 1 zeigt das komplette fixierte Herz nach Entnahme aus einer narkotisierten Maus und Entfernung von benachbartem Gewebe. Ansicht von oben auf linken Vorhof (helleres Gewebe links) und rechten Vorhof (helleres Gewebe rechts). Zentral zu sehen ist der Aortenbogen. Das Herz ist eingetaucht in eine mit Tyrode befüllte Präparierschale und schlägt spontan;

Foto 2 zeigt das isolierte linke Vorhofpräparat nach Trennung vom restlichen Herzen;

Foto 3 zeigt das isolierte linke Vorhofpräparat mit Haken, die zum Einhängen in die Versuchsausrüstung benötigt werden.

B Fotografie sowie schematische Darstellung der Versuchsausrüstung für isometrische Kontraktionsmessungen: Die Versuchsausrüstung besteht aus einem doppelwandigen Glasgefäß, das ein mit Tyrodelösung gefülltes Organbad enthält. Es wird über ein Wasserbad auf 37° C erwärmt und kontinuierlich mit Carbogen begast. Das isolierte linke Vorhofpräparat befindet sich zwischen den zwei Reizelektroden, welche dieses elektrisch mit einer Frequenz von 1 Hz reizen. Die Kontraktion des über Haken befestigten Vorhofpräparats wird über einen Kraftaufnehmer, der über einen Brückenverstärker mit einer digitalisierenden Hardware verbunden ist, aufgezeichnet und auf einem Computerbildschirm dargestellt.

3.4.2 Vorbereitung des Versuchs

Zunächst wurde die Tyrode-Lösung hergestellt. Dazu wurden 40 ml der Stammlösung I, 38 ml der Stammlösung II und 20 ml der Stammlösung III mit ungefähr 800 ml bidestilliertem Wasser in ein 1000 ml-Gefäß gegeben, welches in einem Wasserbad durchgehend auf 37° erwärmt wurde. Dieses Gemisch wurde dann für mindestens 10 Minuten mit Carbogen begast, um eine pH-Wert-Verschiebung zu erreichen. Danach wurden 0,8 ml der Stammlösung IV (Calcium), 1 g Glucose, 49,90 mg Ascorbinsäure und 19,00 mg EDTA hinzugefügt. Die Lösung wurde mit Bidest auf 1000 ml aufgefüllt und gut vermischt. Die Begasung mit Carbogen wurde fortgesetzt.

Alle Geräte wurden mindestens 30 Minuten vor Equilibrierung eingeschaltet. Zur Equilibrierung wurde die Aufzeichnung auf 0 gesetzt. Daraufhin wurde der Transducer mit 500 mg belastet und der Referenzwert auf 5 mN gesetzt. Dies wurde für jeden der vier Channel durchgeführt und anschließend durch Abnahme des Gewichts und das damit einhergehende Zurückgehen der Anzeige auf die Nulllinie überprüft. Anschließend wurden die Doppelwandgefäße mit 10 ml der

Tyrodellösung befüllt und es wurde mit der Carbogenbegasung begonnen. Die Doppelwandgefäße wurden kontinuierlich auf 37° erwärmt (Neumann et al. 2003).

3.4.3 Narkotisierung und Entnahme des Herzens

Pro Versuch wurden eine Wildtypmaus und eine H₂-transgene Maus benötigt. Die Identität der Maus wurde mithilfe der Ohrmarkierungen überprüft. Die Maus wurde daraufhin vorsichtig aus dem Käfig genommen und gewogen. Zur Entnahme des Herzens musste eine Narkotisierung und eine Gerinnungshemmung durchgeführt werden. Die Narkose diente der Ausschaltung des Bewusstseins und des Schmerzreizes, um das Wohlbefinden des Tieres zu wahren und um eine stressbedingte Katecholaminausschüttung zu vermeiden. Die Antikoagulation beugte falsche Versuchsergebnisse durch eine mögliche Gerinnung vor. Die Gerinnungshemmung erfolgte mit einer Lösung von 5000 U/ml Heparin. Davon wurden 1000 IE, also 0,2 ml, i.p. (=intraperitoneal) injiziert. Die Narkose erfolgte mit dem Barbiturat Pentobarbital in der Konzentration 0,5g/10 ml i.p., welches gewichtsadaptiert (50-75 mg/kg Körpergewicht) dosiert wurde. Zur Verabreichung der Substanzen wurden die Tiere am Nacken und Rücken festgehalten und das vorbereitete Heparin und darauffolgend das Pentobarbital unter Aspiration in die linke Seite des Bauches injiziert. Die Tiere wurden daraufhin wieder in den Käfig gesetzt bzw. nach Bewusstseinsentrübung in die Hand genommen. Nach Bewusstseinsverlust durch die Narkose wurden die Tiere auf eine Präparierschale gelegt. Es wurden Schmerzreize gesetzt, um das Schmerzempfinden zu überprüfen und die tiefe Narkose sicherzustellen. Gab es keine Reaktion, wurden die Mäuse in einer gut beleuchteten Präparierschale fixiert. Mit einer scharfen Schere erfolgte die Eröffnung des Bauchraums und die Durchtrennung des Bauchfells. Nach unblutiger Durchtrennung des Zwerchfells folgten zwei von sternal bis axillar die Rippen durchtrennende Schnitte. Daraufhin konnte der knöcherne Thorax umgeklappt und fixiert werden und man hatte bei geöffnetem Thorax freie Sicht auf das schlagende Herz. Nun wurde das Herz isoliert, freipräpariert und unter größtmöglicher Belassung der großen Gefäße und des Aortenbogens mit einem Schnitt abgesetzt. Das schlagende Herz wurde sofort in ein kleines Gefäß, welches mit Tyrodellösung gefüllt war, getaucht. Da Blut Hormone und korpuskulare Anteile enthält, die das Versuchsergebnis beeinflussen könnten, wurde das Restblut mithilfe leichten Drucks auf das spontan kontrahierende Herz ausgewaschen und das Herz in ein anderes Gefäß mit frischer Tyrodellösung überführt (Neumann et al. 2003; Gergs et al. 2013)

3.4.4 Präparation der Vorhöfe

Das aus dem Thorax entfernte Herz wurde nun in eine vorbereitete, mit Tyrodellösung gefüllte und mit Carbogen begaste Präparierschale überführt. Nach Fixierung des Herzens am apex cordis mit einer kleinen Nadel oder Kanüle wurden mögliche am Präparat hängende Teile der Lunge oder andere Gewebe, die nicht zum Herz gehörten, abpräpariert. Der Aortenbogen wurde freipräpariert und am Herz belassen, da er als Orientierung am Herzen diente. Am Aortenbogen befand sich der linke Ventrikel und direkt davor der linke Vorhof, auf der gegenüberliegenden

Seite der rechte Vorhof. Auch ventral gelegenes Thymusgewebe konnte, wenn erhalten, als Landmarke dienen. Zuerst wurde mit einem relativ nahen Schnitt der linke Vorhof abgesetzt. Der rechte Vorhof wurde mit einem großzügigen Schnitt unter Erhaltung des unteren Teils der Vena cava superior vom rechten Ventrikel abgesetzt. Muskelreste vom Ventrikel wurden entfernt. Dabei wurde darauf geachtet, den Übergang zwischen Vorhof und Vena cava superior nicht zu verletzen, da sich dort der frequenzgebende Sinusknoten befand. Für die Verbindung der isolierten Vorhofpräparate mit dem Kraftaufnehmer, wurden kleine Metallhaken mit einer Öse verwendet. Beim Befestigen der Haken war vor allem auf den Verlauf der Struktur zu achten. Ein Haken wurde an Schnittstelle der Muskelfasern gesetzt, der andere auf der gegenüberliegenden Seite. Dabei wurde darauf geachtet beim rechten Vorhofpräparat den Sinusknoten nicht zu verletzen. Mit den beiden Haken konnten die isolierten Vorhofpräparate nun mithilfe der Ösen an eine Halterung und an den Kraftaufnehmer angebracht werden. Diese wurden dann in die Tyrodelösung getaucht, die sich im Organbad des Doppelwandgefäßes befand. Das Präparat und der Draht mussten frei hängen, um eine störungsfreie Übertragung der Kraft sicherzustellen. Es erfolgte per Krafteinstellung eine Dehnung der Präparate auf etwa 5 mN, da dies einer optimalen Vorlast gemäß der Ruhedehnungskurve entsprach. Bei den isolierten linken Vorhofpräparaten wurde nun das Reizgerät, welches auf 1 Hz (60 Schläge pro Minute) eingestellt war, eingeschaltet. Die isolierten rechten Vorhofpräparate kontrahierten aufgrund der Aktion des Sinusknotens spontan. Die Kraft jeder Kontraktion wurde aufgezeichnet und auf dem Monitor angezeigt. Jedem Versuchstier wurden ca. 1 cm der Schwanzspitze entfernt und in einem mit Datum, Inhalt, Mausnummer, Name der Versuchsausführenden und genetischem Status der Maus beschrifteten Eppendorfröhrchen im flüssigen Stickstoff eingefroren, um gegebenenfalls eine erneute Genotypisierung durchführen zu können. Das Restherz, aus den zwei Ventrikeln bestehend, wurde mit einer Milligrammwaage gewogen, mit einer speziellen Zange plattgedrückt und dann ebenfalls in einem vorbereiteten Röhrchen eingefroren. Es wurden abwechselnd WT und H₂-TG zuerst präpariert, um eine mögliche Beeinflussung des Experiments der, durch die Präparation der zweiten Maus bedingten, zeitlichen Latenz bis zum Einhängen der zweiten Präparate zu minimieren. Ebenso wurde das Doppelwandgefäß zwischen WT und H₂-TG bei den Versuchen variiert, um systematischen Fehlern vorzubeugen (Neumann et al. 2003; Gergs et al. 2013).

3.5 Versuchsdurchführung

Pro Versuch wurden jeweils ein linkes und ein rechtes isoliertes Vorhofpräparat eines Wildtypen sowie einer Histamin-H₂-transgenen Maus in die vier Doppelwandgefäße eingehängt. Die vier Präparate wurden mindestens 30 Minuten äquilibriert. Dabei wurde alle 10 Minuten und 3-5-mal die Tyrodelösung des Organbads abgelassen und dann wieder 10 ml der Tyrodelösung dazugegeben. Die Vorspannung bei 5 mN wurde zwischendurch kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Sobald sich die Kontraktionskraft und die Frequenz stabilisiert hatten, konnte mit den Versuchen begonnen werden. Bei einer Kontraktionskraft von unter 1,5 mN (linkes Vorhofpräparat) und bei starken Arrhythmien ohne rhythmische Frequenzabschnitte sowie einer

Spontanfrequenz von unter 200 (rechtes Vorhofpräparat) wurde von einer Schädigung des Präparats ausgegangen und dieses von der Auswertung ausgeschlossen. Die Versuche begannen mit einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve (=KWK) von Histamin 1 nM bis 1 μ M in 10er Schritten (1 nM; 3 nM; 10 nM; 30 nM; 0,1 μ M; 0,3 μ M; 1 μ M). Über eine akzessorische Öffnung konnten Substanzen in das Doppelwandgefäß pipettiert werden, ohne mit dem Präparat in Berührung zu kommen. Histamin wurde jeweils inkubiert bis ein Wirkungsplateau zu sehen war, jedoch mindestens 2 Minuten. Nach der ersten Histamin-KWK begann das Auswaschen von Histamin indem 30 Minuten lang alle 10 Minuten die Tyrode des Organbads mit frischer Tyrode ausgewechselt wurde. Es folgte je nach Versuchsreihe die Zugabe eines Phosphodiesterasehemmers, die jeweils mindestens 5 Minuten inkubiert wurden, eine Kombination aus Phosphodiesterasehemmern, die nacheinander gegeben wurden oder eine Kontroll-Versuchsreihe ohne PDE-Hemmer. Danach folgte erneuert eine Histamin-KWK von Histamin 1 nM bis 1 μ M. Nach Beendigung der zweiten Histamin KWK wurde bei manchen Versuchsreihen mindestens eine Probe der isolierten linken Vorhofpräparate eingefroren, um in Zukunft biochemische Untersuchungen, wie eine Messung der Phospholamban-Phosphorylierung, durchführen zu können. Bei den isolierten rechten Vorhofpräparaten sowie dem nicht nach der zweiten KWK eingefrorenen linken Vorhofpräparaten wurde das Versuchsprotokoll wie geplant fortgesetzt. Es schloss sich ein erneutes 30-minütiges Auswaschen des Histamins und der PDE-Hemmer an, die das dreimalige Wechseln des Organbads mit 10 ml frischer Tyrodelösung umfasste. Zum Abschluss des Versuchs wurde eine Isoprenalin-KWK von 1 nM bis 1 μ M in 10er Schritten (1 nM; 3 nM; 10 nM; 30 nM; 0,1 μ M; 0,3 μ M; 1 μ M) durchgeführt. Nach Beendigung der KWK wurden die Präparate in gekennzeichneten Eppendorfbehältern in flüssigem Stickstoff und später in einem Gefrierschrank eingefroren. Isoprenalin wurde inkubiert bis ein Wirkungsplateau zu sehen war, jedoch mindestens 2 Minuten. Als PDE-Hemmstoffe wurden der PDE4-Hemmer Rolipram (0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M), der PDE2-Hemmer EHNA (1 μ M), der PDE3-Hemmer Cilostamid (1 μ M) sowie der unselektive PDE-Hemmer IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin; 10 μ M) verwendet (Abb. 4) (Neumann et al. 2019).

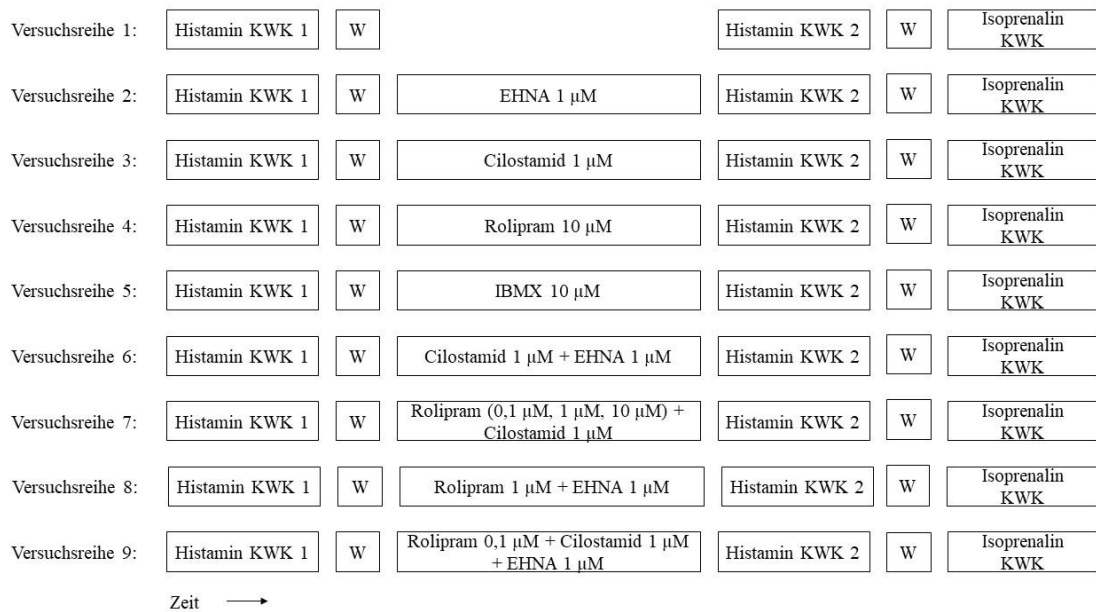


Abb. 4: Schematische Darstellung der verschiedenen Versuchsreihen

Schematische Darstellung des Versuchsablaufs, der Reihenfolge der Substanzgabe und der Konzentrationen der PDE-Hemmer. W=Auswaschen der Substanzen, indem 30 Minuten lang alle 10 Minuten die Tyrode des Organbads mit frischer Tyrode ersetzt wurde. Sowohl die Histamin-KWKs als auch die Isoprenalin-KWK wird in 10er Schritten von 1 nM bis 1 μ M durchgeführt. *Erythro*-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin-hydrochlorid (EHNA); 3-isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX); Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK)

3.6 Versuchsauswertung und Statistik

Mithilfe der Software LabChart Pro und LabChart Reader v.8.1.13 19.11.2018 von ADInstruments, Sidney, Australien wurden die Kontraktionen aufgezeichnet, gespeichert und im Anschluss ausgewertet. Die Kontraktionskraft, Anspannungszeit ($=t_1$), Erschlaffungszeit ($=t_2$), maximale Anstiegsgeschwindigkeit ($=dF/dT_{max}$) und minimale Anstiegsgeschwindigkeit ($=dF/dT_{min}$) wurden am isolierten linken Vorhofpräparat ausgewertet. Für die Bestimmung der Frequenz und der Prävalenz von Arrhythmien diente das isolierte rechte Vorhofpräparat. Alle Werte wurden mithilfe der LabChart Software bestimmt und sofort in eine Excel-Tabelle (Microsoft Excel) überführt. Die Kontraktionskraft wurde unter Markierung eines Abschnitts des Wirkungsplateaus aus der Differenz zwischen der durchschnittlich entwickelten diastolischen und systolischen Kontraktionskraft in mN bestimmt und der Mittelwert gebildet. t_1 und t_2 wurden mit der Höchstwertanalyse gemessen. Dafür wurden bei t_1 90% der Zeit bis zum Erreichen des Höchstwerts und bei t_2 90% ab dem Erreichen des Höchstwerts einer Einzelkontraktion in ms erfasst und dann ebenfalls der Mittelwert bestimmt. dF/dT_{max} und dF/dT_{min} wurden ebenfalls mit der Höchstwertanalyse bestimmt und in mN/ms angegeben. Die Frequenzmessung fand unter der Markierung einer rhythmischen Kontraktionsfolge mit der durchschnittlichen Schlagrate in beats per minutes (bpm) statt. Die Prävalenz von Arrhythmien wurde direkt in die Excel-Tabelle übertragen. Bei der Kraft- und Frequenzauswertung wurden jeweils alle Werte der einzelnen Konzentrationen der KWKs sowie eine vorangegangene Kontrollkonzentration berücksichtigt.

Bei t_1 und t_2 , dF/dT_{\max} , dF/dT_{\min} und den Arrhythmien wurden lediglich die Kontroll- und Höchstwerte einer KWK sowie die Werte nach Zugabe der PDE-Hemmer ausgewertet.

Zur statistischen Auswertung und zur Erstellung von Diagrammen wurde das Programm GraphPad Prism 5.0 für Windows, GraphPad Software, Inc, San Diego, USA verwendet. Es wurden je nach Fragestellung unverbundene oder verbundene t-tests nach Student durchgeführt. Für den ersten signifikanten Effekt sowie dF/dT_{\max} und dF/dT_{\min} wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Bonferroni Posttest durchgeführt. Die Arrhythmien wurden mit dem Fisher-Test ausgewertet. Außerdem wurden für Kontraktionskraft und Frequenz jeweils EC_{50} -Werte der Histamin- und Isoprenalin-KWKs berechnet. Der EC_{50} -Wert beschreibt die mittlere effektive Konzentration einer Substanz, also die Konzentration bei der die halbmaximale Wirkung des Gesamteffekts eintritt. Sie diene als ein Marker für die Sensitivität der isolierten Vorhofpräparate gegenüber Histamin und Isoprenalin. Der EC_{50} -Wert wurde als negativer dekadischer Logarithmus angegeben ($-\log EC_{50}$).

Die Anzahl der Versuche wurde mit n bezeichnet. Ein Ergebnis wurde als signifikant gewertet, wenn das Signifikanzniveau von $p < 0.05$ erreicht wurde. Die Daten wurden jeweils als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler (SEM) angegeben (Neumann et al. 2019).

4 Ergebnisse

4.1 Generierung des Tiermodells

Eine phänotypische oder verhaltensgebundene Unterscheidung der Versuchstiere war nicht gegeben. Auch die entnommenen Herzen wiesen bei der Inspektion keine Unterschiede oder Anomalien auf. Zur Differenzierung zwischen Histamin-H₂-transgenen (=H₂-TG) und Wildtypen (=WT) wurde deshalb vor den Kontraktionsversuchen eine Genotypisierung durchgeführt. Die Genotypisierung bestand aus der DNA-Extraktion aus kleinen Stücken des Schwanzes, einer PCR und einer darauffolgenden Agarosegelelektrophorese. Im Gegensatz zu WT konnte bei H₂-TG eine Bande bei 555 bp in der Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden. Insgesamt wurden 69 WT und 71 H₂-TG des Stammes CD1 verwendet. Das Verhältnis männlicher zu weiblicher Tiere war weitestgehend ausgeglichen (n=75 weibliche Tiere vs. n=65 männliche Tiere). Die Tiere hatten ein durchschnittliches Gewicht von $37,9 \pm 0,5$ g, wobei es keinen Unterschied zwischen WT ($38,2 \pm 0,7$ g) und H₂-TG ($37,7 \pm 0,8$ g) gab. Das Durchschnittsalter der Tiere am Versuchstag betrug 155 ± 3 Tagen und unterschied sich zwischen WT (152 ± 3 d) und deren H₂-TG-Geschwistertieren (157 ± 5 d) nicht.

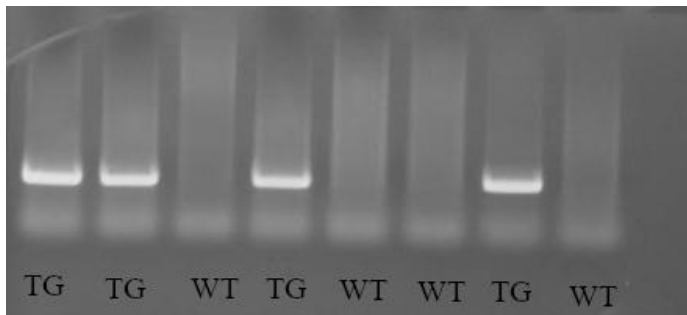


Abb. 5: Genotypisierung der Versuchstiere

Exemplarisch ein Beispiel einer Agarose-Gelelektrophorese zur Genotypisierung von H₂-transgenen Mäusen (H₂-TG) und Wildtypen (WT). Zuerst wurde die DNA aus Schwanzspitzen extrahiert und mithilfe einer PCR-Analyse amplifiziert. Bei H₂-TG, befand sich eine Bande bei 555 bp, die bei WT nicht nachzuweisen war.

4.2 Einfluss des Histamin-H₂-Rezeptors auf die Kontrollbedingungen

Um den Einfluss des Histamin-H₂-Rezeptors auf die Kontrollbedingungen zu analysieren, wurden die Ausgangswerte von WT und H₂-TG verglichen, bevor Histamin oder ein PDE-Hemmer inkubiert wurde. Dazu wurde die Kontraktionskraft in mN, die Frequenz in bpm, die absolute Anzahl der Arrhythmien sowie Anspannungszeit (t_1) und Erschlaffungszeit (t_2) in ms und maximale Anstiegsgeschwindigkeit (dF/dT_{max}) und minimale Anstiegsgeschwindigkeit (dF/dT_{min}) in mN/ms gemessen. Die Ausgangskraft ohne Zugabe von Substanzen betrug bei WT $4,36 \pm 0,21$ mN (n=68) und bei H₂-TG $3,99 \pm 0,18$ mN (n=71). Sowohl bei WT als auch bei H₂-TG war die Kontraktionskraft von männlichen Tieren gegenüber der Kontraktionskraft von weiblichen Tieren erhöht. Bei WT betrug die Ausgangskraft der männlichen Tiere $5,22 \pm 0,28$ mN (n=34), im Vergleich zu $3,50 \pm 0,23$ mN (n=34) bei weiblichen Tieren ($p < 0,05$). Die

männlichen H₂-TG isolierten linken Vorhofpräparate schlugen unter Kontrollbedingungen mit einer Kontraktionskraft von $4,60 \pm 0,26$ mN (n=31) und die weiblichen H₂-TG linken Vorhofpräparate mit $3,53 \pm 0,23$ mN (n=40), wobei auch hier eine höhere Kontraktionskraft bei männlichen Tieren gemessen wurde ($p < 0,05$). Die Grundfrequenz der H₂-transgenen rechten isolierten Vorhofpräparate betrug 353 ± 8 bpm (n=59) und der WT 325 ± 7 bpm (n=57). Damit war die Ausgangsfrequenz bei H₂-TG deutlich erhöht gegenüber der Frequenz der WT ($p < 0,05$). Die Prävalenz von Arrhythmien betrug bei WT 13 (n=69) und bei H₂-TG 29 (n=71). Damit war das Vorkommen von Arrhythmien der rechten Vorhofpräparate unter Ausgangsbedingungen bei H₂-TG vermehrt im Vergleich zu WT ($p < 0,05$). Dabei zeigten sich geschlechtsabhängige Unterschiede: Bei rechten isolierten Vorhofpräparaten von H₂-TG-Weibchen zeigten 19 von 40 Tieren Arrhythmien unter Kontrollbedingungen, bei WT nur 6 von 35, womit die Prävalenz von Arrhythmien bei H₂-TG-Weibchen im Vergleich zu ihren weiblichen WT-Geschwistertieren erhöht war ($p < 0,05$). Bei männlichen WT zeigten 7 von 34 der rechten isolierten Vorhofpräparate unter Kontrollbedingungen Arrhythmien, bei den H₂-TG-Männchen 10 von 31. Die Ausgangswerte von t_1 (=Anspannungszeit) wiesen keine Unterschiede zwischen H₂-TG und WT auf. Der Mittelwert der H₂-TG betrug $13,2 \pm 0,1$ ms (n=68), der der WT $13,4 \pm 0,1$ ms (n=66). t_2 (=Erschlaffungszeit) war bei H₂-TG verkürzt im Vergleich zu WT ($p < 0,05$). Bei H₂-TG betrug die Erschlaffungszeit $32,3 \pm 0,8$ ms (n=67) und bei WT $39,1 \pm 2,3$ ms (n=66). dF/dT_{\max} unterschied sich nicht zwischen WT und H₂-TG (H₂-TG: 272 ± 12 mN/ms; n=68 vs. WT: 303 ± 14 mN/ms; n=67). Auch dF/dT_{\min} wies keinen Unterschied zwischen H₂-TG und WT auf (H₂-TG: -148 ± 7 mN/ms; n=67 vs. WT: -161 ± 8 mN/ms; n=67).

4.3 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Histamin allein

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Histamin wurde von 1 nM bis 1 μ M in Dreier-Schritten (1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 0.1 μ M, 0,3 μ M, 1 μ M) durchgeführt. Dabei zeigte sich ein positiv inotroper Effekt bei den linken isolierten Vorhofpräparaten der H₂-TG. Der positiv inotrope Effekt war von der Histaminkonzentration abhängig und zeigte einen sigmoidalen Verlauf. Bei linken isolierten Vorhofpräparaten der WT war kein positiv inotroper Effekt von Histamin messbar. In einem Originalmechanogramm ist ein typischer Kraftverlauf der KWKs von WT und H₂-TG im Vergleich zu sehen (Abb. 6). Histamin zeigte bei den H₂-transgenen rechten isolierten Mäusevorhöfen einen positiv chronotropen Effekt. Dieser Effekt zeigte einen konzentrationsabhängigen sigmoidalen Verlauf. Bei WT konnte kein Anstieg der Frequenz nachgewiesen werden. Exemplarisch zeigt Abbildung 6 einen Ausschnitt der Messungen vor der Zugabe von Histamin und bei der höchsten Histaminkonzentration (1 μ M).

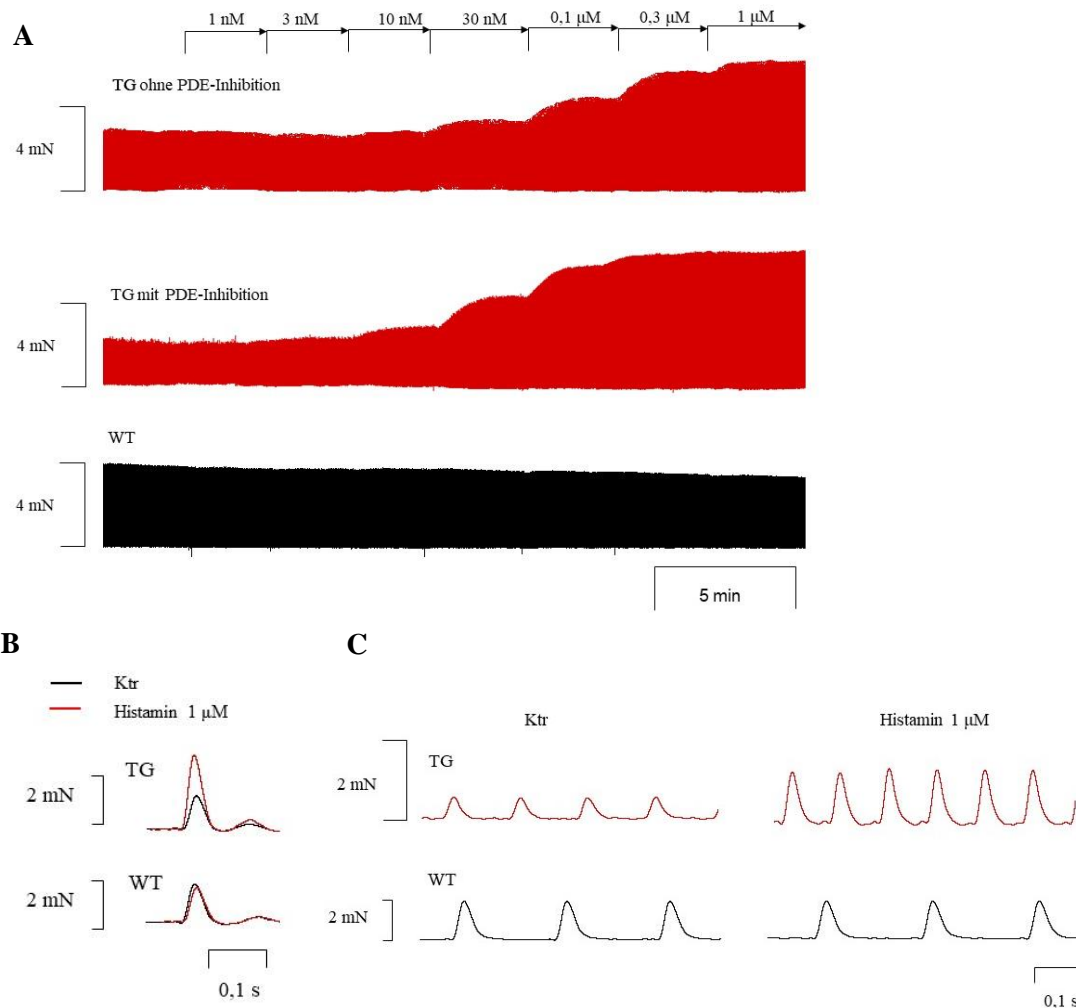


Abb. 6: Exemplarische Originalmechanogramme und Originalaufnahmen

A: Exemplarisches Originalmechanogramm der Kontraktionskraft von linken isolierten Vorhofpräparaten H_2 -überexprimierender, transgener Mäuse (TG, oben), H_2 -TG in Anwesenheit von $0,1 \mu\text{M}$ Rolipram + $1 \mu\text{M}$ Cilostamid + $1 \mu\text{M}$ EHNA (Mitte) sowie der WT-Kontrollgruppe (Wildtyp, unten). Die Aufnahmen zeigen Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Histamin in Konzentrationen von 1 nM bis $1 \mu\text{M}$. In H_2 -Rezeptor-transgenen-Tieren ist ein konzentrationsabhängiger positiv inotroper Effekt zu beobachten (oben). Die Kurve des positiv inotropen Effekts wird bei H_2 -TG bei vorheriger Zugabe $0,1 \mu\text{M}$ Rolipram + $1 \mu\text{M}$ Cilostamid + $1 \mu\text{M}$ EHNA zu niedrigeren Konzentrationen verschoben. Bei WT ist kein histaminabhängiger Effekt zu sehen. Abszisse: Zeit in Minuten (min); Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

B: Originalaufnahme von Einzelkontraktionen elektrisch stimulierter linker isolierter Vorhofpräparate von H_2 -TG (oben) und WT (unten). Gezeigt werden die Ausgangsbedingungen (Ktr) sowie die Auswirkung von der höchsten Konzentration von Histamin (Histamin $1 \mu\text{M}$) auf die Kontraktionskraft. Histamin führt bei H_2 -TG zu einem Anstieg der Kontraktionskraft, während bei WT ein positiv inotroper Effekt von Histamin ausbleibt. Abszisse: Zeit in Sekunden (s); Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

C: Originalaufnahme von Einzelkontraktionen spontan schlagender rechter isolierter Vorhofpräparate von H_2 -TG (oben) und WT (unten). Gezeigt werden die Ausgangsbedingungen (Ktr) sowie die Auswirkung der höchsten Histaminkonzentration ($1 \mu\text{M}$). Es ist unter Kontrollbedingungen eine erhöhte Schlagfrequenz von H_2 -TG im Vergleich zu WT zu beobachten. Histamin führt bei H_2 -TG zu einem Anstieg der Frequenz, während bei WT ein positiv chronotroper Effekt von Histamin ausbleibt. Abszisse: Zeit in Sekunden (s); Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

Die Auswertung aller Versuche in Gegenwart von Histamin ohne Zugabe eines PDE- Hemmstoffs zeigte bei H_2 -TG eine Kraftzunahme der linken isolierten Vorhofpräparate von $3,96 \pm 0,18 \text{ mN}$ ($n=64$) vor Zugabe von Histamin, auf $8,83 \pm 0,30 \text{ mN}$ ($n=64$) bei einer Histaminkonzentration

von 1 μM . Bei WT gab es keinen positiv inotropen Effekt (Abb. 7). Die Kontraktionskraft der WT vor Zugabe von Histamin betrug $4,34 \pm 0,22 \text{ mN}$ ($n=62$) und die Kontraktionskraft bei einer Konzentration von 1 μM betrug $3,85 \pm 0,20 \text{ mN}$ ($n=62$).

Die Anspannungszeit (t_1) sank bei H₂-TG unter Histamin von $13,2 \pm 0,1 \text{ ms}$ ($n=68$) auf $12,2 \pm 0,1 \text{ ms}$ ($n=68$; $p < 0,05$). Bei WT-Tieren hingegen stieg t_1 von $13,4 \pm 0,1 \text{ ms}$ ($n=66$) auf $13,6 \pm 0,1 \text{ ms}$ ($n=66$; $p < 0,05$) an. Bei H₂-TG nahm die Relaxationszeit ($=t_2$) unter Histamin von $32,3 \pm 0,8 \text{ ms}$ ($n=67$) auf $27,7 \pm 0,4 \text{ ms}$ ($n=67$; $p < 0,05$) ab. Die WT-Tiere zeigten keine Histamin-abhängigen Veränderungen der Relaxationszeit (Ktr 1. Effekt: $33,6 \pm 0,7 \text{ ms}$; $n=65$ vs. His 1 μM : $33,4 \pm 0,7 \text{ ms}$; $n=65$). dF/dT_{max} stieg bei H₂-TG beim ersten Histamineffekt von $272 \pm 12 \text{ mN/ms}$ ($n=68$) auf $648 \pm 19 \text{ mN/ms}$ ($n=68$) an ($p < 0,05$). Bei WT sank dF/dT_{max} von $303 \pm 14 \text{ mN/ms}$ ($n=67$) auf $268 \pm 13 \text{ mN/ms}$ ($n=67$; $p < 0,05$). Beim WT war die Kontrolle von dF/dT_{max} vor der zweiten Histamin-KWK ebenfalls kleiner ($230 \pm 13 \text{ mN/ms}$; $n=63$; $p < 0,05$) als vor der ersten KWK. dF/dT_{min} stieg bei H₂-TG während der ersten Histaminkurve von $-148 \pm 7 \text{ mN/ms}$ ($n=67$) auf $-352 \pm 11 \text{ mN/ms}$ ($n=67$; $p < 0,05$) an. Bei WT betrug der Ausgangspunkt von dF/dT_{min} bei $-161 \pm 8 \text{ mN/ms}$ ($n=67$). Dieser sank unter Histamin auf $-144 \pm 7 \text{ mN/ms}$ ($n=67$; $p < 0,05$) ab. Der Ausgangspunkt vor der zweiten Histamin-KWK war bei WT ebenfalls signifikant geringer (-129 ± 7 ; $n=63$; $p < 0,05$) als vor der ersten Histamin-KWK.

Bei der Auswertung aller Versuche in Gegenwart von Histamin ohne Zugabe von PDE-Hemmern zeigten H₂-transgene rechte Vorhofpräparate eine Zunahme der spontanen Schlagfrequenz von $345 \pm 10 \text{ bpm}$ ($n=51$) unter Kontrollbedingungen auf $465 \pm 11 \text{ bpm}$ ($n=51$) bei der höchsten Histaminkonzentration von 1 μM . Bei WT kam es unter Histamin nicht zu einem positiv chronotropen Effekt (Abb. 7). Die Schlagfrequenz betrug unter Kontrollbedingungen $322 \pm 7 \text{ bpm}$ ($n=51$) und bei einer Konzentration von 1 μM Histamin $310 \pm 8 \text{ bpm}$ ($n=51$). Die Ausgangsfrequenz betrug vor der zweiten Histamin-KWK bei H₂-TG $309 \pm 12 \text{ bpm}$ ($n=43$). Damit verringerte sich die Schlagfrequenz im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen vor der ersten Histamingabe ($p < 0,05$). Bei WT verringerte sich die Schlagfrequenz ebenfalls ($p < 0,05$). Sie betrug vor der zweiten Histamin-KWK $280 \pm 8 \text{ bpm}$ ($n=49$). Die Prävalenz der Arrhythmien am isolierten rechten Vorhofpräparat betrug bei WT vor der Gabe von Histamin 13 und bei der höchsten Konzentration von Histamin 11 ($n=69$). Bei H₂-TG gab es 29 Arrhythmien unter Kontrollbedingungen, nach der Gabe der höchsten Histaminkonzentration waren es 38 ($n=71$).

Der Mittelwert des EC₅₀-Werts (die mittlere effektive Konzentration einer Substanz) aller Histamin-KWKs der H₂-transgenen linken isolierten Vorhofpräparate betrug $-7,07 \pm 0,04 \text{ M}$ ($n=63$). Der mittlere EC₅₀-Wert von Histamin der H₂-transgenen rechten isolierten Vorhofpräparate betrug $-7,13 \pm 0,06 \text{ M}$ ($n=43$). Ein t-test zwischen den EC₅₀-Werten der linken und rechten H₂-transgenen isolierten Vorhofpräparate zeigte keinen Unterschied in der Sensitivität gegenüber Histamin.

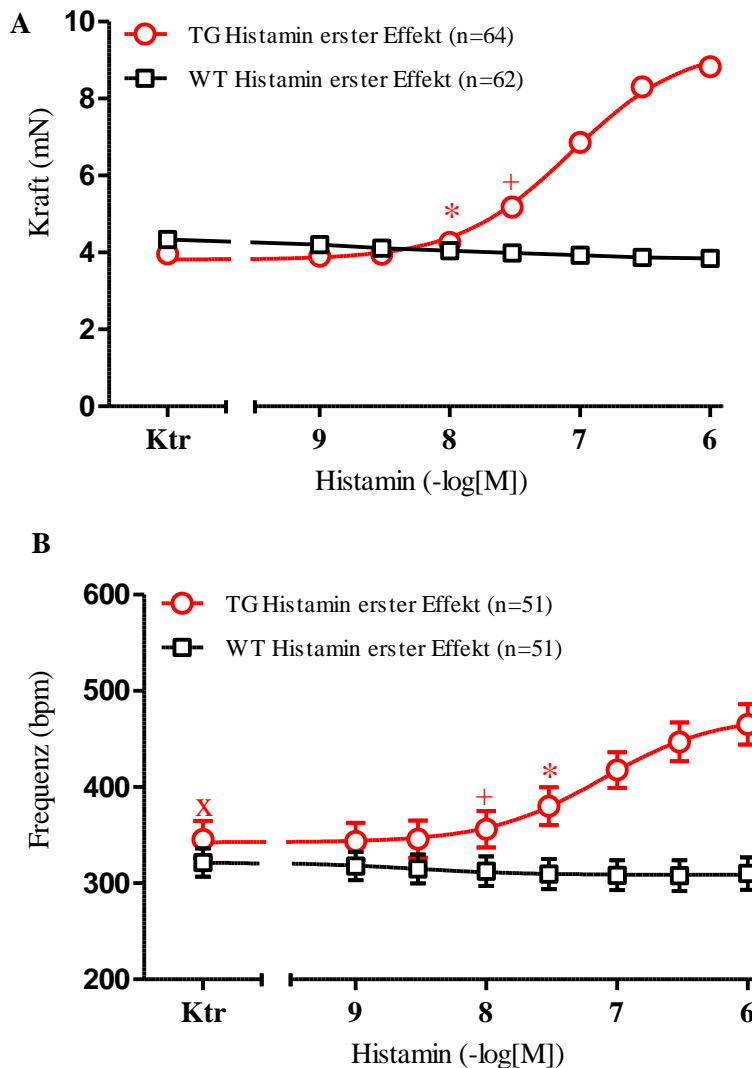


Abb. 7: Auswertung aller Histamin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven

(A) Dargestellt sind die Effekte von Histamin auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker isolierter Vorhofpräparate von H_2 -Rezeptor überexprimierenden Mäusen (H_2 -TG, Kreise) und deren Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr = Kontraktionskraft vor Histamingabe; die Kontraktionskraft ist auf der Ordinate in Millinewton (mN) angegeben. Die Abszisse zeigt den negativen dekadischen Logarithmus der Histaminkonzentration.

(B) Dargestellt ist der Effekt auf die Frequenz in beats per minute (=bpm) von spontan schlagenden rechten isolierten Vorhofpräparaten von H_2 -TG (Kreise) und WT (Quadrate). Auf der Ordinate ist die Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min) aufgetragen. Ktr = Ausgangsfrequenz vor der Gabe von Histamin

n = Anzahl der Experimente * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr ($p < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($p < 0,05$), x = signifikanter Unterschied zwischen H_2 -TG Ktr vs. WT Ktr ($p < 0,05$)

Die erste Versuchsreihe umfasste die Inkubation der isolierten Vorhofpräparate mit Histamin von 1 nM bis 1 μ M und nach Auswaschen eine zweite Kontroll-KWK von Histamin ebenfalls von 1 nM bis 1 μ M. Daraufhin folgte eine Isoprenalin-KWK von 1 nM bis 1 μ M, die ebenfalls nach Auswaschen erfolgte (Abb. 8). Der Kraftausgangswert H_2 -TG vor der jeweiligen Zugabe von Histamin zeigte keine Unterschiede (Kontrolle vor erster Histamin-KWK: $3,51 \pm 0,49$ mN; n=6;

Kontrolle vor zweiter Histamin-KWK: $3,65 \pm 0,58$ mN; n=6; Kontrolle vor Isoprenalin-KWK: $3,67 \pm 0,60$ mN; n=6). Die maximal entwickelte Kontraktionskraft der ersten ($7,72 \pm 1,15$ mN; n=6) und zweiten Histamin KWK ($7,62 \pm 1,10$ mN; n=6) zeigte im Vergleich keine Unterschiede. Die Kontraktionskraft der H₂-TG bei der Isoprenalinkonzentration von 1 μ M betrug $7,13 \pm 1,07$ mN; n=6. Damit war die Kontraktionskraft bei der Isoprenalinkonzentration von 1 μ M gegenüber der Kontraktionskraft bei Histaminkonzentration von 1 μ M vermindert ($p < 0,05$).

Der EC₅₀-Wert der ersten Histamin-KWK betrug $-6,98 \pm 0,14$ M (n=6). Beim zweiten Effekt der H₂-transgenen Histaminkurve betrug der EC₅₀-Wert $-6,92 \pm 0,08$ M (n=6). Dabei wiesen die beiden EC₅₀-Werte der beiden H₂-transgenen KWKs keine Unterschiede auf. Bei den WT gab es weder bei der ersten Histamin-KWK noch bei der zweiten Konzentrationswirkungskurve von Histamin einen positiv inotropen Effekt. Bei der Inkubation mit Isoprenalin konnte auch bei WT ein positiv inotroper Effekt nachgewiesen werden. Der EC₅₀-Wert der Isoprenalin-KWK betrug bei H₂-TG $-7,18 \pm 0,08$ M (n=5) und bei WT $-7,45 \pm 0,09$ M (n=8).

Sowohl bei t₁ als auch bei t₂ unterschieden sich die Maximalwerte der ersten und zweiten Histaminkurven bei H₂-TG nicht voneinander. Bei WT veränderte sich t₁ und t₂ unter der ersten Histamingabe nicht (Tabelle 3+4). Unter der zweiten Histamingabe blieb t₁ ebenfalls gleich, t₂ verkürzte sich leicht (Tabelle 3+4).

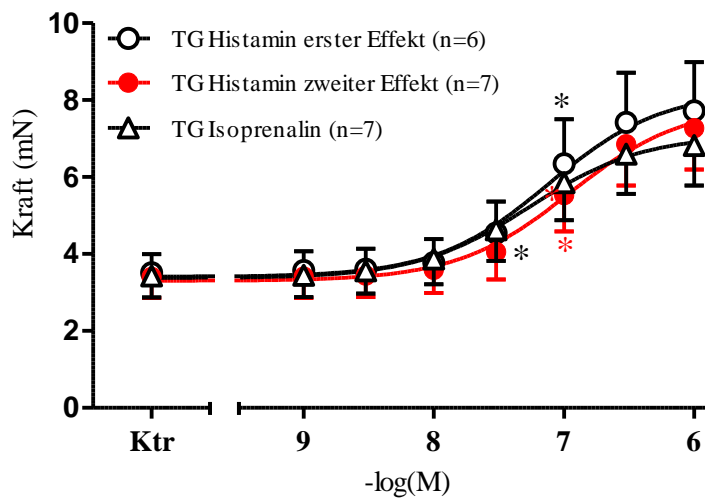
Sowohl WT als auch H₂-TG reagierten mit einer Verkürzung von t₁ bei der Gabe von Isoprenalin (t₁ H₂-TG Ktr: $12,4 \pm 0,1$ ms, n=7; vs. t₁ H₂-TG Iso 1 μ M: $11,1 \pm 0,1$ ms, n=7; $p < 0,05$; t₁ WT Ktr: $12,6 \pm 0,4$ ms, n=8 vs. t₁ WT Iso 1 μ M: $11,4 \pm 0,4$ ms, n=8; $p < 0,05$). Auch bei t₂ kam es unter Isoprenalingabe zu einer Verkürzung bei H₂-TG und WT (t₂ H₂-TG Ktr: $34,1 \pm 1,3$ ms, n=7 vs. t₂ H₂-TG Iso 1 μ M: $28,8 \pm 1,9$ ms, n=7; $p < 0,05$; t₂ WT Ktr: $32,4 \pm 1,7$ ms, n=8 vs. t₂ WT Iso 1 μ M: $25,0 \pm 1,1$ ms, n=8; $p < 0,05$).

dF/dT_{max} und dF/dT_{min} stieg bei H₂-TG unter Histamingabe bei beiden KWKs deutlich an (Tabelle 5+6). Der Effekt von Histamin in der ersten und zweiten KWK unterschied sich bei H₂-TG in Bezug auf dF/dT_{max} und dF/dT_{min} bei einer Histaminkonzentration von 1 μ M nicht (Tabelle 5+6). WT reagierten weder bei der ersten Histamin-KWK noch bei der zweiten mit einem Anstieg von dF/dT_{max} und dF/dT_{min} (Tabelle 5+6). Bei WT zeigte Isoprenalin einen Anstieg von dF/dT_{max} und dF/dT_{min}. Bei H₂-TG stieg dF/dT_{max} unter Isoprenalingabe an, bei dF/dT_{min} war kein Anstieg zu verzeichnen.

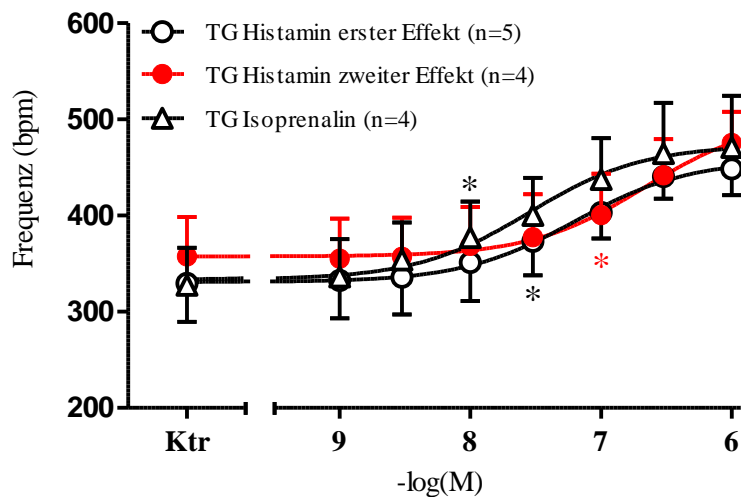
Die Frequenz des rechten isolierten Vorhofpräparats stieg bei H₂-TG sowohl bei der ersten als auch der zweiten KWK von Histamin an (Abb. 8). Die Ausgangsfrequenz vor der ersten Histamin-KWK betrug bei H₂-TG 340 ± 50 bpm (n=4), vor der zweiten Histamin-KWK 356 ± 44 (n=3) und vor der Isoprenalin-KWK 328 ± 39 bpm (n=4). Damit lag kein Unterschied der H₂-transgenen Ausgangsfrequenzen vor den jeweiligen KWKs vor. Die Werte für die Frequenz bei H₂-TG bei der Konzentration von 1 μ M unterschieden sich nicht zwischen der ersten Histamin-KWK (446 ± 35 bpm; n=4), der zweiten Histamin-KWK (463 ± 41 bpm; n=4) und der Isoprenalin-KWK (471 ± 54 bpm; n=4). Der EC₅₀-Wert für Isoprenalin lag bei H₂-transgenen

rechten isolierten Vorhofpräparaten für die Chronotropie bei $-7,71 \pm 0,23$ M (n=4). Es gab weder bei den beiden Histamin-KWKs noch bei Isoprenalin einen Unterschied zwischen den EC_{50} -Werten der H_2 -transgenen rechten und der H_2 -transgenen linken isolierten Vorhofpräparate. Die rechten isolierten Vorhofpräparate der WT-Mäuse reagierten nicht auf die Gabe von Histamin. Bei der Isoprenalin-KWK zeigten auch die WT einen positiv chronotropen Effekt. Der EC_{50} -Wert für die Frequenz der WT bei Isoprenalingabe war $-8,02 \pm 0,16$ M (n=4). Es zeigte sich weder bei Inotropie noch Chronotropie ein Unterschied der EC_{50} -Werte zwischen WT und H_2 -TG bezüglich der Isoprenalinsensitivität.

A



B



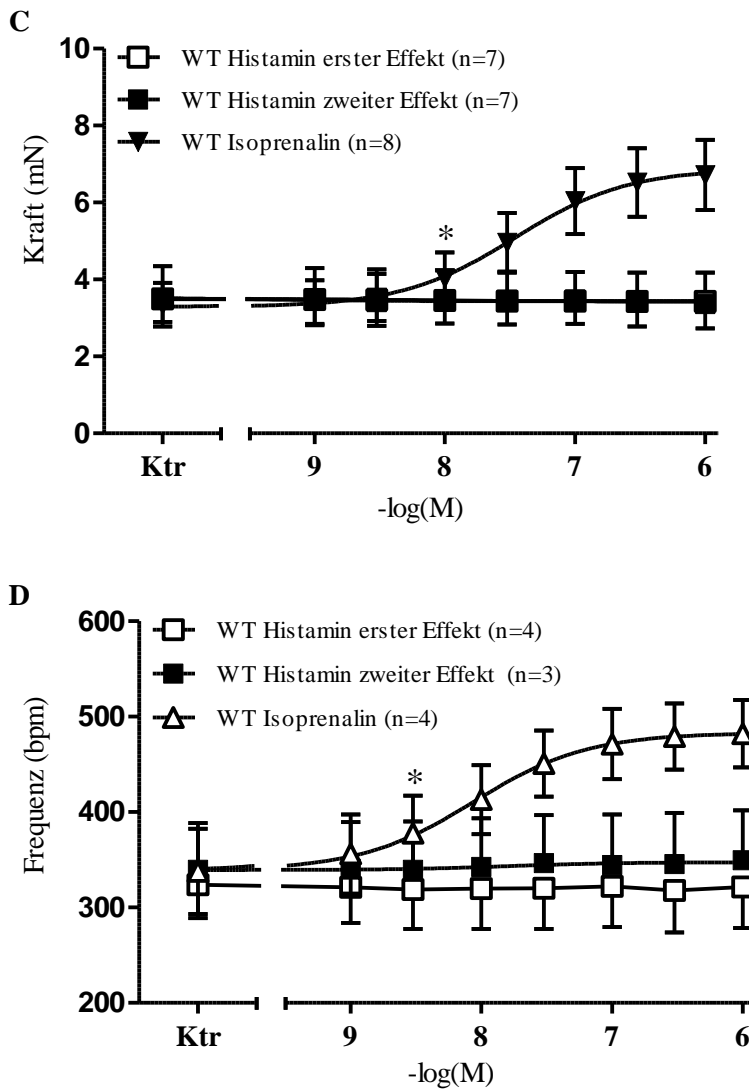


Abb. 8: Histamin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven ohne PDE-Hemmer + Isoprenalin-Wirkung

(A) Erster und zweiter Effekt von Histamin (Kreise) ohne Zugabe von PDE-Hemmstoffen sowie Effekt von Isoprenalin (Dreiecke) auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker isolierter Vorhofpräparate von H_2 -Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (H_2 -TG) Ktr = basale Kontraktionskraft. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Erster und zweiter Effekt von Histamin (Kreise) ohne Zugabe von PDE-Hemmstoffen sowie Effekt von Isoprenalin (Dreiecke) auf die Frequenz (bpm) in spontan schlagenden rechten isolierten Vorhofpräparaten von H_2 -TG. Ktr = basale Schlagfrequenz. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

(C) Erster und zweiter Effekt von Histamin (Quadrate) ohne Zugabe von PDE-Hemmstoffen sowie Effekt von Isoprenalin (Dreiecke) auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker isolierter Vorhofpräparate von WT. Ktr = basale Kontraktionskraft. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(D) Erster und zweiter Effekt von Histamin (Quadrate) ohne Zugabe von PDE-Hemmstoffen sowie Effekt von Isoprenalin (Dreiecke) auf die Frequenz (bpm) in spontan schlagenden rechten isolierten Vorhofpräparaten von WT. Ktr = basale Schlagfrequenz. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr ($p < 0,05$).

4.4 Experimente mit einzelnen PDE-Hemmstoffen

4.4.1 EHNA

Vor der zweiten Histamin-KWK wurde EHNA, ein PDE2-Hemmer, in einer Konzentration von 1 μM ins Organbad gegeben (Abb. 9). Auf die basale Kontraktionskraft ohne Zugabe von Histamin in H_2 -transgenen linken isolierten Vorhofpräparaten hatte 1 μM EHNA keinen Einfluss (H_2 -TG Ktr 1: $3,04 \pm 0,65$ mN vs. H_2 -TG Ktr 2: $3,00 \pm 0,63$ mN; n=6). Auch bei WT war nach Zugabe des PDE2-Hemmers ($4,86 \pm 0,50$ mN; n=4) im Vergleich zur Ausgangslage ($4,91 \pm 0,48$ mN; n=4) keine Veränderung der Kontraktionskraft festzustellen. Sowohl bei H_2 -transgenen rechten isolierten Vorhofpräparaten als auch bei denen von WT kam es unter Einfluss von 1 μM EHNA zu keiner Zunahme der Frequenz (H_2 -TG Ktr 1: 246 ± 30 bpm; n=5 vs. H_2 -TG Ktr 2: 267 ± 32 bpm; n=5; WT Ktr 1: 233 ± 37 bpm; n=4 vs. WT Ktr 2: 237 ± 34 bpm; n=4).

Die Zugabe von 1 μM EHNA konnte bei WT weder einen positiv inotropen noch einen positiv chronotropen Effekt unter Histamingabe hervorbringen. Eine Veränderung der Prävalenz von Arrhythmien unter Zugabe von Histamin konnte während der KWK weder beim WT noch bei H_2 -TG beobachtet werden (Tabelle 1). 1 μM EHNA verschob den EC_{50} -Wert der Kontraktionskraft des Histamins bei H_2 -TG zu höheren Konzentrationen (Tabelle 2). Bezüglich der Frequenz konnte kein Effekt der EHNA-Gabe auf den EC_{50} -Wert der H_2 -TG beobachtet werden (Tabelle 2).

Die Anspannungszeit der H_2 -transgenen linken isolierten Vorhofpräparaten wurde durch die Histamin-KWK nach 1 μM EHNA nicht verkürzt (Tabelle 3). Bei der Kontrollkurve ohne EHNA verkürzte Histamin die Anspannungszeit (Tabelle 3). Auch bei der Erschlaffungszeit gab es bei der Kontroll-KWK eine Verkürzung bei Histamin 1 μM im Vergleich zum Ausgangswert (Tabelle 4). Bei vorheriger Zugabe von 1 μM EHNA gab es wiederum keine Abnahme der Erschlaffungszeit (Tabelle 4). Bei WT kam es zu keiner Verkürzung von t_1 und t_2 bei der Histaminkurve in Anwesenheit von 1 μM EHNA (Tabelle 3+4). Die maximale Anspannungsgeschwindigkeit und die maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit zeigten bei H_2 -TG unter der Histaminkurve bei Gabe von 1 μM EHNA eine Steigerung im Vergleich zum Ausgangswert (Tabelle 5+6). Bei WT steigerte sich dF/dT_{max} und dF/dT_{min} unter Zugabe von 1 μM EHNA und Histamin nicht (Tabelle 5+6).

Die Kontraktionskraft, die bei der höchsten Histaminkonzentration gemessen wurde, konnte in H_2 -TG durch vorherige Inkubation mit 1 μM EHNA nicht zusätzlich gesteigert werden (H_2 -TG Ktr: $7,99 \pm 1,33$ mN; n=5 vs. H_2 -TG EHNA $7,71 \pm 1,33$ mN; n=5). Die Frequenz der rechten H_2 -transgenen isolierten Vorhofpräparate nach Histamin-KWK konnte im Vergleich zur Kontroll-KWK (376 ± 18 bpm; n=3) ebenfalls nicht durch Zugabe von 1 μM EHNA (344 ± 30 bpm; n=3) weiter erhöht werden. Auch bei dF/dT_{max} und dF/dT_{min} sowie t_1 und t_2 ergaben sich bei H_2 -TG keine Unterschiede der Werte zwischen der Höchstkonzentration der Kontroll-Histamin-KWK sowie der Histamin-KWK unter Gabe von 1 μM EHNA.

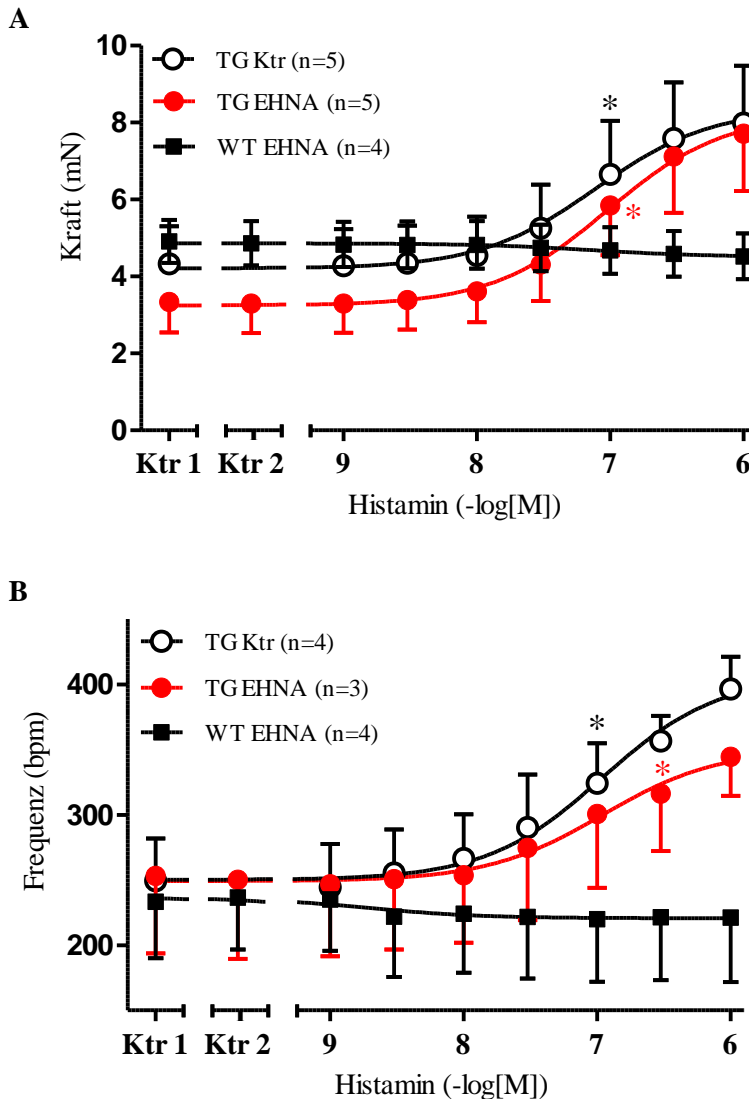


Abb. 9: EHNA

(A) Effekte von Histamin ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von $1\mu\text{M}$ *Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin- hydrochlorid* (EHNA) auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker isolierter Vorhofpräparate von H_2 -Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (H_2 -TG, Kreise) und deren Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr 1 = basale Kontraktionskraft vor EHNA-Gabe. Ktr 2 = Kontraktionskraft nach Inkubation von EHNA. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Histamineffekte ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von $1\mu\text{M}$ EHNA in spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten von H_2 -TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr 1 = Schlagfrequenz vor EHNA-Gabe. Ktr 2 = Schlagfrequenz nach Zugabe von EHNA. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr 1 ($p < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($p < 0,05$)

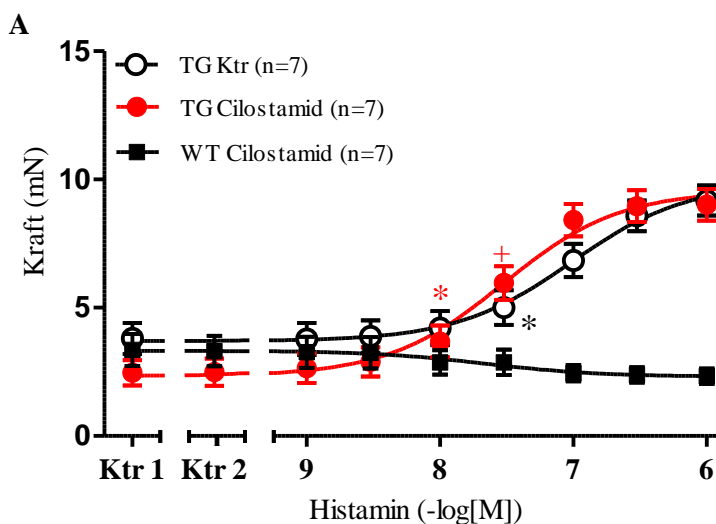
4.4.2 Cilostamid

Der Ausgangswert der Kontraktionskraft änderte sich bei H_2 -TG unter Inkubation von $1\mu\text{M}$ Cilostamid nicht (H_2 -TG Ktr 1: $2,46 \pm 0,45$ mN; $n=7$ vs. H_2 -TG Ktr 2: $2,49 \pm 0,49$ mN; $n=7$, Abb. 10). Auch bei WT kam es zu keinem Kraftanstieg (WT Ktr 1: $2,06 \pm 0,17$ mN; $n=4$ vs. WT Ktr 2: $2,09 \pm 0,22$ mN; $n=4$). Die Ausgangslage der Frequenz änderte sich unter Zugabe von Cilostamid weder bei H_2 -TG (H_2 -TG Ktr 1: 253 ± 23 bpm; $n=4$ vs. H_2 -TG Ktr 2: 255 ± 24 bpm;

n=4) noch bei WT (WT Ktr 1: 302 ± 16 bpm; n=8 vs. WT Ktr 2: 305 ± 18 bpm; n=8). Weder bei WT noch bei H₂-TG kam es unter Zugabe von 1 μ M Cilostamid zu einer Veränderung der Anspannungs- und Erschlaffungszeit (Tabelle 3+4). Auch bei der maximalen Anspannungs- und Erschlaffungsgeschwindigkeit gab es bei WT und H₂-TG keinen Unterschied der Ausgangswerte vor und nach der Inkubation von 1 μ M Cilostamid (Tabelle 5+6).

Bei der Kontraktionskraft des linken H₂-transgenen isolierten Vorhofpräparats verschob sich der EC₅₀-Wert der Histaminkurve von der Kontrollkurve zu niedrigeren Konzentrationen (Tabelle 2). Der EC₅₀-Wert der Frequenz von Histamin konnte bei H₂-TG durch vorherige Inkubation mit Cilostamid nicht verändert werden (Tabelle 2). Sowohl bezüglich der Frequenz als auch bei der Kontraktionskraft reagierten WT auch unter Einfluss von 1 μ M Cilostamid nicht auf Histamin. t₁ und t₂ verkürzten sich unter Zugabe von Cilostamid und Histamin bei H₂-TG (Tabelle 3+4). Bei WT zeigte t₁ keine Veränderung, t₂ verkürzte sich (Tabelle 3+4). Die maximale Anspannungs- und Erschlaffungsgeschwindigkeit zeigte unter Wirkung von Cilostamid bei H₂-TG eine Zunahme, bei WT keinen Effekt (Tabelle 5+6).

Die Kontraktionskraft der linken Vorhofpräparate von H₂-TG konnte durch die Zugabe von 1 μ M Cilostamid bei der höchsten Histaminkonzentration nicht zusätzlich gesteigert werden, sondern sank sogar leicht im Vergleich zum Kontrollwert (H₂-TG Ktr 1: $9,18 \pm 0,55$ mN; n=7 vs. H₂-TG Ktr 2: $9,02 \pm 0,58$ mN; n=7; p<0,05). Die Frequenz bei der höchsten Histaminkonzentration der H₂-transgenen isolierten Vorhofpräparate blieb unter Einfluss von Cilostamid im Vergleich zur Kontrolle ohne PDE-Hemmer (H₂-TG Ktr 1: 422 ± 20 bpm; n=3 vs. H₂-TG Cilostamid: 398 ± 38 bpm; n=3) gleich. Bei t₁ kam es bei H₂-TG ebenfalls zu keiner zusätzlichen Verkürzung bei der höchsten Histaminkonzentration unter Cilostamidinkubation im Vergleich zur Kontrolle. Bei t₂ der H₂-TG konnte eine zusätzliche Verkürzung auf $25,8 \pm 0,8$ ms (n=7) unter Wirkung von Cilostamid im Vergleich zur Erschlaffungszeit von $26,7 \pm 0,7$ ms (n=7) bei der Kontrollkurve festgestellt werden (p<0,05). Die Auswertungen der H₂-TG zeigten keine zusätzliche Steigerung für dF/dT_{max} und dF/dT_{min} bei der höchsten Histaminkonzentration bei Applikation von Cilostamid im Vergleich zur Kontrollkurve.



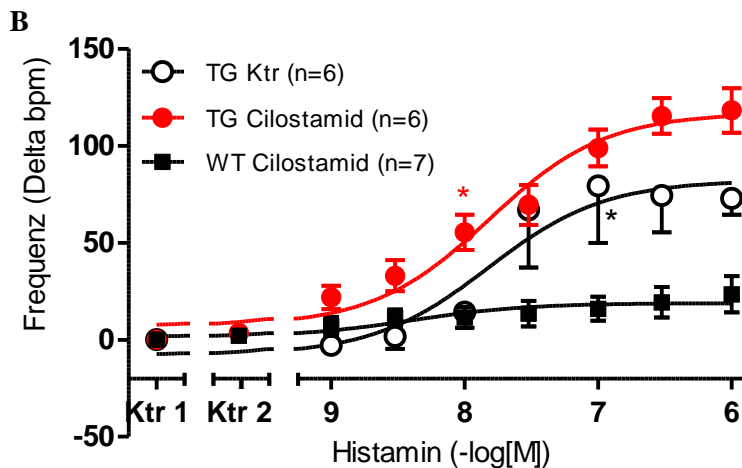


Abb. 10: Cilostamid

(A) Effekte von Histamin ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 1 μM Cilostamid auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker isolierter Vorhofpräparate von H_2 -Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (H_2 -TG, Kreise) und deren Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr 1 = basale Kontraktionskraft vor Cilostamid-Gabe. Ktr 2 = Kontraktionskraft nach Inkubation von 1 μM Cilostamid. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Histamineffekte ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 1 μM Cilostamid in spontan schlagenden rechten isolierten Vorhofpräparaten von H_2 -TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr 1 = basale Schlagfrequenz vor Cilostamid-Gabe. Ktr 2 = Schlagfrequenz nach Zugabe von 1 μM Cilostamid. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr 1 ($p < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($p < 0,05$)

4.4.3 Rolipram

Die Gabe von 10 μM Rolipram vermittelte sowohl bei H_2 -TG (H_2 -TG Ktr 1: $3,42 \pm 0,59$ mN; n=8 vs. H_2 -TG Ktr 2: $4,18 \pm 0,69$ mN; n=8; $p < 0,05$) als auch bei WT (WT Ktr 1: $2,92 \pm 0,64$ mN; n=6 vs. WT Ktr 2: $3,87 \pm 0,60$ mN; n=6; $p < 0,05$) einen positiv inotropen Effekt auf die Basalkraft (Abb. 11). Die Frequenz belief sich bei H_2 -TG bei der Kontrolle auf 335 ± 37 bpm (n=4) während sie unter Einfluss von 10 μM Rolipram 388 ± 19 bpm (n=4) betrug. Bei WT betrug der Ausgangswert 260 ± 27 bpm (n=6) und nach Gabe von 10 μM Rolipram 323 ± 24 bpm (n=6). t_1 verkürzte sich unter Roliprameinfluss im Vergleich zur Ausgangslage ohne Rolipram sowohl bei H_2 -TG als auch bei WT (Tabelle 3). Rolipram konnte keine Veränderung von t_2 bei H_2 -TG und WT bewirken (Tabelle 4). Die Anspannungs- und Erschlaffungsgeschwindigkeit wurde durch Rolipram weder beim WT noch bei H_2 -TG verändert (Tabelle 5+6).

Der EC_{50} -Wert von Histamin sank unter 10 μM Rolipram bei H_2 -TG auf $-7,57 \pm 0,06$ M (n=6) und wurde damit im Vergleich zur Kontrollgabe ($-6,97 \pm 0,09$ M; n=6) zu niedrigeren Konzentrationen verschoben ($p < 0,05$). Bei H_2 -TG der rechten Vorhofpräparate veränderte die Gabe von 10 μM Rolipram die Wirksamkeit von Histamin nicht (EC_{50} -Wert H_2 -TG Ktr: $-7,11 \pm 0,02$ M; n=4 vs. EC_{50} -Wert H_2 -TG Rolipram: $-7,23 \pm 0,1$; n=4). WT zeigten auch unter 10 μM Rolipram keinen positiv inotropen oder chronotropen Effekt (Abb. 11). Die Anspannungsgeschwindigkeit bei der höchsten Histaminkonzentration sank sowohl bei H_2 -TG

als auch WT im Vergleich zur Ausgangslage (Tabelle 3). Die Erschlaffungsgeschwindigkeit blieb bei WT und H₂-TG unverändert (Tabelle 4). Die dF/dT_{max} und dF/dT_{min} nahm bei H₂-TG unter Histamin zu, bei WT zeigten sie keine Veränderung im Vergleich zur Ausgangslage (Tabelle 5+6).

Im Vergleich zum Wert bei der höchsten Histaminkonzentration der Kontroll-KWK ($8,79 \pm 0,43$ mN; n=6) konnte die Kontraktionskraft unter Zugabe von 10 μ M Rolipram bei H₂-TG ($9,01 \pm 0,37$ mN; n=6) nicht gesteigert werden. Auch die Frequenz wurde bei der höchsten Histaminkonzentration unter Rolipramwirkung nicht zusätzlich gesteigert (H₂-TG Ktr: 504 ± 42 bpm; n=4 vs. H₂-TG Rolipram: 504 ± 44 bpm; n=4). Bei der maximalen Anspannungs- und Erschlaffungsgeschwindigkeit bei der höchsten Histaminkonzentration konnte unter 10 μ M Rolipram bei H₂-TG kein zusätzlicher Anstieg im Vergleich zur Kontrolle ohne Rolipram gezeigt werden. Die Anspannungszeit bei der höchsten Histaminkonzentration war bei H₂-TG unter 10 μ M Rolipram niedriger als bei derselbigen Kontrollkonzentration (H₂-TG Ktr: $11,6 \pm 0,2$ ms; n=7 vs. H₂-TG Rolipram: $11,50 \pm 0,17$; n=7; $p < 0,05$). t_2 zeigte keine zusätzliche Verkürzung (H₂-TG Ktr: $27,1 \pm 1,1$ ms; n=7 vs. H₂-TG Rolipram: $26,1 \pm 0,7$; n=6).

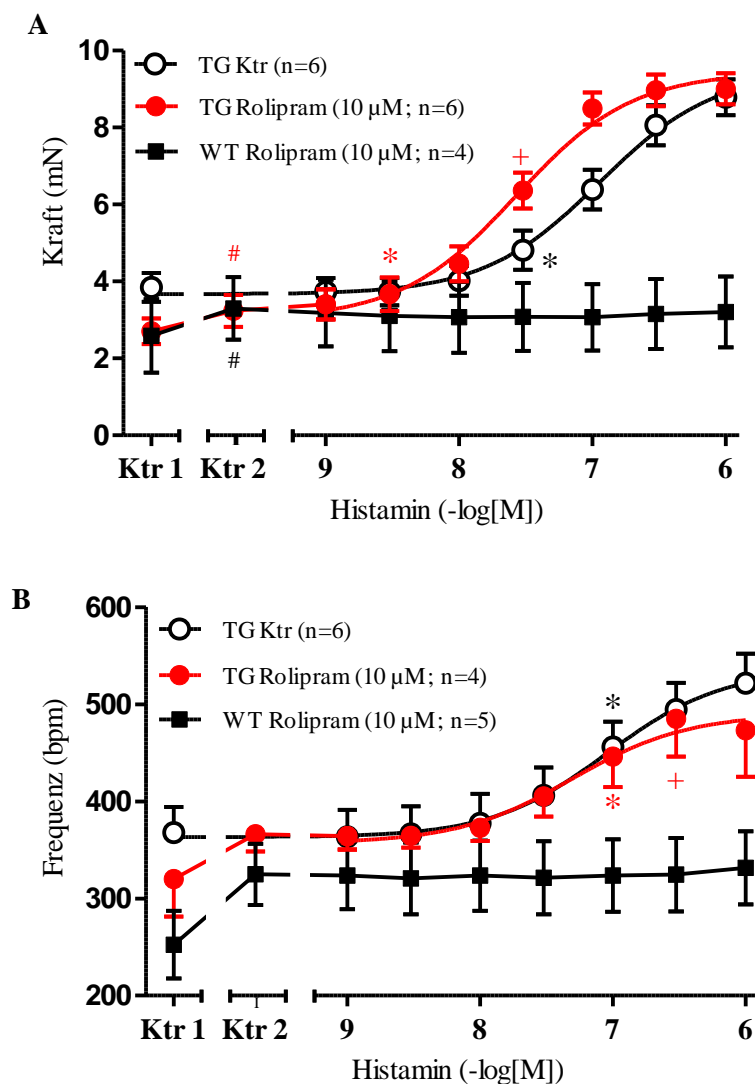


Abb. 11: Rolipram

(A) Effekte von Histamin ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 10 μM Rolipram auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker isolierter Vorhofpräparate von H_2 -Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (H_2 -TG, Kreise) und deren Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr 1 = basale Kontraktionskraft vor Rolipram-Gabe. Ktr 2 = Kontraktionskraft nach Inkubation von Rolipram. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Histamineffekte ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 10 μM Rolipram in spontan schlagenden rechten isolierten Vorhofpräparaten von H_2 -TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr 1 = basale Schlagfrequenz vor Rolipram-Gabe. Ktr 2 = Schlagfrequenz nach Zugabe von Rolipram. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr 1 ($p < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($p < 0,05$), # = signifikanter Unterschied Ktr 2 vs. Ktr 1 ($p < 0,05$)

4.4.4 IBMX

IBMX, ein unselektiver PDE-Hemmer, hatte in der Konzentration von 10 μM auf die basale Kontraktionskraft bei H_2 -transgenen linken isolierten Vorhofpräparaten keinen Einfluss (H_2 -TG Ktr 1: $2,40 \pm 0,38$ mN; n=6 vs. H_2 -TG Ktr. 2: $2,73 \pm 0,69$ mN; n=6). Bei WT stieg die Ausgangskraft nach 10 μM IBMX von $2,88 \pm 0,38$ mN (n=6) auf $3,81 \pm 0,49$ mN (n=6) an ($p < 0,05$). Bezüglich der Frequenz des rechten isolierten H_2 -TG-Vorhofpräparats unter 10 μM IBMX (H_2 -TG Ktr 1: 335 ± 37 bpm; n=4 vs. H_2 -TG Ktr 2: 388 ± 19 bpm; n=4) konnte eine Steigerung ($p < 0,05$) gezeigt werden. Bei WT war ebenfalls ein positiv chronotroper Effekt des IBMXs zu verzeichnen (WT Ktr 1: 306 ± 17 bpm; n=6 vs. WT Ktr 2: 394 ± 32 bpm; n=6; $p < 0,05$). Bei H_2 -TG hatte die Applikation von 10 μM IBMX keine Verkürzung der Anspannungszeit oder Relaxationszeit zur Folge (Tabelle 3+4). Bei WT kam es hingegen zu einer Verkürzung der basalen t_1 und t_2 (Tabelle 3+4). Die basalen dF/dT_{max} und dF/dT_{min} wurden von 10 μM IBMX weder beim WT noch bei H_2 -TG beeinflusst (Tabelle 5+6)

Der EC_{50} -Wert von Histamin bei H_2 -TG betrug für die Kontraktionskraft unter Zugabe von 10 μM IBMX $-6,97 \pm 0,11$ M (n=5) und ohne IBMX $-6,83 \pm 0,12$ M (n=5) und unterschied sich nicht voneinander. Auch beim rechten H_2 -transgenen isolierten Vorhofpräparat wies der EC_{50} -Wert unter Zugabe von 10 μM IBMX keine Unterschiede zum EC_{50} -Wert der Kontrolle auf (Tabelle 2). Bei WT war weder ein positiv inotroper noch ein positiv chronotroper Effekt bei Histamingabe nach 10 μM IBMX zu verzeichnen (Abb. 12). t_1 war sowohl beim WT als auch bei H_2 -TG bei der höchsten Histaminkonzentration erniedrigt (Tabelle 3). t_2 hingegen verkürzte sich beim WT, beim H_2 -transgenen linken isolierten Vorhofpräparat nicht (Tabelle 4). dF/dT_{min} und dF/dT_{max} stiegen bei H_2 -TG unter Histamineinfluss an (Tabelle 5+6). Beim WT zeigte sich keine Veränderung (Tabelle 5+6).

Die Kontraktionskraft der H_2 -TG bei der höchsten Histaminkonzentration wies unter Inkubation von 10 μM IBMX ($6,85 \pm 0,34$ mN; n=5) keinen Unterschied zur Kontrolle ($6,88 \pm 0,27$ mN; n=5) auf. Auch bei der Frequenz der H_2 -transgenen rechten isolierten Vorhofpräparate bei der höchsten Histaminkonzentration gab es keine Unterschiede zwischen der KWK mit 10 μM IBMX (463 ± 52 bpm; n=3) und ohne IBMX (480 ± 62 bpm; n=3). Weder bei t_1 und t_2 noch bei der

maximalen Anspannungs- und Relaxationszeit kam es zu einem zusätzlichen Effekt bei 10 μ M IBMX + Histamin 1 μ M im Vergleich zu den Werten ohne IBMX bei der gleichen Histaminkonzentration.

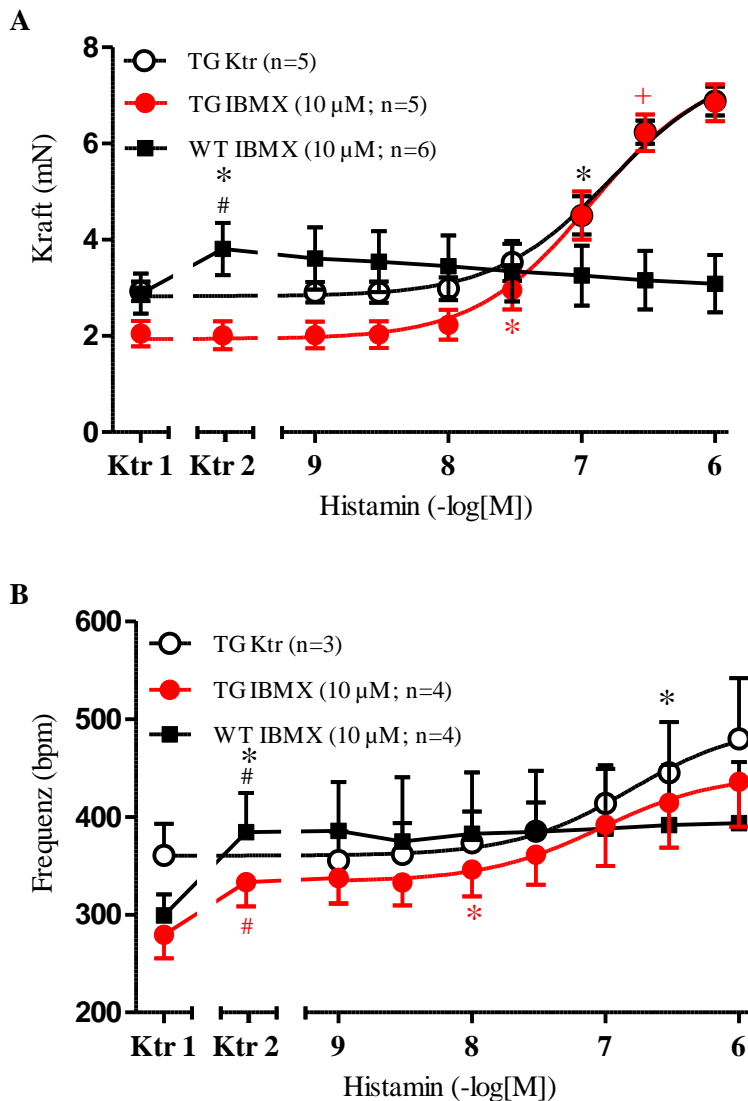


Abb. 12: IBMX

(A) Effekte von Histamin ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 10 μ M IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker isolierter Vorhofpräparate von H_2 -Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (TG, Kreise) und deren Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr 1 = basale Kontraktionskraft vor IBMX-Gabe. Ktr 2 = Kontraktionskraft nach Inkubation von IBMX. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Histamineffekte ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 10 μ M IBMX in spontan schlagenden rechten isolierten Vorhofpräparaten von H_2 -TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr 1 = basale Schlagfrequenz vor IBMX-Gabe. Ktr 2 = Schlagfrequenz nach Zugabe von IBMX. Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr1 ($p < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($p < 0,05$), # = signifikanter Unterschied Ktr 2 vs. Ktr 1 ($p < 0,05$)

4.5 Experimente mit Kombinationen von PDE-Hemmstoffen

4.5.1 Cilostamid + EHNA

Die Ausgangskraft der H₂-TG betrug $2,47 \pm 0,31$ mN (n=6). Nach Inkubation von Cilostamid (1 μ M) und folgend EHNA (1 μ M) betrug die Ausgangskraft $2,26 \pm 0,28$ mN (n=6; Abb. 13). Bei WT betrug die Basalkraft $3,83 \pm 0,45$ mN (n=6) und unter Applikation von 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA betrug sie $3,77 \pm 0,34$ mN (n=6). Die Frequenz H₂-transgener rechter isolierter Vorhofpräparate stieg bei Gabe von 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA von 304 ± 28 bpm (n=4) auf 346 ± 28 bpm (n=4) an ($p < 0,05$). Bei WT kam es zu keinem Frequenzanstieg unter Inkubation von 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA (WT Ktr 1: 279 ± 15 bpm; n=6 vs. WT Ktr 2: 292 ± 20 bpm; n=6). Sowohl bei WT als auch bei H₂-TG kam es zu einer Verkürzung der basalen Anspannungszeit und der Relaxationszeit unter 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA (Tabelle 3+4). Die maximale Anspannungsgeschwindigkeit sowie die maximale Relaxationsgeschwindigkeit blieb bei WT und H₂-TG durch die Kombination 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA unverändert (Tabelle 5+6).

Der EC₅₀-Wert der Kontraktionskraft für Histamin nahm bei H₂-TG unter Einfluss von 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA im Vergleich zur Kontroll-KWK ab (Tabelle 2). Der EC₅₀-Wert der Frequenz für Histamin blieb von der Kontroll-KWK zu der KWK unter 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA unverändert (Tabelle 2). WT reagierten weder mit einem Kraft- noch mit einem Frequenzanstieg auf Histamin nach der Inkubation mit 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA (Abb. 12). Die Anspannungszeit verkürzte sich bei H₂-TG im Vergleich zum Ausgangswert unter Wirkung von Histamin und 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA, während dies bei WT nicht der Fall war (Tabelle 3). Die Relaxationszeit verkürzte sich bei WT unter 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA im Gegensatz zur Kontrolle ohne PDE-Hemmer (Tabelle 4). Bei H₂-transgenen linken isolierten Vorhofpräparaten war, wie auch schon bei der Kontroll-Histamin-KWK, unter 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA keine Verkürzung zu beobachten. Die maximalen Anspannungs- und Erschlaffungsgeschwindigkeiten stiegen bei H₂-TG im Vergleich zum Ausgangswert ($p < 0,05$), bei WT nicht (Tabelle 5+6).

Die Kontraktionskraft bei H₂-TG bei der höchsten Histaminkonzentration belief sich bei der Kontrolle auf $9,51 \pm 0,36$ mN (n=6) und bei gleicher Histaminkonzentration unter Einfluss der PDE-Hemmer 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA auf $8,53 \pm 0,93$ mN (n=6). Die Frequenz der H₂-TG bei der höchsten Histaminkonzentration konnte durch 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA (497 ± 57 bpm; n=3) im Vergleich zur Kontrolle (518 ± 30 bpm; n=3) nicht zusätzlich erhöht werden. Im Gegensatz zur Anspannungszeit bei der höchsten Histaminkonzentration konnte die Erschlaffungszeit bei H₂-TG durch zusätzliche Gabe von 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA vermindert werden (Tabelle 4). Die Anspannungs- und Erschlaffungsgeschwindigkeiten konnten, gemessen bei der höchsten Histaminkonzentration an H₂-transgenen linken isolierten Vorhofpräparaten, unter 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA nicht zusätzlich im Vergleich zur Kontroll-KWK erhöht werden (Tabelle 5+6).

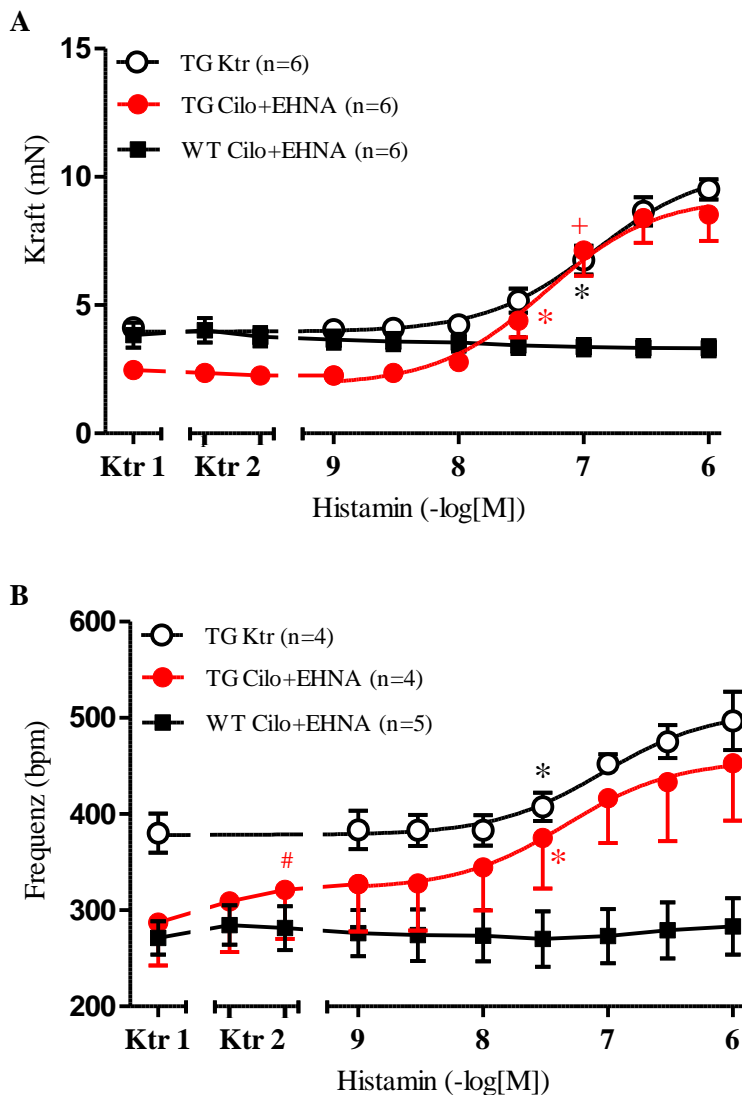


Abb. 13: Cilostamid + EHNA

(A) Effekte von Histamin ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 1 μ M Cilostamid und 1 μ M EHNA auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker isolierter Vorhofpräparate von H_2 -Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (H_2 -TG, Kreise) und deren Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr 1 = basale Kontraktionskraft vor Cilostamid und EHNA-Gabe. Ktr 2 = Kontraktionskraft nach Inkubation von Cilostamid + EHNA (erster Skalenstrich: nach Cilo-Gabe, zweiter Skalenstrich: nach subsequenter EHNA-Gabe). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Histamineffekte ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 1 μ M Cilostamid und 1 μ M EHNA in spontan schlagenden rechten isolierten Vorhofpräparaten von H_2 -TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr 1 = basale Schlagfrequenz vor Cilostamid + EHNA-Gabe. Ktr 2 = Schlagfrequenz nach Zugabe von Cilo + EHNA (erster Skalenstrich: nach Cilostamid-Gabe, zweiter Skalenstrich: nach subsequenter EHNA-Gabe). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr 1 ($p < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($p < 0,05$), # = signifikanter Unterschied Ktr 2 vs. Ktr 1

4.5.2 Rolipram + Cilostamid

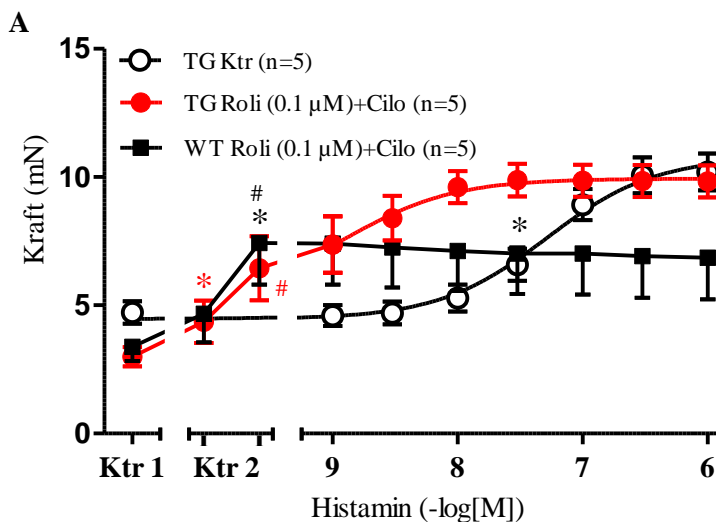
Die Kombination Rolipram und Cilostamid wurde in drei verschiedenen Konzentrationen von Rolipram getestet. Es wurde Rolipram 10 μ M; 1 μ M und 0,1 μ M in Kombination mit Cilostamid 1 μ M vor der sequentiellen Gabe von Histamin appliziert (Abb. 14). Sowohl 10 μ M Rolipram +

1 μM Cilostamid ($\text{H}_2\text{-TG}$ Ktr 1: $2,51 \pm 0,26$ mN; $n=7$ vs. $\text{H}_2\text{-TG}$ Ktr 2: $7,17 \pm 1,10$ mN; $n=7$; $p<0,05$), 1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid ($\text{H}_2\text{-TG}$ Ktr 1: $3,50 \pm 0,59$ mN; $n=7$ vs. $\text{H}_2\text{-TG}$ Ktr 2: $10,02 \pm 1,11$ mN; $n=7$; $p<0,05$) als auch 0,1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid ($\text{H}_2\text{-TG}$ Ktr 1: $2,99 \pm 0,33$ mN; $n=5$ vs. $\text{H}_2\text{-TG}$ Ktr 2: $6,45 \pm 1,12$ mN; $n=5$; $p<0,05$) hatten bei $\text{H}_2\text{-TG}$ einen positiv inotropen Effekt. Auch bei WT konnten die Kombinationen 10 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid (WT Ktr 1: $4,50 \pm 0,66$ mN; $n=6$ vs. WT Ktr 2: $11,95 \pm 0,73$ mN; $n=6$; $p<0,05$), 1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid (WT Ktr 1: $3,46 \pm 0,60$ mN; $n=7$ vs. WT Ktr 2: $8,84 \pm 1,27$ mN; $n=7$; $p<0,05$) als auch 0,1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid (WT Ktr 1: $3,38 \pm 0,49$ mN; $n=5$ vs. WT Ktr 2: $7,44 \pm 1,46$ mN; $n=5$; $p<0,05$) einen Anstieg der Kontraktionskraft bewirken. Dabei konnte 1 μM Cilostamid bei jeder vorangegangenen Konzentration von Rolipram sowohl bei WT als auch bei $\text{H}_2\text{-TG}$ jeweils einen zusätzlich zum Rolipram induzierten Anstieg der Kontraktionskraft bewirken ($p<0,05$). Auch die Frequenz wurde von den Kombinationen von 10 μM Rolipram sowie 1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid bei WT und $\text{H}_2\text{-TG}$ erhöht. Bei $\text{H}_2\text{-TG}$ erhöhte sich die Frequenz bei 10 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid von 287 ± 35 bpm ($n=5$) auf 423 ± 15 bpm ($n=5$; $p<0,05$) und bei 1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid von 324 ± 29 bpm ($n=6$) auf 441 ± 26 bpm ($n=6$; $p<0,05$). Bei WT stieg die Chronotropie durch 10 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid von 305 ± 22 ($n=3$) auf 362 ± 20 bpm ($n=3$; $p<0,05$) und bei 1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid von 275 ± 25 ($n=5$) auf 379 ± 22 bpm ($n=5$; $p<0,05$). Bei 0,1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid konnte beim WT eine Zunahme der Frequenz beobachtet werden (WT Ktr 1: 304 ± 27 bpm; $n=4$ vs. WT Ktr 2: 368 ± 19 bpm; $n=4$; $p<0,05$), bei $\text{H}_2\text{-TG}$ konnte keine Erhöhung gezeigt werden ($\text{H}_2\text{-TG}$ Ktr 1: 250 ± 29 bpm; $n=3$ vs. $\text{H}_2\text{-TG}$ Ktr 2: 325 ± 26 bpm; $n=3$). 1 μM Cilostamid konnte bei einer Konzentration von 10 μM und 1 μM Rolipram die Frequenz bei $\text{H}_2\text{-TG}$ noch zusätzlich erhöhen ($p<0,05$). Beim WT erfolgte dies nur bei 0,1 μM Rolipram. Die Anspannungszeit konnte bei WT und $\text{H}_2\text{-TG}$ bei allen drei Kombinationen verkürzt werden (Tabelle 3). Keine der drei Rolipram + Cilostamid-Kombinationen bei WT oder $\text{H}_2\text{-TG}$ beeinflusste die Relaxationszeit (Tabelle 4). Bei 10 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid sowie bei 1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid erhöhten sich dF/dT_{max} und dF/dT_{min} bei $\text{H}_2\text{-TG}$ und WT (Tabelle 5+6). Bei 0,1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid war ein Anstieg von t_1 und t_2 bei $\text{H}_2\text{-TG}$ ebenfalls zu beobachten ($p<0,05$), bei WT zeigte sich kein Anstieg (Tabelle 3+4).

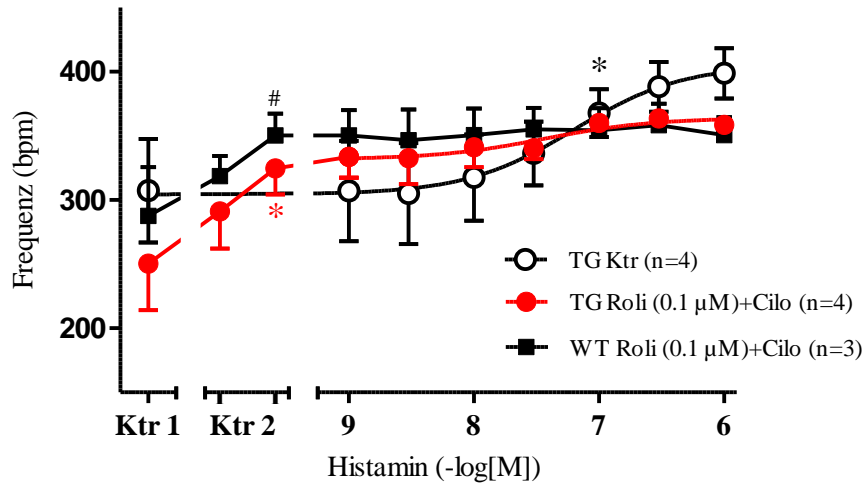
Bei 1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid konnte bei $\text{H}_2\text{-TG}$ kein zusätzlicher Anstieg der Kontraktionskraft unter Histamingabe gezeigt werden ($\text{H}_2\text{-TG}$ Ktr 2: $10,02 \pm 1,11$ mN; $n=7$ vs. $\text{H}_2\text{-TG}$ His 1 μM : $10,22 \pm 1,05$ mN; $n=7$). Ein geringer Anstieg konnte jedoch bei 10 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid durch Histamin nach Gabe der PDE-Hemmer beobachtet werden ($\text{H}_2\text{-TG}$ Ktr 2: $7,89 \pm 1,02$ mN; $n=6$ vs. $\text{H}_2\text{-TG}$ His 1 μM : $8,23 \pm 1,02$ mN; $n=6$; $p<0,05$). Der EC_{50} -Wert für Histamin der $\text{H}_2\text{-TG}$ betrug bei 0,1 μM Rolipram + Cilostamid $-9,06 \pm 0,13$ ($n=5$) und war damit im Vergleich zur Kontrolle ($-7,31 \pm 0,06$; $n=5$) erniedrigt ($p<0,05$). Dies führte zu einer deutlichen Verschiebung zu niedrigeren Konzentrationen (Tabelle 2). Bei den rechten Vorhofpräparaten der $\text{H}_2\text{-TG}$ konnte nach 10 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid, 1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid

sowie nach 0,1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid kein weiterer chronotroper Effekt durch zusätzliche Histamingabe nachgewiesen werden. Der EC_{50} -Wert der Frequenz der H_2 -TG betrug bei 10 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid $-7,35 \pm 0,32 \text{ M}$ ($n=3$) und bei der Kontrolle $-7,12 \pm 0,10 \text{ M}$ ($n=5$) und wies in einem ungepaarten t-test keine Veränderungen auf. Für 1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid konnte kein EC_{50} -Wert berechnet werden. Bei 0,1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid zeigte der EC_{50} -Wert keinen Unterschied zur Kontrolle (H_2 -TG Ktr: $-7,17 \pm 0,15 \text{ M}$; $n=3$ vs. H_2 -TG 0,1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid: $-7,50 \pm 0,03 \text{ M}$; $n=3$). Bei WT konnte nach Applikation der jeweils drei Rolipram-Konzentrationen + 1 μM Cilostamid durch Histamin kein zusätzlich positiv inotroper oder positiv chronotroper Effekt hervorgerufen werden.

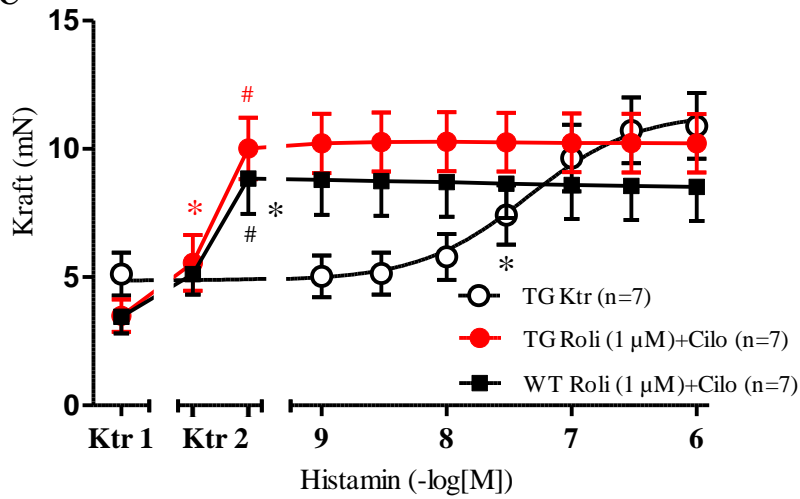
Die Kontraktionskraft bei der höchsten Histaminkonzentration konnte in keiner der drei Kombinationen zusätzlich durch die vorangegangene Applikation von Rolipram + 1 μM Cilostamid bei H_2 -TG erhöht werden (exemplarisch: H_2 -TG Ktr bei His 1 μM : $8,46 \pm 1,09 \text{ mN}$; $n=6$ vs. 10 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid bei His 1 μM : $8,23 \pm 1,02 \text{ mN}$; $n=6$). Auch bei der Frequenz war bei H_2 -TG in keinem der Fälle eine zusätzliche Steigerung der Frequenz möglich (exemplarisch: H_2 -TG Ktr bei His 1 μM : $509 \pm 15 \text{ bpm}$ ($n=5$) vs. 10 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid bei His 1 μM : $483 \pm 35 \text{ bpm}$ ($n=3$)). t_1 konnte bei 10 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid und 1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid bei H_2 -transgenen linken isolierten Vorhofpräparaten bei der höchsten Histaminkonzentration zusätzlich verkürzt werden (exemplarisch: H_2 -TG Ktr bei His 1 μM : $12,7 \pm 0,1 \text{ ms}$; $n=7$ vs. 1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid bei His 1 μM : $12,3 \pm 0,1 \text{ ms}$; $n=7$; $p<0,05$). Die Erschlaffungszeit von H_2 -TG konnte bei Histamin 1 μM unter Rolipram + 1 μM Cilostamid-Wirkung bei allen Konzentrationen zusätzlich verkürzt werden. So betrug exemplarisch t_2 unter 0,1 μM Rolipram + 1 μM Cilostamid $26,1 \pm 0,6 \text{ ms}$ ($n=5$) und wurde somit im Vergleich zur Kontroll-KWK ohne PDE-Hemmer ($28,3 \pm 1,0 \text{ ms}$; $n=5$) erniedrigt ($p<0,05$). dF/dT_{max} und dF/dT_{min} bei H_2 -TG konnten durch Rolipram + 1 μM Cilostamid in keinem Fall bei 1 μM Histamin zusätzlich im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden.



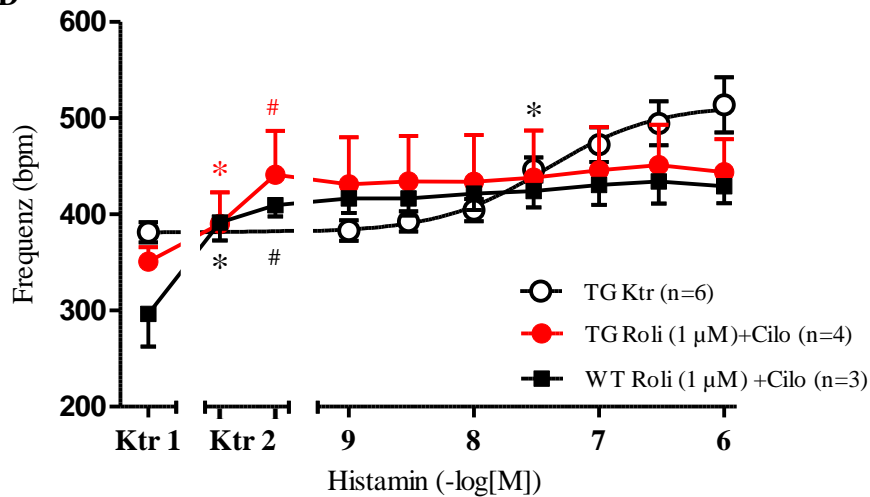
B



C



D



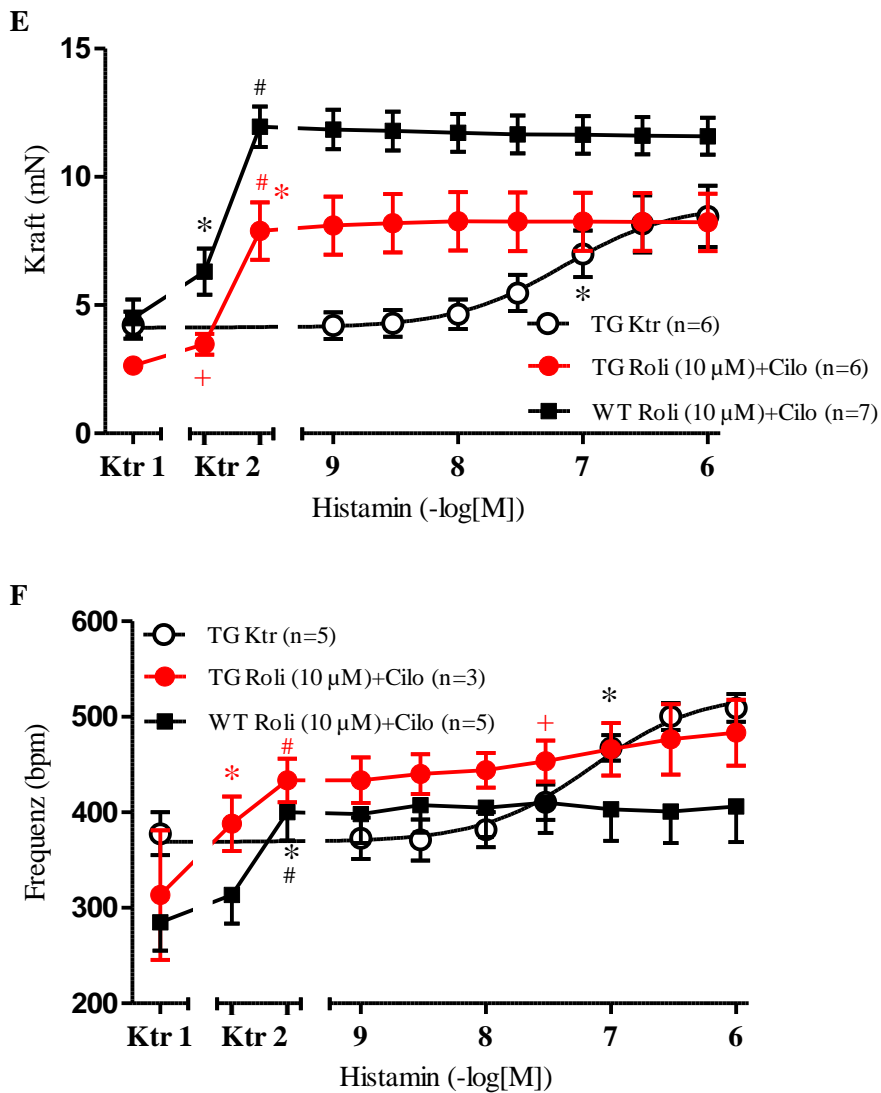


Abb. 14: Rolipram + Cilostamid

(A) Effekte von Histamin ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 0,1 μM Rolipram (=Roli) und 1 μM Cilostamid (=Cilo) auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker isolierter Vorhofpräparate von H₂-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (H₂-TG, Kreise) und deren Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr 1 = basale Kontraktionskraft vor Roli und Cilo-Gabe. Ktr 2 = Kontraktionskraft nach Inkubation von Roli + Cilo (erster Skalenstrich: nach Rolipram-Gabe, zweiter Skalenstrich: nach subsequenter Cilostamid-Gabe). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Histamineffekte ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 0,1 μM Rolipram und 1 μM Cilostamid in spontan schlagenden rechten isolierten Vorhofpräparaten von H₂-TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr 1 = basale Schlagfrequenz vor Roli + Cilo-Gabe. Ktr 2 = Schlagfrequenz nach Zugabe von Roli+Cilo (erster Skalenstrich: nach Rolipram-Gabe, zweiter Skalenstrich: nach subsequenter Cilostamid-Gabe). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

(C) Effekte von Histamin ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 1 μM Rolipram und 1 μM Cilostamid auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker isolierter Vorhofpräparate von H₂-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (H₂-TG, Kreise) und deren Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr 1 = basale Kontraktionskraft vor Roli+Cilo-Gabe. Ktr 2 = Kontraktionskraft nach Inkubation von Roli + Cilo (erster Skalenstrich: nach Rolipram-Gabe, zweiter Skalenstrich: nach subsequenter Cilostamid-Gabe). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(D) Histamineffekte ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 1 μM Rolipram und 1 μM Cilostamid in spontan schlagenden rechten isolierten Vorhofpräparaten von H₂-TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr 1 = basale Schlagfrequenz vor Roli + Cilo-Gabe. Ktr 2 = Schlagfrequenz nach Zugabe von Roli + Cilo (erster Skalenstrich: nach Rolipram-Gabe, zweiter Skalenstrich: nach subsequenter Cilostamid-

Gabe). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

(E) Effekte von Histamin ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 10 μM Rolipram und 1 μM Cilostamid auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker isolierter Vorhofpräparate von H_2 -Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (H_2 -TG, Kreise) und deren Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr 1 = basale Kontraktionskraft vor Roli und Cilo-Gabe. Ktr 2 = Kontraktionskraft nach Inkubation von Roli+Cilo (erster Skalenstrich: nach Rolipram-Gabe, zweiter Skalenstrich: nach subsequenter Cilostamid-Gabe). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(F) Histamineffekte ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 10 μM Rolipram und 1 μM Cilostamid in spontan schlagenden rechten isolierten Vorhofpräparaten von H_2 -TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr 1 = basale Schlagfrequenz vor Roli + Cilo-Gabe. Ktr 2 = Schlagfrequenz nach Zugabe von Roli + Cilo (erster Skalenstrich: nach Rolipram-Gabe, zweiter Skalenstrich: nach subsequenter Cilostamid-Gabe). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr 1 ($p < 0,05$), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT ($p < 0,05$), # = signifikanter Unterschied Ktr 2 vs. Ktr 1

4.5.3 Rolipram + EHNA

Rolipram wurde in einer Konzentration von 1 μM in Kombination mit EHNA (1 μM) vor der Histamin-KWK verabreicht (Abb. 15). Die Gabe von 1 μM Rolipram + 1 μM EHNA ($2,27 \pm 0,37$ mN; n=5) bewirkte bei H_2 -TG keinen Anstieg der Ausgangskraft im Vergleich zur Kontrolle ($1,84 \pm 0,17$ mN; n=5). Bei WT führte die Gabe von 1 μM Rolipram + 1 μM EHNA hingegen zu einer Steigerung der Kontraktionskraft im Vergleich zur Kontrolle (WT Ktr 1: $2,99 \pm 0,52$ mN; n=5 vs. WT Ktr 2: $3,93 \pm 0,58$ mN; n=5; $p < 0,05$). Die Basalfrequenz stieg bei Zugabe von 1 μM Rolipram + 1 μM EHNA sowohl bei H_2 -TG (H_2 -TG Ktr 1: 308 ± 39 bpm; n=5 vs. H_2 -TG Ktr 2: 342 ± 41 bpm; n=5; $p < 0,05$) als auch bei WT (WT Ktr 1: 232 ± 7 bpm; n=5 vs. WT Ktr 2: 306 ± 15 bpm; n=5; $p < 0,05$) an. Die basalen Anspannungs- und Relaxationszeiten verkürzten sich bei H_2 -TG und WT unter Gabe von 1 μM Rolipram + 1 μM EHNA (Tabelle 3+4). Bei der maximalen Anspannungs- und Relaxationsgeschwindigkeit konnte weder bei WT noch bei H_2 -TG ein Effekt von 1 μM Rolipram + 1 μM EHNA gezeigt werden (Tabelle 5+6).

Durch Zugabe von 1 μM Rolipram und 1 μM EHNA konnte die KWK der Kontraktionskraft von Histamin bei H_2 -TG zu niedrigeren Konzentrationen verschoben werden (H_2 -TG Ktr: $-6,89 \pm 0,21$ M; n=5 vs. H_2 -TG Rolipram + EHNA: $-7,43 \pm 0,19$ M; n=5; $p < 0,05$). Der EC_{50} -Wert von Histamin, bezogen auf die Frequenz, betrug bei H_2 -TG unter Inkubation von 1 μM Rolipram + 1 μM EHNA $-7,51 \pm 0,31$ M (n=4) und bei der Kontrolle $-7,09 \pm 0,22$ M (n=4). Somit kam es zu einer Verschiebung der Histamin-KWK zu niedrigeren Konzentrationen ($p < 0,05$). WT reagierten auch nach 1 μM Rolipram + 1 μM EHNA-Gabe weder bei Kontraktionskraft noch bei Frequenz auf Histamin. Bei H_2 -TG kam es zu einem Anstieg von $\text{dF}/\text{dT}_{\text{min}}$ und $\text{dF}/\text{dT}_{\text{max}}$ bei Zugabe von Histamin unter Wirkung von 1 μM Rolipram + 1 μM EHNA (Tabelle 5+6). Bei WT blieb dieser Effekt aus (Tabelle 5+6).

Die Kontraktionskraft bei der höchsten Histaminkonzentration konnte durch vorangegangene Gabe von 1 μM Rolipram + 1 μM EHNA ($8,49 \pm 0,48$ mN; n=5) im Vergleich zur Kontrolle nicht gesteigert werden ($8,28 \pm 0,31$ mN; n=5). Auch die Frequenz erhöhte sich bei 1 μM Rolipram +

1 μM EHNA-Gabe (417 ± 22 bpm; $n=3$) im Vergleich zur Kontrolle (430 ± 21 bpm; $n=3$) bei Histamin 1 μM nicht, sondern reduzierte sich leicht ($p<0,05$). Die Anspannungszeit bei Histamin 1 μM konnte durch Gabe von 1 μM Rolipram + 1 μM EHNA ($12,39 \pm 0,18$ ms; $n=5$) im Vergleich zum Kontrollwert ohne PDE-Hemmstoffe ($12,64 \pm 0,19$ ms; $n=5$) weiter gesenkt werden ($p<0,05$). Auch bei t_2 war eine Verkürzung ($p<0,05$) bei der höchsten Histaminkonzentration unter Wirkung von 1 μM Rolipram + 1 μM EHNA ($25,3 \pm 0,5$ ms; $n=5$) im Vergleich zur Kontrolle ($26,7 \pm 0,6$ ms; $n=5$) zu beobachten. dF/dT_{\min} und dF/dT_{\max} konnten bei 1 μM Histamin bei H_2 -TG durch Applikation von 1 μM Rolipram + 1 μM EHNA im Vergleich zum Kontrollwert bei Histamin 1 μM nicht zusätzlich gesteigert werden (Tabelle 5+6).

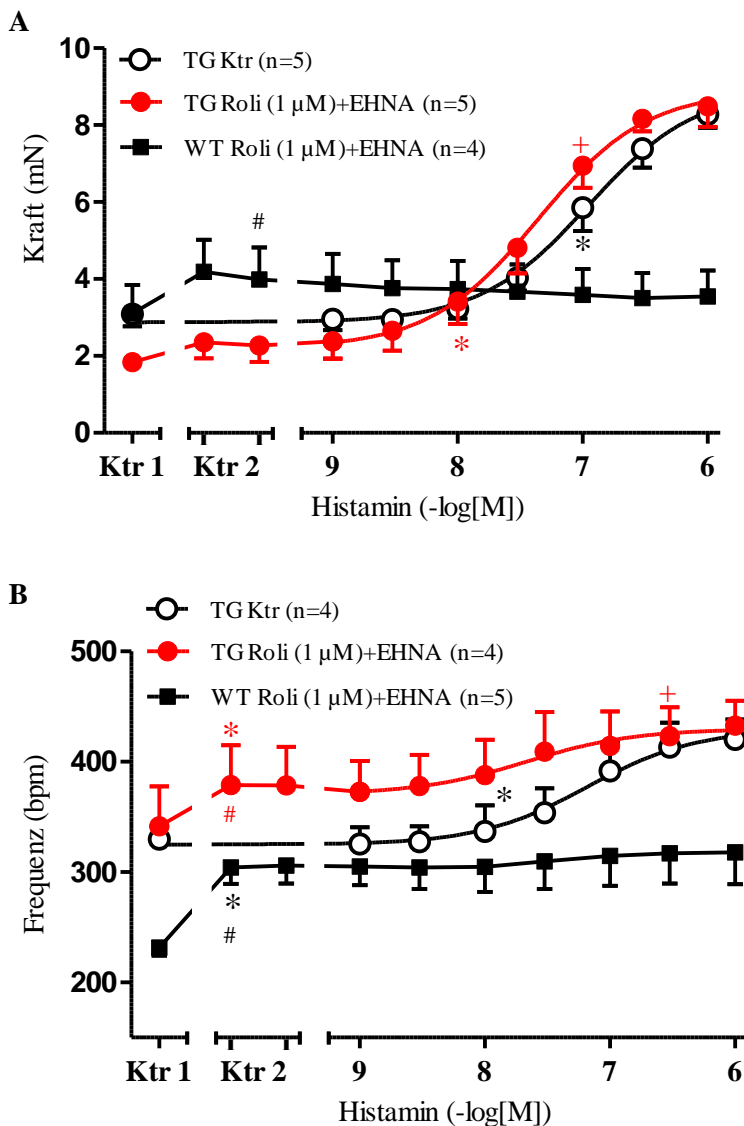


Abb. 15: Rolipram + EHNA

(A) Effekte von Histamin ohne PDE- Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 1 μM Rolipram und 1 μM EHNA auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker isolierter Vorhofpräparate von H_2 -Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (H_2 -TG, Kreise) und deren Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr 1 = basale Kontraktionskraft vor Roli und EHNA-Gabe. Ktr 2 = Kontraktionskraft nach Inkubation von Roli + EHNA (erster Skalenstrich: nach Rolipram-Gabe, zweiter Skalenstrich: nach subsequenter EHNA-Gabe). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Histamineffekte ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 1 μ M Rolipram und 1 μ M EHNA in spontan schlagenden rechten isolierten Vorhofpräparaten von H₂-TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr 1 = basale Schlagfrequenz vor Roli + EHNA-Gabe. Ktr 2 = Schlagfrequenz nach Gabe von Roli+EHNA (erster Skalenstrich: nach Rolipram-Gabe, zweiter Skalenstrich: nach subsequenter EHNA-Gabe). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr 1 (p<0,05), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT (p<0,05), # = signifikanter Unterschied Ktr 2 vs. Ktr 1

4.5.4 Rolipram + Cilostamid + EHNA

Die Kombination der drei spezifischen PDE-Hemmer wurde mit 0,1 μ M Rolipram, 1 μ M Cilostamid und 1 μ M EHNA durchgeführt (Abb. 16). 0,1 μ M Rolipram + 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA ($3,28 \pm 0,79$ mN; n=5) führte bei H₂-TG zu keinem Anstieg der Basalkraft im Vergleich zu Kontrolle ($2,16 \pm 0,46$ mN; n=5). Bei WT führte die Gabe von 0,1 μ M Rolipram + 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA zu einem Kraftanstieg (Ktr 1: $2,74 \pm 0,37$; n=5 vs. Ktr 2: $5,69 \pm 1,30$ mN; n=5; p<0,05 bei Anova). Die Frequenz stieg bei H₂-TG von 302 ± 32 bpm (n=5) auf 397 ± 36 bpm (n=5) unter Wirkung 0,1 μ M Rolipram + 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA an (p<0,05). Auch bei WT gab es einen Frequenzanstieg unter Inkubation von 0,1 μ M Rolipram + 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA (WT Ktr 1: 306 ± 13 bpm; n=4 vs. WT Ktr 2: 334 ± 27 bpm; n=4; p<0,05). Die Kontraktionszeit sowie die Erschlaffungszeit wurden bei H₂-TG durch 0,1 μ M Rolipram + 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA nicht verändert (Tabelle 3+4). Bei WT nahmen die Basalwerte für t₁ und t₂ ab (Tabelle 3+4). Die maximale Anspannungs- und Erschlaffungsgeschwindigkeit konnte durch 0,1 μ M Rolipram + 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA weder bei H₂-TG noch bei WT verändert werden (Tabelle 5+6).

Bei der vorherigen Gabe von 0,1 μ M Rolipram + 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA war der konzentrationsabhängige positiv inotrope Effekt von Histamin bei H₂-TG deutlich zu niedrigeren Konzentrationen verschoben (Tabelle 2). Auch bei der Frequenz veränderte die Applikation von 0,1 μ M Rolipram + 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA bei H₂-TG den Histamineffekt und trug zu einer Verschiebung zu niedrigeren Konzentrationen der KWK bei (Tabelle 2).

Die Kontraktionskraft der H₂-TG bei Histamin 1 μ M konnte bei Applikation von 0,1 μ M Rolipram + 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA ($8,38 \pm 0,64$ mN; n=5) im Vergleich zur Kontrolle ($8,51 \pm 0,71$ mN; n=5) nicht zusätzlich gesteigert werden. Auch bei der Frequenz gab es bei der höchsten Histaminkonzentration keinen Unterschied zwischen Kontrolle (480 ± 34 bpm; n=5) und 0,1 μ M Rolipram + 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA (481 ± 42 bpm; n=5). Die Anspannungszeit bei Histamin 1 μ M konnte bei Gabe von 0,1 Rolipram + 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA ($12,4 \pm 0,2$ ms; n=5) zusätzlich zur Kontrolle ($12,6 \pm 0,2$ ms; n=5) bei H₂-TG gesenkt werden (p<0,05). Auch die Erschlaffungszeit bei 1 μ M Histamin erfuhr durch die Gabe der drei PDE-Hemmer ($24,8 \pm 1,1$ ms; n=5) bei H₂-TG eine zusätzliche Verkürzung (p<0,05) gemessen an der Kontrolle ($27,3 \pm 1,5$ ms; n=5). Die maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten konnten bei H₂-TG bei 1 μ M Histamin durch die Applikation von 0,1 μ M Rolipram + 1 μ M Cilostamid + 1 μ M EHNA nicht zusätzlich gesteigert werden.

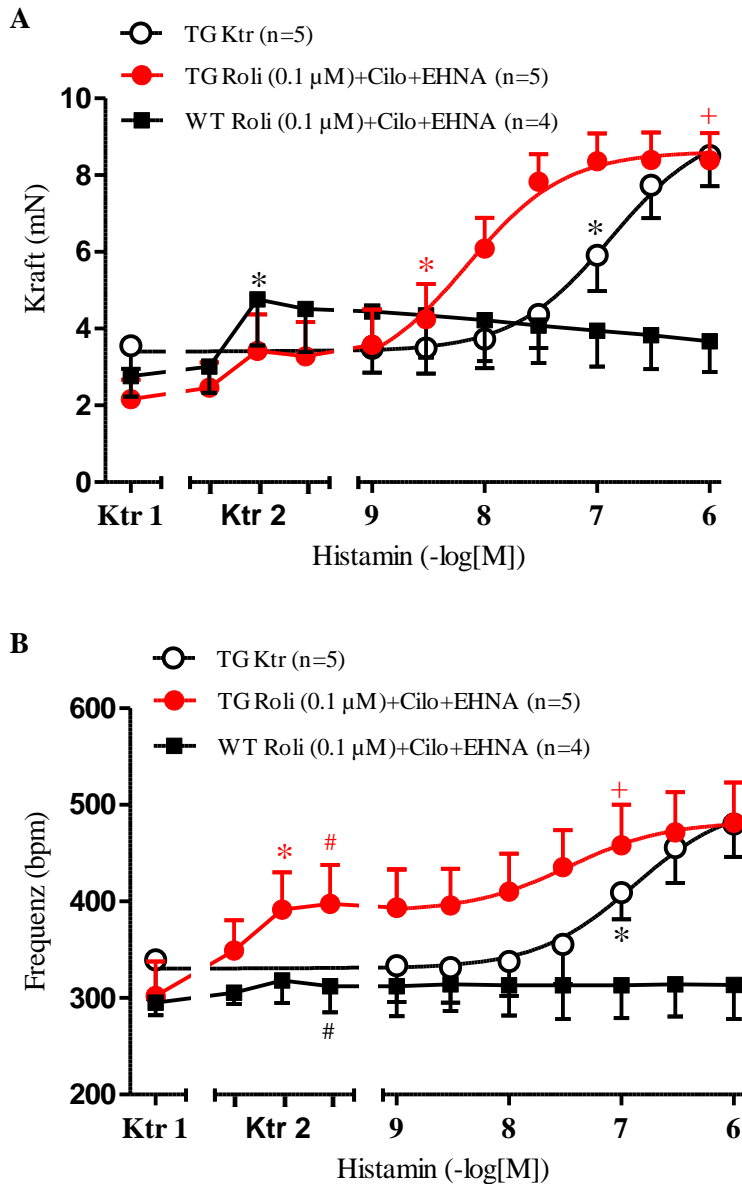


Abb. 16: Rolipram + Cilostamid + EHNA

(A) Effekte von Histamin ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 0,1 μM Rolipram, 1 μM Cilostamid und 1 μM EHNA auf die Kontraktionskraft elektrisch gereizter (1 Hz) linker isolierter Vorhofpräparate von H₂-Rezeptor-überexprimierenden Mäusen (H₂-TG, Kreise) und deren Wildtyp-Geschwistertieren (WT, Quadrate). Ktr 1 = basale Kontraktionskraft vor Roli, Cilo und EHNA-Gabe. Ktr 2 = Kontraktionskraft nach Inkubation von Roli + Cilo + EHNA (erster Skalenstrich: nach Rolipram-Gabe, zweiter Skalenstrich: nach subsequenter Cilostamid-Gabe, dritter Skalenstrich: nach anschließender EHNA-Gabe). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Kontraktionskraft in Millinewton (mN).

(B) Histamineffekte ohne PDE-Hemmstoff (Ktr) und in Gegenwart von 0,1 μM Rolipram, 1 μM Cilostamid und 1 μM EHNA in spontan schlagenden rechten isolierten Vorhofpräparaten von H₂-TG (Kreise) und WT (Quadrate). Ktr 1 = basale Schlagfrequenz vor Roli + Cilo + EHNA-Gabe. Ktr 2 = Schlagfrequenz nach Zugabe von Roli + Cilo + EHNA (erster Skalenstrich: nach Rolipram-Gabe, zweiter Skalenstrich: nach subsequenter Cilostamid-Gabe, dritter Skalenstrich: nach anschließender EHNA-Gabe). Abszisse: negativ dekadischer Logarithmus der Histaminkonzentration, Ordinate: Schlagfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min).

n = Anzahl der Experimente, * = erster signifikanter Unterschied gegenüber Ktr 1 (p<0,05), + = erster signifikanter Unterschied gegenüber WT (p<0,05), # = signifikanter Unterschied Ktr 2 vs. Ktr 1

4.6 Prävalenz von Arrhythmien

Tabelle 1: Prävalenz von Arrhythmien

Arrhythmien WT

	n	1. KWK Ktr	1. KWK His 1 μ M	2. KWK Ktr	PDE- Hemmer 1	PDE- Hemmer 2	PDE- Hemmer 3	2. KWK His 1 μ M
Ohne PDE-Hemmer	10	4	4	6				5
EHNA 1 μ M	4	1	0	0	1			1
Cilostamid 1 μ M	8	2	1	2	2			1
Rolipram 10 μ M	6	0	0	0	1			1
IBMX 10 μ M	6	2	2	2	1			1
Cilo+EHNA	6	0	1	0	1	0		0
Roli 10 μ M+Cilo	7	1	1	1	1	5		5
Roli 1 μ M+Cilo	7	1	0	1	1	2		3
Roli 0,1 μ M+Cilo	5	1	1	1	2	3		3
Roli 1 μ M+EHNA	5	0	0	1	1	0		1
Ro 0,1 μ M+Cilo+EHNA	5	1	1	0	1	0	2	2

Arrhythmien H₂-TG

	n	1. KWK Ktr	1. KWK His 1 μ M	2. KWK Ktr	PDE- Hemmer 1	PDE- Hemmer 2	PDE- Hemmer 3	2. KWK His 1 μ M
Ohne PDE-Hemmer	8	2	5	2				4
EHNA 1 μ M	6	3	4	2	3			3
Cilostamid 1 μ M	8	6	5	4	4			4
Rolipram 10 μ M	8	2	5	3	2			3
IBMX 10 μ M	6	4	5	4	3			3
Cilo+EHNA	6	1	3	2	2	2		2
Roli 10 μ M+Cilo	7	2	2	3	5	6		6
Roli 1 μ M+Cilo	7	5	5	3	4	3		7
Roli 0,1 μ M+Cilo	5	3	2	3	4	4		3
Roli 1 μ M+EHNA	5	0	0	1	1	0		0
Ro 0,1 μ M+Cilo+EHNA	5	1	2	1	2	2	2	3

Es ist die Prävalenz von Arrhythmien im Versuchsverlauf in absoluten Zahlen dargestellt. Die erste Spalte zeigt, welcher PDE-Hemmstoff bzw. welche PDE-Hemmstoffe inkubiert wurden. Für EHNA und Cilostamid betrug die Konzentration 1 μ M. Die zweite Spalte zeigt die Anzahl der Versuche (n). Ktr bezieht sich auf den Ausgangswert ohne Zugabe von zusätzlichen Substanzen. His 1 μ M bezieht sich auf die Prävalenz der Arrhythmien bei der höchsten Histaminkonzentration 1 μ M. 1. KWK ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Histamin ohne PDE-Hemmstoff, 2. KWK bezieht sich auf die KWK von Histamin mit dem in der Vorspalte genannten PDE-Hemmer. Die Analyse der Prävalenz von Arrhythmien nach Inkubation von PDE-Hemmer ergab weder für die einzelnen PDE-Hemmer und deren Kombinationen noch für die gesammelte Analyse aller Versuchsreihen mit PDE-Hemmern eine Zunahme der Prävalenz von basalen Arrhythmien.

4.7 EC₅₀-Werte der Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Tabelle 2: Übersicht über pEC₅₀-Werte von Histamin an isolierten H₂-TG-Vorhofpräparaten

Linke isolierte Vorhofpräparate

	n-Zahl	Ktr KWK	KWK mit PDE-Hemmer
Ohne PDE-Hemmer	6	-6,98±0,14	-6,92±0,08
EHNA 1 µM	5	-7,11±0,11	-7,01±0,14*
Cilostamid 1 µM	7	-7,03±0,08	-7,55±0,06*
Rolipram 10 µM	6	-6,97±0,09	-7,57±0,06*
IBMX 10 µM	5	-6,83±0,12	-6,97±0,11
Cilo+EHNA	6	-6,88±0,17	-7,27±0,1*
Roli 10 µM+Cilo	3	-7,07±0,07	n.b
Roli 1 µM+Cilo	4	-7,38±0,12	n.b.
Roli 0,1 µM+Cilo	5	-7,31±0,06	-9,06±0,13*
Roli 1 µM+EHNA	5	-6,89±0,21	-7,43±0,19*
Roli 0,1 µM+Cilo+EHNA	5	-6,89±0,13	-8,36±0,17*

Rechte isolierte Vorhofpräparate

	n-Zahl	Ktr KWK	KWK mit PDE-Hemmer
Ohne PDE-Hemmer	3	-7,35±0,41	-6,47±0,28
EHNA 1 µM	3	-7,13±0,24	-6,95±0,21
Cilostamid 1 µM	3	-7,49±0,11	-7,88±0,09
Rolipram 10 µM	4	-7,11±0,02	-7,23±0,1
IBMX 10 µM	3	-6,95±0,24	-6,91±0,38
Cilo+EHNA	3	-6,98±0,27	-7,4±0,24
Roli 10 µM+Cilo	5 bzw. 3	-7,12±0,1	-7,35±0,32
Roli 1 µM+Cilo	3	-7,57±0,15	n.b
Roli 0,1 µM+Cilo	3	-7,17±0,15	-7,5±0,03
Roli 1 µM+EHNA	4	-7,09±0,22	-7,51±0,31*
Roli 0,1 µM+Cilo+EHNA	5	-6,72±0,15	-7,49±0,11*

Es ist der negative dekadische Logarithmus des halbmaximalen Effekts (=pEC₅₀) von Histamin dargestellt. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) von Histamin wurden mit Konzentrationen von 1 nM bis 1 µM in Zehnerschritten durchgeführt. Für EHNA und Cilostamid betrug die Konzentration 1 µM. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus den Einzelversuchen. Die Vorspalte zeigt, welcher PDE-Hemmstoff bzw. welche PDE-Hemmstoffe inkubiert wurden.

Die mit „n.b.“ gekennzeichneten Stellen zeigen an, dass keine Auswertung der Experimente möglich war.

* = signifikanter Unterschied von Ktr KWK gegenüber KWK mit PDE-Hemmer (p<0,05).

4.8 Anspannungs- und Relaxationszeiten der linken isolierten Vorhofpräparate von H₂-TG - und WT- Mäusen

Tabelle 3: Anspannungszeit (t₁) von H₂-TG und WT

t ₁	H ₂ -TG Ktr 1	H ₂ -TG Ktr 2	H ₂ -TG His 1 µM	WT Ktr 1	WT Ktr 2	WT His 1 µM
Ohne PDE-Hemmer	13,2±0,1	-	12,2±0,1 #	13,4±0,1	-	13,6±0,1#
EHNA 1 µM	12,9±0,2	12,9±0,1	12,5±0,3	12,8±0,2	12,9±0,2	13,0±0,2#
Cilostamid 1 µM	12,6±0,2	12,7±0,2	11,4±0,1#	12,9±0,1	12,9±0,1	13,1±0,2
Rolipram 10 µM	13,0±0,2	12,7±0,2*	11,5±0,2#	12,3±0,2	12,1±0,2*	12,0±0,2
IBMX 10 µM	12,8±0,4	12,8±0,3	11,9±0,3#	13,2±0,3	12,9±0,3*	13,2±0,3
Cilo+EHNA	14,2±0,3	14,1±0,3*	12,4±0,2#	14,8±0,2	14,5±0,2*	14,6±0,2
Roli 10 µM+Cilo	14,4±0,2	12,9±0,2*	12,6±0,2#	14,9±0,3	12,7±0,2*	12,4±0,1#
Roli 1 µM+Cilo	14,2±0,2	12,7±0,1*	12,3±0,1#	14,5±0,2	12,7±0,1*	12,4±0,1#
Roli 0,1 µM+Cilo	13,9±0,3	13,2±0,3*	12,5±0,1	14,9±0,7	13,1±0,2*	13,1±0,3
Roli 1 µM+EHNA	14,0±0,2	13,6±0,3*	12,6±0,1#	14,7±0,2	14,2±0,2*	14,1±0,3
Roli 0,1 µM+Cilo+EHNA	14,0±0,2	14,4±0,7	12,4±0,2	14,3±0,2	13,1±0,1*	12,9±0,1

Tabelle 3 zeigt die Anspannungszeit (t₁) in ms. n=66-68 (ohne PDE-Hemmer); n=4-7 (mit PDE-Hemmer)

H₂-TG = H₂-transgene Mäuse, WT= Wildtyp; Ktr 1= vor Substanzzugabe Ktr 2= nach Gabe PDE-Hemmer; His = Histamin; EHNA und Cilostamid in Konzentration von 1 µM. t₁ in ms ± SEM; Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus den Einzelversuchen. * = signifikanter Unterschied von Ktr 2 gegenüber Ktr 1 (P<0,05), # = signifikanter Unterschied Ktr 2 vs. His 1 µM (p<0,05)

Tabelle 4: Erschlaffungszeit (t₂) von H₂-TG und WT

t ₂	H ₂ -TG Ktr 1	H ₂ -TG Ktr 2	H ₂ -TG His 1 µM	WT Ktr 1	WT Ktr 2	WT His 1 µM
Ohne PDE-Hemmer	32,3 ±0,8	-	27,7±0,4#	33,6±0,7	-	33,4 ±0,7
EHNA 1 µM	32,9±2,5	32,7±2,4	27,6±0,9	34,3±3,3	34,1±3,2*	33,9±3,2#
Cilostamid 1 µM	27,9±1,2	28,4±1,3	25,8±0,8	38,0±2,6	34,7±1,9	33,2±2,2#
Rolipram 10 µM	30,7±2,5	28,9±2,7	26,1±0,7	27,1±1,4	26,1±0,9	24,5±0,9#
IBMX 10 µM	29,3±1,2	27,7±1,2	23,6±1,5	34,7±4,3	30,6±4,3*	28,7±4,4#
Cilo+EHNA	29,2±1,0	27,9±0,7*	26,4±0,6	30,1±0,9	28,0±0,7*	27,2±0,8
Roli 10 µM+Cilo	24,4±1,0	24,1±1,2	24,4±0,9	31,5±2,1	28,5±1,0	27,0±0,9#
Roli 1 µM+Cilo	24,9±1,9	26,6±1,3	26,3±1,1	30,68±2,1	29,0±0,8	27,1±0,7#
Roli 0,1 µM+Cilo	23,3±1,1	23,6±0,9	26,1±0,6#	25,8±1,9	25,8±1,4	23,9±0,9
Roli 1 µM+EHNA	21,5±1,1	20,9±1,0*	25,3±0,5#	29,1±2,3	27,1±2,3*	25,0±1,7
Roli 0,1 µM+Cilo+EHNA	23,7±1,5	21,7±1,0	24,8±1,1#	24,8±2,0	22,7±1,8*	21,2±1,6#

Tabelle 4 zeigt die Erschlaffungszeit (t₂) in ms. n=64-68 (ohne PDE-Hemmer); n=4-7 (mit PDE-Hemmer)

H₂-TG = H₂-transgene Mäuse, WT= Wildtyp; Ktr 1= vor Substanzzugabe Ktr 2= nach Gabe PDE-Hemmer; His = Histamin; EHNA und Cilostamid in Konzentration von 1 µM. t₂ in ms ± SEM; Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus den Einzelversuchen. * = signifikanter Unterschied von Ktr 2 gegenüber Ktr 1 (P<0,05), # = signifikanter Unterschied Ktr 2 vs. His 1 µM (p<0,05)

Tabelle 5: Maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dT_{max}) von H₂-TG und WT

dF/dT _{max}	H ₂ -TG Ktr 1	H ₂ -TG Ktr 2	H ₂ -TG His 1 µM	WT Ktr 1	WT Ktr 2	WT His 1 µM
Ohne PDE-Hemmer	272 ±12	-	648±19#	303±14	-	268±13
EHNA 1 µM	281±53	275±51	672±106#	353±41	348±42	322±43
Cilostamid 1 µM	163±37	163±39	647±57#	168±41	168±42	118±20
Rolipram 10 µM	202±23	258±35	707±27#	195±74	251±64	246±73
IBMX 10 µM	147±21	145±22	519±35#	208±38	286±49	240±50
Cilo+EHNA	161±24	148±21	613±68#	244±32	246±26	215±22
Roli 10 µM+Cilo	157±18	507±90*	600±73	279±45	848±53*	838±50
Roli 1 µM+Cilo	194±39	663±85*	700±83	260±43	710±71*	703±69
Roli 0,1 µM+Cilo	195±27	445±91*	705±48#	210±39	514±121	479±126
Roli 1 µM+EHNA	116±12	148±28	608±38#	185±38	253±42	235±38
Roli 0,1µM+Cilo+EHNA	128±36	212±65	603±52#	169±24	392±106	338±99

Tabelle 5 zeigt die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dT_{max}). n=67-68 (ohne PDE-Hemmer); n=4-7 (mit PDE-Hemmern)

H₂-TG = H₂-transgene Mäuse, WT= Wildtyp; Ktr 1= vor Substanzzugabe Ktr 2= nach Gabe PDE-Hemmer; His = Histamin; EHNA und Cilostamid in Konzentration von 1 µM. dF/dT_{max} in mN/ms ± SEM; Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus den Einzelversuchen. * = signifikanter Unterschied von Ktr 2 gegenüber Ktr 1 (P<0,05), # = signifikanter Unterschied Ktr 2 vs. His 1 µM (p<0,05)

Tabelle 6: Maximale Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dT_{min}) von H₂-TG und WT

dF/dT _{min}	H ₂ -TG Ktr 1	H ₂ -TG Ktr 2	H ₂ -TG His 1 µM	WT Ktr 1	WT Ktr 2	WT His 1 µM
Ohne PDE-Hemmer	-148±7	-	-352±11#	-161±8	-	-144±7
EHNA 1 µM	-198±22	-194±20	-465±83#	-189±30	-188±30	-173±28
Cilostamid 1 µM	-93±17	-93±18	-414±48#	-92±21	-93±21	-72±15
Rolipram 10 µM	-123±14	-163±23	-420±22#	-109±39	-162 ±37	-181±44
IBMX 10 µM	-94±15	-100±18	-391±41#	-113±21	-170±33	-164±41
Cilo+EHNA	-91±12	-84±11	-305±26#	-134±16	-138±13	-123±11
Roli 10 µM+Cilo	-94±9	-272±41*	-318±35	-155±20	-420±27*	-415±24
Roli 1 µM+Cilo	-116±22	-340±40*	-348±37	-137±19	-346±34*	-347±37
Roli 0,1 µM+Cilo	-121±16	-257±47*	-355±23	-123±20	-269±58	-258±58
Roli 1 µM+EHNA	-76±7	-97±17	-307±16#	-105±19	-144±22	-141±22
Roli 0,1µM+Cilo+EHNA	-81±18	132±32	-307±20#	-101±10	-219±46	-200±47

Tabelle 6 zeigt die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dT_{min}). n=67 (ohne PDE-Hemmer); n=4-7 (mit PDE-Hemmern)

H₂-TG = H₂-transgene Mäuse, WT= Wildtyp; Ktr 1= vor Substanzzugabe Ktr 2= nach Gabe PDE-Hemmer; His = Histamin; EHNA und Cilostamid in Konzentration von 1 µM. dF/dT_{min} in mN/ms ± SEM; Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus den Einzelversuchen. * = signifikanter Unterschied von Ktr 2 gegenüber Ktr 1 (P<0,05), # = signifikanter Unterschied Ktr 2 vs. His 1 µM (p<0,05)

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 H₂-Transgenes Tiermodell

Menschliche Herzmuskelpräparate stehen nur in einem sehr begrenzten Umfang für Versuche zur Verfügung. Die meist aus Operationen stammenden Präparate weisen üblicherweise Vormedikationen und/oder Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems auf, die Ergebnisse verfälschen könnten. Des Weiteren ist die Untersuchung der Chronotropie nur mit intaktem Sinusknoten möglich. Aus diesen Gründen wurde sich für ein Tiermodell entschieden, welches sich zur Untersuchung des humanen H₂-Rezeptors eignet. Damit war es möglich, die Versuche unter standardisierten und damit vergleichbaren Bedingungen durchzuführen. Mittels der Genotypisierung konnten Tiere, die den herzspezifischen Histamin-H₂-Rezeptor aufwiesen (=H₂-TG), von Wildtypen (=WT) unterschieden werden. Jedoch konnte keine Aussage über den Umfang der Expression des Histamin-H₂-Rezeptors getroffen werden, da kommerziell erhältliche Antikörper nicht zwischen WT und H₂-TG unterscheiden (Gergs et al. 2019). Auch eine Quantifizierung des Proteinlevels des endogenen Rezeptors mit Antikörpern war, wie bereits bei der Beschreibung des Mausmodells (Gergs et al. 2019), nicht möglich. Daher konnte nicht analysiert werden, ob die Rezeptordichte des humanen H₂-Rezeptors in den H₂-TG der des menschlichen Herzens entspricht. Des Weiteren ist zu beachten, dass dieses Modell nur H₂-Rezeptor-vermittelte Effekte beschreibt.

Dadurch zeigt sich, dass die Ergebnisse von Tierversuchen nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragbar sind. Es ist jedoch möglich Hinweise auf die Pharmakologie beim Menschen zu ziehen. Außerdem sollen auf den hier dargestellten Befunden aufbauend in Zukunft von der Arbeitsgruppe analoge Versuche beim menschlichen Herzmuskelpräparat durchgeführt werden.

5.1.2 Kontraktionsversuche

Die Kontraktionsversuche wurden am isolierten linken und isolierten rechten Vorhofpräparat durchgeführt. Dadurch konnten Kontraktionskraft und Frequenz getrennt ausgewertet werden. Dabei ist zu beachten, dass dies keine Rückschlüsse auf die jeweiligen Ventrikel bzw. das komplette Herz zulässt. Die Simulation von realen Bedingungen eines in einem lebenden Organismus schlagenden Herzens, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die Stimulation der linken isolierten Vorhofpräparate erfolgte mit einer Frequenz von 1 Hz. Die physiologische Frequenz einer Maus ist jedoch, wie auch in diesen Experimenten, mit über 300 bpm deutlich höher.

Es konnte zu Präparationsfehlern und Schädigungen des Präparats kommen, was insbesondere den für Manipulationen empfindlichen Sinusknoten im rechten Vorhof betraf. Bezüglich der Wahl der PDE-Hemmer könnte man argumentieren, dass 1 μ M EHNA nicht ausreicht, um die Aktivität von PDE2 vollständig zu inhibieren und stattdessen die Nutzung des häufig verwendeten

spezifischen PDE2-Hemmers Bay 60-7750 angebracht gewesen wäre. Es konnte gezeigt werden, dass EHNA bei einer Konzentration von 1 μM mehr als 80 % der PDE2 hemmt und dabei PDE3 und 4 noch nicht inhibiert (Podzuweit et al. 1995). Dies unterstreicht und rechtfertigt die Verwendung von EHNA. Die Auswahl der spezifischen PDE-Hemmstoffe und deren Konzentrationen orientiert sich zudem an vorangegangenen Arbeiten (Afzal et al. 2008; Neumann et al. 2019), und ermöglicht eine Vergleichbarkeit der Experimente.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Einfluss des kardialen H_2 -Rezeptors auf Basalbedingungen

An isoliert perfundierten Herzen war die absolute Kraftentwicklung bei H_2 -TG kleiner als bei WT (Gergs et al. 2019; Gergs et al. 2020). Dies konnte in der vorliegenden Studie für isolierte Vorhofpräparate nicht gezeigt werden.

Die bei H_2 -TG erhöhte Spontanfrequenz im Vergleich zu WT wurde bei Versuchen am isoliert perfundierten Herzen H_2 -transgenerer Mäuse bereits beschrieben (Gergs et al. 2019). Dabei war jedoch die basale Schlagrate der Herzen bei H_2 -TG gegenüber der Frequenz der isolierten rechten Vorhofpräparate deutlich erhöht (Gergs et al. 2019). Einhergehend mit den Befunden der Studie von Gergs et al. (Gergs et al. 2019; Gergs et al. 2021), war in den vorliegenden Experimenten die Rate an basalen Arrhythmien bei H_2 -TG im Vergleich zu WT erhöht. Zusätzlich konnten, anders als bei den Vorbefunden (Gergs et al. 2019; Gergs et al. 2021), ein Geschlechtsunterschied in den Ergebnissen festgestellt werden. Diese Differenzen sowie die Diskrepanzen bei der Basalfrequenz könnten dabei in methodischen Unterschieden begründet liegen. In humanen Vorhofpräparaten hatte Histamin ebenfalls einen proarrhythmogenen Effekt (Levi et al. 1981). Bei H_2 -Knockout-Mäusen, die wie ihre WT-Geschwistertiere verschiedenen Interventionen unterzogen wurden, war die Herzfrequenz in beiden Gruppen niedriger als die ihrer WT-Geschwistertiere (Zeng et al. 2014). Im Gegensatz zu Gergs, der in allen basalen Parametern Unterschiede zwischen H_2 -TG und WT beschrieb (Gergs et al. 2019), wurde in dieser Arbeit nur eine verkürzte Relaxationszeit von H_2 -TG gegenüber WT festgestellt, während sich Anspannungszeit, dF/dT_{max} und dF/dT_{min} zwischen H_2 -TG und WT basal nicht voneinander unterschieden. Dies verdeutlicht, dass sich isolierte Vorhofpräparate anders als linke Ventrikel oder das komplette perfundierte Herz verhalten können und die Ergebnisse dieser Arbeit nicht ohne Weiteres auf das ganze Herz übertragbar sind.

5.2.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Histamin ohne Zugabe von Phosphodiesterase-Hemmstoffen

Der konzentrationsabhängige positiv inotrope und positiv chronotrope Effekt von Histamin an isolierten linken und rechten isolierten Vorhofpräparaten H_2 -TG wurde in früheren Experimenten ebenfalls dargestellt (Gergs et al. 2019). Auch hier wurde bei den WT-Geschwistertieren weder ein positiv inotroper Effekt noch ein positiv chronotroper Effekt festgestellt (Gergs et al. 2019). An isoliert perfundierten Herzen von H_2 -TG konnte nur ein Anstieg der Kontraktionskraft, nicht

aber der Frequenz erfasst werden (Gergs et al. 2019; Gergs et al. 2020). Der scheinbar negativ inotrope Effekt von Histamin auf WT trat auch ohne Einfluss von Histamin auf (Gergs et al. 2019). Er wurde als zeitabhängige Erschlaffung interpretiert, die unabhängig von Histamin auftritt. Dadurch könnte der Einfluss von Histamin auf H₂-TG-Tiere sogar tendenziell unterschätzt werden (Gergs et al. 2019).

5.2.3 Einfluss von PDEs auf Basalbedingungen in linken Vorhöfen

Bei ähnlichen Experimenten unter ähnlichen Bedingungen mit 5-HT₄-transgenen Tieren, zeigte die PDE4-Hemmung durch Rolipram sowohl bei 5-HT₄-transgenen als auch WT-Mäusen einen positiv inotropen Effekt (Neumann et al. 2019). Die aktuellen Befunde (Tabelle 7) stützen den fehlenden Einfluss von Cilostamid und EHNA auf die Basalkraft von WT sowie H₂-TG, was mit den Resultaten für 5-HT₄-TG-Tiere übereinstimmt (Neumann et al. 2019). Der starke positiv inotrope Effekt durch die gemeinsame Hemmung von PDE3 und PDE4 durch Rolipram und Cilostamid war sowohl bei H₂-TG-Mäusen in dieser Arbeit als auch 5-HT₄-TG-Tieren zu beobachten (Afzal et al. 2008; Neumann et al. 2019). In dieser Arbeit konnte kein synergistischer Effekt von der EHNA-Gabe zusätzlich zu Rolipram + Cilostamid auf die Basalkraft am H₂-Rezeptor gezeigt werden. Neumann et al. konnten diesen Effekt jedoch an Serotoninrezeptoren zeigen (Neumann et al. 2019). Dies kann auf unterschiedliche Auswirkungen der PDEs auf die Basalkraft in Abhängigkeit vom Rezeptortyp hindeuten. Rolipram konnte in linken Vorhöfen von Mäusen die basale Kontraktionskraft steigern. Cilostamid dagegen hatte weder im Ventrikel noch im Vorhof Einfluss auf die basale Kontraktionskraft (Galindo-Tovar und Kaumann 2008). Mäuse, die PDE3A-überexprimierten zeigten eine deutlich verringerte Ejektionsfraktion (52,5%) im Vergleich zu Wildtypen (83,9%). Dies impliziert, dass PDE3A1 an der Regulation der Kontraktionskraft beteiligt sein könnte (Oikawa et al. 2013). Die basale Kontraktilität war bei PDE2-überexprimierenden Mäusen höher als bei WT-Geschwistertieren (Vettel et al. 2017). PDE3 und PDE4-Hemmer konnten die basale Kontraktionskraft im linken Vorhof der Ratte nicht steigern (Galindo-Tovar et al. 2009b). In elektrisch stimulierten Ventrikeln von Ratten und unter Anwesenheit von Forskolin, einem nicht-selektiven Stimulator der Adenylylcyclase, zeigten die unselektiven PDE-Hemmer HN-10200 und IBMX die stärkste Effizienz bezüglich des basalen Kraftanstiegs, gefolgt von dem selektiven PDE3-Hemmer Enoximon. Der selektive PDE4-Hemmer Ro 20-1724 hatte keinen Effekt auf die Basalkraft (Kelso et al. 1993). Der PDE2-Hemmer Bay 60-7550 konnte an isolierten Langendorff-Präparationen von Rattenherzen eine Kraftsteigerung bewirken und die durch die PKA(=cAMP-abhängige Proteinkinase)-vermittelte Phosphorylierung von Phospholamban steigern (Wang et al. 2021).

In linken Vorhöfen und Papillarmuskeln von Kaninchen hatten weder Cilostamid noch Rolipram einen Einfluss auf die basale Kontraktionskraft (Kaumann et al. 2009). Auch in linken Vorhofpräparationen von Schweinen konnten weder Cilostamid noch Rolipram die Basalkraft

verändern, jedoch führte die Kombination der beiden PDE-Hemmer zu einem Kraftanstieg (Galindo-Tovar et al. 2009a).

In einer weiteren Arbeit, die die Wirkung von PDE-Hemmern auf die Basalkraft linker Schweinevorhöfe untersuchte, hatten sowohl EHNA als auch die Kombinationen Cilostamid + EHNA, Rolipram + EHNA und Cilostamid + Rolipram keinen Einfluss auf die basale Kontraktionskraft (Weninger et al. 2012). An menschlichen Trabekeln aus dem rechten Vorhof konnten 10 μM Rolipram die basale Kontraktionskraft nicht steigern, es konnte jedoch einen positiv inotropen Effekt von Cilostamid zusätzlich verstärken (Molina et al. 2012).

5.2.4 Einfluss von PDEs auf Basalbedingungen in rechten Vorhöfen

Die hier gezeigten Ergebnisse zum fehlenden positiv chronotropen Effekt von EHNA, Cilostamid und Rolipram auf die Basalfrequenz bei WT und H₂-TG (Tabelle 7) gehen mit vorherigen Befunden einher. Auch bei 5-HT₄-TG-Mäusen, einschließlich WT, hatten die drei selektiven PDE-Hemmer keine positiv chronotrope Wirkung (Neumann et al. 2019). Wie bereits bei 5-HT₄-TG-Mäusen (Neumann et al. 2019) beobachtet, hatte die Hemmung von PDE3 und PDE4 in Kombination einen starken positiv chronotropen Effekt sowohl bei WT als auch H₂-TG zur Folge. Im Gegensatz zu 5-HT₄-TG-Mäusen (Neumann et al. 2019), führte bei H₂-TG-Tieren die Inkubation von Cilostamid + EHNA zum Frequenzanstieg. Ähnlich wie beim positiv inotropen Effekt führte die dreifache PDE-Hemmung bei Serotonin-Mäusen (Neumann et al. 2019) zu einem maximalen Frequenzanstieg, was bei H₂-TG nicht der Fall war. Die eigenen Ergebnisse unterstützen das Resultat von Galindo-Tovar et al., dass EHNA die Herzfrequenz spontan schlagender rechter Mäusevorhöfe nicht erhöht. Bay 60-7550, ein anderer spezifischer PDE2-Hemmer, konnte jedoch bei diesen Experimenten einen positiv chronotropen Effekt hervorrufen (Galindo-Tovar et al. 2016). Die Herzfrequenz von PDE3A1 überexprimierenden Mäusen, war mit 435 bpm deutlich niedriger als die Frequenz ihrer WT-Geschwistertiere (662 bpm) (Oikawa et al. 2013). Demnach ist anzunehmen, dass PDE3A1 zumindest in hohen Konzentrationen an der Regulation der Basalfrequenz beteiligt ist (Oikawa et al. 2013). Eine 10-fache-Überexpression von PDE2 hatte bei Mäusen in vivo eine erniedrigte basale Herzfrequenz im Vergleich zu WT zur Folge (Vettel et al. 2017). In elektrophysiologischen Experimenten bei männlichen C57BL/6 Wildtyp-Mäusen konnte durch die Gabe von 100 μM IBMX die Spontanfrequenz der rechten Vorhöfe ebenfalls erhöht werden (Hua et al. 2012). Interessanterweise konnte die Spontanfrequenz im Sinusknoten schon durch EHNA (10 μM), Milrinon (10 μM) und Rolipram (10 μM) alleine erhöht werden (Hua et al. 2012). Diese Diskrepanz zu den in dieser Arbeit erhobenen Resultaten könnte auf die unterschiedlich hohe Konzentration der PDE-Hemmer, einen anderen spezifischen Hemmstoff (Milrinon vs. Cilostamid), die unterschiedliche Geschlechtsverteilung oder auch auf Unterschiede zwischen den Mäuse-Stämmen zurückgeführt werden (Hua et al. 2012).

In rechten Vorhöfen von Ratten konnte Rolipram als PDE4-Hemmer die Herzfrequenz steigern, während Cilostamid keinen Effekt hatte (Christ et al. 2009; Galindo-Tovar et al. 2009b). Auch in einer anderen Arbeit führten Rolipram und IBMX bei isolierten rechten Vorhöfen von Ratten zu einer Frequenzsteigerung, bei Cilostamid konnte auch bei hohen Konzentrationen nur ein tendenzieller Effekt festgestellt werden (Kaumann et al. 2009). In isolierten rechten Vorhöfen von Kaninchen konnte ein Einfluss sowohl von PDE3 als auch tendenziell von PDE4 auf die basale Herzfrequenz gezeigt werden (Kaumann et al. 2009). In spontan schlagenden Sinusknotenzellen des Kaninchens konnten jeweils Rolipram oder Cilostamid die Schlagfrequenz um 20% erhöhen (Vinogradova et al. 2018b). Eine Kombination von Rolipram und Cilostamid führte zu einer Steigerung der Frequenz um 45%, was einen synergistischen Effekt vermuten lässt (Vinogradova et al. 2018b). In Schweineherzen hatte die Hemmung von PDE4 eine Erhöhung der Schlagfrequenz zur Folge (Galindo-Tovar et al. 2009a). Die größte Frequenzsteigerung bei den rechten Vorhöfen der Schweine wurde durch eine Kombination von PDE3- und PDE4-Hemmern erzielt (Galindo-Tovar et al. 2009a). Eine PDE4-Hemmung steigert im menschlichen Vorhof die spontane Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem SR. Dies führt zu der Annahme, dass PDE4 physiologisch vor dieser Ca^{2+} -Ausschüttung, die wiederum zu spontanen Membrandepolarisationen und Arrhythmien führen kann, schützt (Molina et al. 2012). Der PDE3-Hemmer Milrinon führte zu einer Erhöhung der Herzfrequenz in vivo beim Menschen (Chiu et al. 1999). Für den PDE4-Hemmer Roflumilast, der zur Therapie der COPD verwendet wird, konnte kein Einfluss auf die Schlagfrequenz des menschlichen Herzens gezeigt werden (Rabe 2010).

5.2.5 Einfluss von PDEs auf Histaminwirkung und Vergleich mit anderen positiv inotrop wirkenden Substanzen an linken Vorhöfen

In isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen konnte der unspezifische PDE-Hemmer Theophyllin die Potenz von Histamin über eine Erhöhung der cAMP-Konzentration steigern (Kukovetz et al. 1973). Diese Verschiebung der Histamin-Potenz unter unspezifischer PDE-Inhibition war bei Betrachtung der eigenen Daten (Tabelle 7) bei H_2 -TG nicht zu beobachten. Zur Untersuchung einer möglichen Potenzierung eines positiv inotropen Effekts zur Behandlung der Herzinsuffizienz synthetisierte eine Arbeitsgruppe Substanzen, die sowohl die pharmakologischen Merkmale eines PDE3-Hemmers sowie eines H_2 -Rezeptor-Agonisten enthielten. Zwei dieser Substanzen, N'-(4-[(1,3-dihydro-5-methyl-2H-imidazol-4-yl)-carbonyl]phenyl)-N2-[3-(1H-imidazol-4-yl)propyl]guanidin „65“ und sein 5-Ethyl-Homolog „66“ konnten in isolierten elektrisch stimulierten Papillarmuskeln von Meerschweinchen sowohl die Potenz des Histamins als auch die maximale Kraftzunahme im Vergleich zu dem PDE3-Hemmer Enoximon steigern (Glaß et al. 1995). In Papillarmuskeln von Kaninchen waren in der Anwesenheit von IBMX die Effekte von Histamin schon bei kleineren Konzentrationen zu beobachten, der Maximaleffekt stieg an, der EC_{50} -Wert der Kontraktionskraft nahm jedoch nur leicht ab (Elizalde et al. 1986). Die Resultate dieser Studie an isolierten Vorhofpräparaten von

H₂-TG zeigten keinen Einfluss von IBMX auf den EC₅₀-Wert sowie auf die maximal entwickelte Kontraktionskraft von Histamin, es wurden aber teilweise andere Konzentrationen von IBMX und Histamin für die Experimente verwendet. Rolipram verursachte bei 5-HT₄-TG-Mäusen eine Verschiebung zu niedrigeren Konzentrationen der KWK bei Serotonin (Neumann et al. 2019). Die eigenen Befunde konnten eine ähnliche Verschiebung des EC₅₀-Wertes zu kleineren Histaminkonzentrationen durch Rolipram bei H₂-TG zeigen. Auch die bei 5-HT₄-TG beobachtete Verschiebung zu höheren Konzentrationen der Serotonin-KWK unter EHNA-Einfluss (Neumann et al. 2019) war bei Histamin an linken Vorhöfen von H₂-TG zu beobachten. Das Ergebnis der vorliegenden Studie, wonach Cilostamid bei H₂-TG eine Verschiebung zu niedrigeren Konzentrationen des Histamin-EC₅₀-Wertes verursachte (Tabelle 2), ist überraschend. Bei 5-HT₄-TG-Mäusen hatte der PDE3-Hemmer den gegenteiligen Effekt, nämlich eine Verschiebung zu höheren Konzentrationen der Serotonin-KWK, zur Folge (Neumann et al. 2019). Dies deutet darauf hin, dass die Aufhebung des positiv inotropen Effekts von Histamin und Serotonin über verschiedene PDE-Subtypen gesteuert werden. In Einklang mit Serotonin (Neumann et al. 2019) kam es auch bei der Histamin-KWK unter Wirkung von Rolipram und Cilostamid zu einer Verschiebung der KWK zu niedrigeren Konzentrationen, wenn der maximale Krafteffekt durch zu hohe Konzentrationen noch nicht erreicht wurde (Tabelle 2). PDE2- und PDE3-Hemmung verursachten bei Serotonin eine Verschiebung zu höheren Konzentrationen der Kurve, während sie bei Histamin eine Verschiebung zu niedrigeren Konzentrationen der Histamin-KWK bewirkten. Auch dies deutet daraufhin, dass eine Kombination verschiedener Subtypen den Effekt von Serotonin und Histamin auf verschiedene Weise steuert. Auch Histamin konnte, wie Serotonin (Neumann et al. 2019), weder nach Gabe von einzelnen PDE-Hemmern noch bei den getesteten Kombinationen einen bisher unbekanntem positiv inotropen Effekt bei WT hervorrufen. PDE4-Hemmung erhöhte die Potenz des positiv inotropen Effekts von Adrenalin in linken Vorhöfen sowie Ventrikeln von Mäusen, während dieser Effekt bei der PDE3-Hemmung durch Cilostamid nicht zu beobachten war (Galindo-Tovar und Kaumann 2008). Die gemeinsame Hemmung von PDE3 und PDE4 führte zur Aufdeckung eines funktionellen β_2 -Adrenorezeptors im linken Atrium der Mäuse. Dies lässt vermuten, dass unter physiologischen Umständen der Synergismus von PDE3 und PDE4 die Manifestation eines funktionellen β_2 -Adrenorezeptor-vermittelten Effekts dort verhindert (Galindo-Tovar und Kaumann 2008). Während die alleinige Applikation von Cilostamid keine Änderung der (-)-CGP12177-Potenz in linken Vorhöfen von Ratten hervorrief, wurde bei der Kombination der PDE3 und PDE4-Hemmung eine Steigerung der inotropen Potenz beobachtet (Galindo-Tovar et al. 2009b). Vargas et al gehen davon aus, dass PDE3 und PDE4 im Ventrikel von Ratten den positiv inotropen Effekt von CGP12177 beenden, während für die Regulation des positiv inotropen Effekts von Noradrenalin nur PDE4, aber nicht PDE3, Relevanz besitzt (Vargas et al. 2005). Obwohl eine verstärkte Aktivität der cAMP-Hydrolyse durch PDE2 nach Isoprenalin-Gabe bei Ratten im linken Ventrikel festgestellt wurde, konnten PDE2-Hemmer den positiv inotropen Effekt von Noradrenalin und Adrenalin nicht

verstärken (Galindo-Tovar et al. 2018). PDE4, nicht aber PDE3, soll dem β_1 -Adrenorezeptor-vermittelten positiv inotropen Effekt im Rattenherzen entgegenwirken (Christ et al. 2009). Cilostamid und Rolipram konnten in Vorhöfen und Ventrikeln von Kaninchen den positiv inotropen Effekt von Noradrenalin potenzieren (Kaumann et al. 2009). Bei menschlichen Herzmuskelzellen wurde festgestellt, dass PDE3 stärker als PDE4 für die Regulierung des β_1 -Adrenorezeptor-vermittelten Effekts zuständig ist, jedoch eine Kombination aus PDE3 und PDE4 am potentesten ist (Molina et al. 2012).

In insuffizienten humanen Trabekeln konnte Cilostamid den positiv inotropen Effekt sowie positiv lusitropen Effekt von Noradrenalin und Adrenalin potenzieren, während Rolipram keinen Einfluss auf die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin hatte (Molenaar et al. 2013). In Ventrikelpreparaten der Ratte und des Menschen zeigte die Applikation von Serotonin keinen positiv inotropen Effekt, jedoch konnte durch Cilostamid sowie die Kombination von Rolipram und Cilostamid sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte ein positiv inotroper Effekt von Serotonin demaskiert werden (Afzal et al. 2008; Galindo-Tovar et al. 2009a). Bei Wildtyp-Mäusen, die den kardialen H_2 -Rezeptor nicht überexprimieren, konnte bei den Versuchen dieser Arbeit kein bisher versteckter und unbekannter Histamineffekt durch die Gabe von PDE-Hemmern auf die Kontraktionskraft aufgedeckt werden.

5.2.6 Einfluss von PDEs auf Histaminwirkung und Vergleich mit anderen positiv chronotrop wirkenden Substanzen in rechten Vorhöfen

Die Kombination von Rolipram und EHNA konnte in Vorbefunden keine Verschiebung des EC_{50} -Wertes der Frequenz bei Serotonin zeigen (Neumann et al. 2019). In dieser Arbeit (Tabelle 7) konnte jedoch eine Verschiebung zu niedrigeren Konzentrationen der Histamin-Kurve durch PDE2- und PDE4-Hemmung beobachtet werden. Während die Frequenz bei Neumann et al. nach der dreifachen Hemmung der PDEs nicht mehr gesteigert werden konnte, war dies bei den eigenen Daten möglich und es konnte eine Verschiebung zu niedrigeren Konzentrationen des Histamineffekts beobachtet werden. Weder Histamin (in der vorliegenden Arbeit) noch Serotonin (Neumann et al. 2019) konnten nach Gabe von einzelnen PDE-Hemmern oder den getesteten Kombinationen einen lavierten positiv chronotropen Effekt in rechten isolierten Vorhofpreparaten von WT hervorrufen. PDE3- und PDE4-Hemmung hatten keinen Einfluss auf den positiv chronotropen Effekt von Adrenalin im Sinusknoten von Mäusen (Galindo-Tovar und Kaumann 2008). Weder die beiden PDE2-Hemmer EHNA und Bay 60-7550 noch Cilostamid oder Rolipram konnten den positiv chronotropen Effekt von Prostaglandin E1 in rechten Mäusevorhöfen aufheben (Galindo-Tovar et al. 2016). Nach chronischer Vorbehandlung mit Isoprenalin in Mäusen stieg die Frequenz nach Gabe von Dobutamin durch den PDE-Hemmer BAY 60-7550 noch einmal zusätzlich an, während bei PDE2-TG-Mäusen, die maximale Herzfrequenz durch Dobutamin reduziert war (Vettel et al. 2017). PDE2-TG-Mäuse zeigten unter Isoprenalin-Stimulation zwar den gleichen absoluten Frequenzanstieg, jedoch reduzierte sich die

Zahl der Arrhythmien im Vergleich zu WT (Vettel et al. 2017). Eine Kombination von PDE3- und PDE4-Hemmern konnte in rechten Vorhöfen von Ratten die frequenzerhöhende Potenz von (-)-CGP12177 nicht steigern (Galindo-Tovar et al. 2009b). PDE2-Hemmung durch EHNA oder Bay 60-7550 konnte die Effekte von Katecholaminen nicht verstärken (Christ et al. 2009). Weder PDE3- noch PDE4-Hemmung konnte den positiv chronotropen Effekt von Katecholaminen am β 1- und β 2-Rezeptor in rechten Rattenvorhöfen potenzieren (Christ et al. 2009). Eine weitere Untersuchung von Kaufmann et al. ergab, dass weder PDE3 und PDE4 in Kaninchen, noch PDE1-5 in Ratten Einfluss auf eine β 1-Adrenorezeptor-vermittelte Tachykardie hatten (Kaumann et al. 2009). In Trabeklen rechter menschlicher Vorhöfe verursachte die Gabe von Rolipram unter β -Rezeptor-Stimulation eine Zunahme an Arrhythmien, was wiederum auf eine Rolle der PDE4 bei Verhinderung von Arrhythmien hindeutet (Molina et al. 2012).

Tabelle 7: Synopsis der Rolle von PDEs in isolierten Vorhofpräparaten von WT und H₂-TG

	Basale Kraft TG	Basale Kraft WT	EC 50 Kraft TG	Basale Frequenz TG	Basale Frequenz WT	EC 50 Frequenz TG
PDE2-Hemmung	0	0	↑	0	0	0
PDE3-Hemmung	0	0	↓	0	0	0
PDE4-Hemmung	↑	↑	↓	0	0	0
Unselektive PDE-Hemmung	0	↑	0	↑	↑	0
PDE2+3-Hemmung	0	0	↓	↑	0	0
PDE2+4-Hemmung	0	↑	↓	↑	↑	↓
PDE3+4-Hemmung	↑	↑	↓	↑	↑	0
PDE2+3+4-Hemmung	0	↑	↓	↑	↑	↓

Anstieg (↑), Verringerung (↓) oder keine Veränderung (0) der basalen Kontraktionskraft der linken isolierten Vorhofpräparate (Kraft), Grundfrequenz der rechten isolierten Vorhofpräparate oder der EC₅₀-Werte der Histamingabe nach Hemmung der entsprechenden PDEs.

5.3 Fazit

Die Resultate dieser Arbeit legen nahe, dass ein Zusammenspiel aus PDE3- und PDE4-Wirkung, und eventuell auch PDE2, für die Regulation der Grundfrequenz in Vorhöfen von WT und H₂-TG-Mäusen verantwortlich sein könnte (Abb. 17). Es besteht größtenteils Einigkeit darüber, dass PDEs bei der Regulierung der Herzschlagrate eine Rolle spielen, doch wie genau PDEs Einfluss auf die Basalfrequenz nehmen, ist noch nicht vollständig erforscht (Vinogradova et al. 2018a). Daten aus Versuchen mit Kaninchen zeigen, dass PDE3A, PDE4B und PDE4D die am häufigsten vorkommenden Isotypen in Sinuskontenzellen in dieser Spezies sind (Vinogradova et al. 2018b). Die Regulation der basalen Herzfrequenz durch die gemeinsame Wirkung von PDE3 und PDE4 findet über eine Verminderung der cAMP/PKA Phosphorylierung, Unterdrückung lokaler subsarkolemmaler Ca²⁺-Freisetzung sowie Verlängerung des Ca²⁺-Freisetzungszyklus‘

(Vinogradova et al. 2018b) statt. Über diesen Mechanismus könnten PDE3 und PDE4 also die Herzfrequenz senken.

In vorhergegangenen Studien konnte keine Potenzierung eines G_s -vermittelten positiv chronotropen Effekts über eine Hemmung der PDE2, PDE3 oder PDE4 erzielt werden (Galindo-Tovar und Kaumann 2008; Christ et al. 2009; Galindo-Tovar et al. 2009b; Kaumann 2011; Galindo-Tovar et al. 2016). Galindo-Tovar et al. vermuten deshalb, dass PDE2, PDE3 und PDE4 zwar die basale Schlagrate beeinflussen können, jedoch bei der Regulation des positiv chronotropen Effekts über den G_s -Rezeptor keine Rolle spielen (Galindo-Tovar et al. 2016). Die Befunde der vorliegenden Studie stimmen insofern mit den oben genannten Ergebnissen überein, dass PDE2-, PDE3- und PDE4-Hemmer alleine keine Wirkung auf den positiv chronotropen Effekt des Histamins haben. Die Kombination von PDE2- und PDE4-Hemmstoffen sowie PDE2-, PDE3- und PDE4-Hemmern führte jedoch durchaus zu einer signifikanten Verschiebung zu niedrigeren Konzentrationen der Histamin-KWK. Demnach könnte nur das Zusammenspiel der verschiedenen PDEs einem G_s -vermittelten cAMP-Anstieg entgegenwirken. Eine weitere Erklärung dieser Unterschiede könnten verschiedene cAMP-Kompartments in der Zelle sein. cAMP-Kompartments wurden entdeckt, nachdem beobachtet wurde, dass cAMP rezeptorspezifisch unterschiedliche Effekte auslösen kann (Hayes et al. 1980). Die Kompartimentalisierung des cAMP-Signalweges fördert rezeptorspezifische Antworten auf Stimuli indem es die Anzahl und Identität von PKA-Substraten, die als Antwort auf die spezielle Rezeptorbindungen phosphoryliert werden, auf eine bestimmte subzelluläre Lokalisation einschränkt (Fertig und Baillie 2018). Die örtliche und zeitliche Regulierung des cAMP-Spiegels in den verschiedenen Kompartiments wird u. a. von PDEs mit ihren verschiedenen subzellulären Lokalisationen übernommen, die in den verschiedenen Kompartimenten spezielle cAMP-Gradienten aufbauen können und so zur Spezifität der Stimuli führen (Baillie 2009). Auch im Herzen wurde die Rolle der cAMP-Kompartments nachgewiesen (Zaccolo und Pozzan 2002; Plouffe et al. 2020). Entscheidend für die räumliche und zeitliche Regulierung durch Kompartimente sind sogenannte cyclische Nukleotid-Signalosomen. In diesen Signalosomen bilden einzigartige Kombinationen aus Effektoren cyclischer Nukleotide (z.B. PKAs, EPACs, PKGs, Cyclische Nucleotid-gesteuerte Ionenkanäle) PDE-spezifische Komplexe, die durch Protein-Protein-Interaktion untereinander oder Interaktion mit Gerüstproteinen, wie z.B. Ankerproteine der Proteinkinase A oder β -Arrestin, zustande kommen (Maurice et al. 2014). Als Komponenten dieser Signalosomen, können PDEs dann die Diffusion und den Abbau von cyclischen Nukleotiden innerhalb lokal begrenzter und zeitlich getrennter Kompartimente modulieren und die Diffusion der cyclischen Nukleotide in benachbarte Kompartimente verhindern (Maurice et al. 2014). In Sinusknotenzellen von Kaninchen befindet sich PDE3A bei α -Aktinin und die PDE4D bei der SERCA (=Ca²⁺-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums) sowie Phospholamban in den Z-Linien und könnte so die basale Herzfrequenz regulieren (Vinogradova et al. 2018b). Ob die Beendigung rezeptorabhängiger Effekte auf die Frequenz

durch einen PDE-abhängigen Mechanismus oder gar die gleichen PDEs wie bei der Regulation der Basalfrequenz unterliegt, ist fraglich (Christ et al. 2009). In einer Studie, in der die zellulären Wirkungen der PDE2 nach Isoprenalingabe untersucht wurden, konnten die beobachteten antiarrhythmischen Effekte der PDE2-überexprimierenden Kardiomyozyten auf die reduzierte Aktivität der cAMP-abhängigen Epac/CaMKII-Axe zurückgeführt werden (Wagner et al. 2021). Dies suggeriert eine Beteiligung der PDE2 in der Attenuierung β -Adrenorezeptor-vermittelter Effekte. In einer Studie an humanen Vorhofkardiomyozyten konnte der unselektive PDE-Hemmer IBMX in Kombination mit dem PDE8-Hemmer PF-04957325 abhängig vom Kompartiment unterschiedlich hohe Anstiege des cAMP-Spiegels in Vorhofkardiomyozyten mit Vorhofflimmern und der Kontrollgruppe bewirken (Reinhardt et al. 2021). Diese Resultate weisen darauf hin, dass β -Adrenorezeptor-vermittelte Signalwege in humanen Vorhofkardiomyozyten in Kompartimente unterteilt sind und durch PDEs reguliert werden (Reinhardt et al. 2021). In ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte wird vermutet, dass PDE2 und PDE3 für die Kompartimentierung des β 2-Adrenorezeptor-vermittelten cAMP-Anstiegs verantwortlich sind (Rudokas et al. 2021). Es wäre aber auch plausibel, wenn rezeptorvermittelte Tachykardie PDE-unabhängig beendet wird. Dies könnte zum Beispiel durch cyclische Nukleotid-Transporter geschehen, die cAMP aus der Zelle befördern und somit den Effekt beenden könnten (Galindo-Tovar et al. 2018). Zumindest ist es in Zusammenschau der Studien wahrscheinlich, dass der histaminvermittelte positiv chronotrope Effekt durch ein anderes Kompartiment als zum Beispiel β -Adrenorezeptor-vermittelte Effekte reguliert wird und möglicherweise PDEs bei Histamin eine bedeutendere Rolle spielen, auch wenn die Wirkung von cyclischen Nukleotid-Transportern nicht ausgeschlossen werden kann.

Basalbedingungen: H_2 -TG



Effekte von Histamin bei H_2 -TG

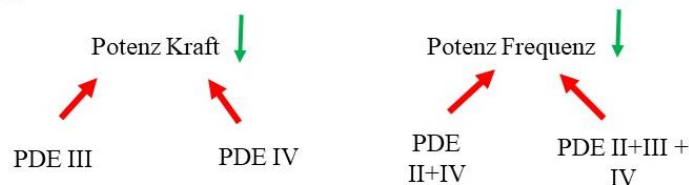


Abb. 17: Zusammenfassung der Effekte von Phosphodiesterasen (PDEs)

Vereinfachte hypothetische Darstellung welche PDEs unter Basalbedingungen (also in Abwesenheit von Histamin) für die Regulation der Kontraktionskraft im linken Vorhof oder der Frequenz im rechten Vorhof verantwortlich sein könnten (obere Hälfte). In der unteren Hälfte des Schemas ist der vermutete Einfluss von PDEs auf die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Histamin dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass die

basale Kontraktionskraft vermutlich entweder durch PDE4 allein oder gemeinsam durch PDE3 und PDE4 gesenkt werden kann. Dagegen kann die Potenz von Histamin (Verschiebung der Kurve zu höheren Konzentrationen) im linken Vorhof wahrscheinlich sowohl durch PDE3 also auch PDE4 alleine gesenkt werden. Die Regulation der Frequenz unterscheidet sich dabei mutmaßlich von der des linken Vorhofs: Vermutlich kann nur die gemeinsame Wirkung von PDEs die basale Frequenz oder die Potenz des Histamins auf die Frequenz im rechten Vorhof beeinflussen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass sowohl bei WT-Mäusen als auch bei H₂-Rezeptor-überexprimierenden Tieren vor allem die PDE4 zur Regulierung der basalen Kontraktionskraft in linken Vorhöfen verantwortlich ist. Die Resultate legen nahe, dass die alleinige PDE3-Wirkung keinen Einfluss auf die Kontraktionskraft hat, während jedoch die Kombination von PDE3 mit der PDE4 einen synergistischen Effekt zeigt. Bei adulten Rattenventrikeln konnte der synergistische Effekt von PDE3 und PDE4 auf subzellulärer Ebene auf die synergistische Induktion der Protein-Phosphorylierung der elektromechanischen Kopplung zurückgeführt werden (Mika et al. 2012). Dagegen scheint die PDE2 in isolierten Vorhofpräparaten von Mäusen keinen Einfluss auf die Regulation der basalen Kontraktionskraft zu haben.

Die Daten suggerieren, dass sowohl PDE3 als auch PDE4 den funktionellen Effekt des Histamins auf die Inotropie in H₂-transgenen Kardiomyozyten der Maus antagonisieren können. Die PDE2 spielt dabei höchstwahrscheinlich keine Rolle. Da auch bei der PDE-abhängigen Regulation der Inotropie Unterschiede von Histamin zu anderen rezeptorvermittelten positiv inotropen Effekten zu beobachten sind, liegt die Vermutung nahe, dass auch bei Regulierung der Kontraktionskraft diskrete cAMP-Pools in Kompartimenten eine Rolle spielen. Die genaue Verteilung der PDE-Isoenzyme und deren assoziierten Proteine in Signalosomen in Kardiomyozyten sowie deren Einfluss auf die Kontraktionskraft wird zunehmend erforscht (Maurice et al. 2014; Bobin et al. 2016; Kokkonen und Kass 2017; Abb. 18). Die in der Plasmamembran lokalisierte PDE2A soll Komplexe mit der PMCA4 (=Plasmamembran-Calciumpumpe 4), der regulatorischen Untereinheit II der cAMP-abhängige Proteinkinase, dem RYR (=Ryanodinrezeptor), L-Typ-Calcium-Kanälen und der PKG eingehen und somit die kardiale Kontraktilität beeinflussen (Mohamed et al. 2011). Untersuchungen ergaben, dass bei der Regulierung der basalen Herzkraft die PDE3A das vorherrschende Isoenzym der PDE3 ist. Die PDE3A assoziiert in der Mikrodomäne des sarkoplasmatischen Retikulums mit der SERCA2a, Phospholamban, dem Ankerprotein der Proteinkinase A 18, der regulatorischen Untereinheit II der cAMP-abhängige Proteinkinase sowie der Proteinphosphatase 2 in einem makromolekularen Komplex. Bei Mäusen ohne PDE3A war 85% weniger PDE3-Aktivität festzustellen und die Phospholamban-Phosphorylierung, die SERCA2a-Aktivität sowie die Phosphorylierung des Ryanodin-Rezeptors waren gesteigert (Beca et al. 2013). Sowohl PDE4B als auch PDE4D wurden in Komplexen mit dem L-Typ-Ca²⁺-Kanal in Kardiomyozyten nachgewiesen, wobei die PDE4B hauptsächlich für die Regulation des Kanals verantwortlich zu sein scheint (Leroy et al. 2011). Die PDE4D3 ist mit

dem kardialen Ryanodin-Rezeptor-Komplex assoziiert und steuert so die elektromechanische Kopplung der Kardiomyozyten (Lehnart et al. 2005). Reduzierte Aktivität der PDE4D soll zu einem fehlerhaften RyR2-Kanal führen und wird mit Herzinsuffizienz und Arrhythmien in Verbindung gebracht (Lehnart et al. 2005).

Somit greifen PDE3A, PDE4B und PDE4D als Komponente verschiedener Signalosomen jeweils in verschiedenen Phasen der calciumvermittelten elektromechanischen Kopplung von Kardiomyozyten ein (Bers 2002; Maurice et al. 2014). So soll PDE4B den cAMP-PKA-stimulierten Ca^{2+} -Einstrom, PDE4D die Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum und die PDE3A die erhöhte Akkumulation von Ca^{2+} im SR regulieren (Maurice et al. 2014). Darüber hinaus bilden die PDE4D Komplexe mit β -Arrestin (Baillie et al. 2003), PDE4D5, PDE4D8, PDE4D9 bilden einen Komplex mit dem β 2-Adrenorezeptor (Arcangelis et al. 2009) und die PDE4D3 befindet sich in einem Signalosom im Zellkern (Dodge-Kafka et al. 2005).

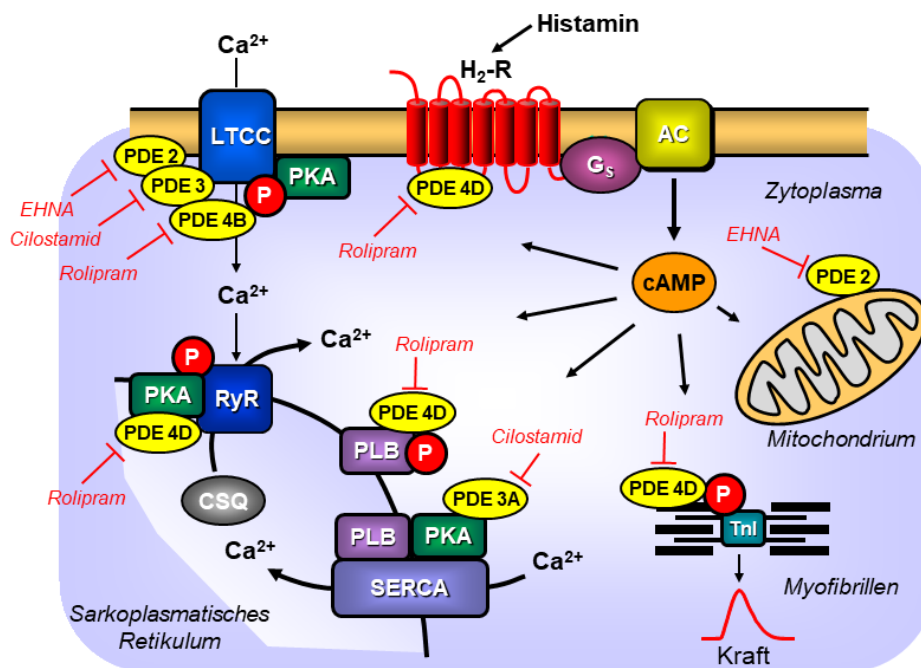


Abb. 18: Vermutete intrazelluläre Lokalisation von PDE-Isoenzymen im H_2 -Rezeptor-vermittelten Signalweg

PDE2, 3, 4 (=Phosphodiesterasen) sind vermutlich bei LTCC (=spannungsabhängiger L-Typ-Calciumkanal), PDE3 und PDE4 in der Nähe von Phospholamban, PDE4 bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren, RYR (=Ryanodinrezeptor) und Myofibrillen lokalisiert, PDE2 ist auch im Zytosol vorzufinden. PDE3 und PDE4 sind auch am Zellkern anzufinden (hier nicht dargestellt) (Neumann et al. 2021c).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass hauptsächlich PDE4 aber auch teilweise PDE3 für die Regulation der basalen Kontraktionskraft zuständig ist, lassen sich demnach gut mit den vermuteten subzellulären Lokalisationen der PDEs vereinbaren. Auch die Antagonisierung der Histaminwirkung in H_2 -Rezeptor-überexprimierenden Tieren durch PDE3 und PDE4 scheint

plausibel auch wenn es nicht klar ist ob die PDE4 ähnlich wie beim β -Adrenorezeptor mit dem Histaminrezeptor direkt einen Komplex bildet. Insgesamt scheint aber der überexprimierte H_2 -Rezeptor die Wirkung von PDEs auf basale Kontraktionskraft und Frequenz kaum zu beeinflussen, da sich die Reaktionen auf PDE-Hemmer kaum von denen der WT unterschied. Bei WT konnte durch keinen PDE-Hemmer oder Kombinationen von PDE-Hemmern ein laviertes positiv inotroper Effekt oder positiv chronotroper Effekt durch Histamin hervorgerufen werden. Zu klären ist jedoch, wie die Hemmung der PDE2 die Potenz von Histamin reduzieren konnte. PDE3 kann ebenfalls cGMP hydrolysieren (Maurice et al. 2014). Somit kann eine PDE3-Hemmung den cGMP-Spiegel im Herzen steigern (Maurice et al. 2014), worauf cGMP allosterisch die Aktivität der PDE2 stimulieren könnte (Martins et al. 1982). Des Weiteren würde ein steigender cAMP-Spiegel die cAMP-abhängige Proteinkinase A stimulieren, die wiederum zu einer Phosphorylierung führt und damit Aktivierung der PDE3 und PDE4 bewirkt (Smith et al. 1991; MacKenzie et al. 2002). Somit könnte die PDE2-Hemmung durch EHNA in bestimmten, für die Inotropie verantwortlichen, subzellulären Kompartimenten den cAMP-Spiegel steigern. Dies könnte über die subsequente Aktivierung der cAMP-anhängigen Proteinkinase und PDE3 und PDE4 wiederum den cAMP-Spiegel in einem Kompartiment senken, dass normalerweise den positiv inotropen Effekt nach Stimulation des H_2 -Rezeptors durch Histamin vermitteln würde. Auf diese Weise könnte eine PDE2-Hemmung den Effekt von Histamin indirekt abschwächen.

In Mäuseherzen ist PDE4 die vorherrschende Phosphodiesterase und sie ist für 60% der cAMP-Hydrolyse-Aktivität verantwortlich (Osadchii 2007). Damit liegt ein entscheidender Unterschied zu menschlichen Kardiomyozyten vor, wo die PDE3 die aktivste cAMP-hydrolysierende PDE ist, gefolgt von PDE4 mit ungefähr 15% (Molina et al. 2012). PDE4A, PDE4B und PDE4D kommen im menschlichen Vorhof vor, dabei stellt die PDE4D den größten Anteil der PDE4-Isoformen dar (Molina et al. 2012). Es wird dadurch wiederum deutlich, dass sich Ergebnisse von Tierexperimenten nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragen lassen. Ebenfalls darf der Unterschied in der PDE-Verteilung in verschiedenen Regionen des Herzens nicht vernachlässigt werden. So wurden in Zellen des Sinusknotens, dem rechten Vorhof und dem rechten Ventrikel örtlich unterschiedlich hohe Expressionen von jeweils PDE3A, PDE3B sowie PDE4A, PDE4B und PDE4D gemessen (Hua et al. 2012).

5.4 Klinische Bedeutung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Einblick in die Regulationsfunktion der einzelnen PDEs auf die Histaminwirkung an linken und rechten Vorhöfen von H_2 -Rezeptor-transgenen Mäusen. Experimente am gesamten Herzen sind vor allem hinsichtlich der verschiedenen Expressionsmuster von H_2 -Rezeptoren in Vorhof und Ventrikel und der möglicherweise unterschiedlichen PDE-Verteilung zukünftig unabdingbar. Diese Untersuchungen könnten beispielsweise am isoliert perfundierten Herzen nach Langendorff-Technik durchgeführt werden. In Hinblick auf die Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies wäre es wünschenswert, Daten

von humanen Operationspräparaten zu gewinnen. Des Weiteren würden biochemische Daten zu den vorliegenden Experimenten die Ergebnisse dieser Arbeit in wertvoller Weise komplementieren. So könnte beispielsweise untersucht werden, ob durch PDEs verursachte Kontraktionskraft- und Frequenzveränderungen auch mit einer entsprechenden Änderung von Proteinphosphorylierungen insbesondere von Phospholamban oder bestimmten Ionenkanälen einhergehen.

Auch die Rolle von PDEs bei Herzinsuffizienz bedarf weiterer Forschung. Eine zentrale Frage ist, welchen Einfluss PDEs und die Veränderung der Genexpression verschiedener PDEs bei Herzinsuffizienz haben (Calamera et al. 2022). Während PDE3-Hemmer teilweise noch als Reservemedikament für akute Herzinsuffizienz verwendet werden, gibt es Hinweise dafür, dass eine PDE3-Hemmung bzw. Reduzierung des PDE3A-Spiegels zu Apoptose in Kardiomyozyten führen kann und damit eventuell eine Rolle bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielen könnte (Ding et al. 2005). Außerdem konnte bei PDE3A-überexprimierenden Mäusen festgestellt werden, dass die PDE3A1 vor einer Schädigung durch Ischämie und Reperfusion schützen kann (Oikawa et al. 2013). PDE2-Überexpression bei Mäusen schützte nach Myokardinfarkt vor frühem Tod, Arrhythmien und Verminderung der Herzfunktion (Vettel et al. 2017). Die schützende Rolle der PDE2 vor potentiell tödlichen Arrhythmien könnte eine neue intrazelluläre antiarrhythmische Therapiestrategie bei Herzinsuffizienz darstellen (Wagner et al. 2021). Eine Überexpression von PDE4B in Mäusen konnte den kardiotoxischen Folgen einer chronischen β -Adrenorezeptor-vermittelten Stimulation und damit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz entgegenwirken (Karam et al. 2020). In Mäusen mit Herzmuskelhypertrophie konnte eine subzelluläre Umverteilung von PDE2, PDE3 und PDE4 beobachtet werden, was vor allem mit einem deutlichen Verlust des PDE4-Spiegels einherging (Berisha et al. 2021).

Krankheitsabhängige Veränderung der PDE-Expressionsmuster (Nakano et al. 2017; Garnier et al. 2021) sollten zukünftig eine größere Rolle in der Forschung zu PDEs einnehmen, um die Pathogenese verschiedener Erkrankungen genauer zu verstehen und eventuell gezielte Therapeutika zu entwickeln. Auch die geschlechterspezifische Analyse der PDE-Vorkommen und Wirkungen sollte in zukünftigen Studien verstärkt in Betracht gezogen werden.

Um die Funktionsweise der PDEs im Herzen genauer zu verstehen, ist es essentiell nicht nur zwischen den PDE1-11 zu unterscheiden, sondern auch die verschiedenen Isoformen der PDEs in ihren unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten genauer zu betrachten (Fertig und Baillie 2018). Dafür werden spezifische Hemmer benötigt, um Physiologie und Pathophysiologie der PDE-Isoformen in Herzkreislauf-Erkrankungen genauer zu analysieren. Dieses Wissen könnte perspektivisch dafür genutzt werden, um PDEs und sogar die betreffenden Signalosomen spezifischer zu aktivieren oder zu blockieren, um so effektivere Therapeutika mit weniger unerwünschten Nebenwirkungen zu generieren (Blair und Baillie 2019). Damit könnte der therapeutische Effekt verschiedener PDE-Hemmer, wie bei COPD oder Herzinsuffizienz genutzt

werden, ohne, dass es zu Nebenwirkungen wie potentiell tödlicher Arrhythmien bei Milrinon (Packer et al. 1991) kommen muss.

In Zukunft wird die Erforschung der Bedeutung des Histamins und insbesondere des H₂-Rezeptors in Bezug auf die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz eine hohe Relevanz besitzen. Bei chinesischen Studienteilnehmenden konnte eine Assoziation mit dem rs2241562-Polymorphismus des H₂-Rezeptors (Leary et al. 2018) sowie dem rs3787429-Polymorphismus des H₃-Rezeptors und dem Risiko an einer chronischen Herzinsuffizienz zu erkranken gezeigt werden (He et al. 2016). Diese Befunde könnten die Möglichkeit einer gezielteren Prävention und Therapie liefern (He et al. 2016). In Mäusen, die den humanen H₂-Rezeptor überexprimieren, ist die Rolle des H₂-Rezeptors abhängig vom Kontext zu betrachten (Gergs et al. 2020). So hatte der H₂-Rezeptor bei Proteinphosphatase-2-überexprimierenden Mäusen mit genetisch induzierter kontraktile Dysfunktion sowie bei isolierten Vorhofpräparaten unter Hypoxie einen protektiven Effekt (Gergs et al. 2020). Dahingegen wurde eine schädliche Rolle bei Ischämie des gesamten isoliert perfundierten Herzens sowie bei Bakterientoxin-induzierter Herzinsuffizienz beobachtet (Gergs et al. 2020). Auch die Entwicklung eines kardiomyozyten-spezifischen H₂-Rezeptor-Agonisten oder -Antagonisten könnte in Zukunft eine Rolle spielen und neue Therapiemöglichkeiten eröffnen (Neumann et al. 2021b). In einer multiethnischen longitudinalen Studie konnte die Einnahme von H₂-Rezeptorantagonisten mit der Erniedrigung der Inzidenz von Herzinsuffizienz assoziiert werden (Leary et al. 2016). Eine systematische Übersichtsarbeit zeigte einen negativ chronotropen und inotropen Effekt von H₂-Rezeptorantagonisten sowie eine Senkung des Blutdrucks bei Herzinsuffizienz und eine Erhöhung der Präejektionsperiode (Zhang et al. 2018). Diese Effekte könnten ähnlich wie β -Adrenorezeptorenblocker den myokardialen Sauerstoffverbrauch reduzieren und damit zu einer Verbesserung der Symptomatik der chronischen Herzinsuffizienz beitragen (Zhang et al. 2018). Es bedarf weiterer Daten zum Nutzen einer Histamin-H₂-Rezeptorblockade bei Herzinsuffizienz sowie Studien zur genauen Bedeutung des Histamins bei der Entstehung kardialer Dysfunktionen, um den therapeutischen und klinischen Nutzen einschätzen zu können (Levick 2021).

6 Zusammenfassung

Das biogene Amin Histamin ist an verschiedensten Vorgängen im menschlichen Körper beteiligt. Am menschlichen Herzen hat Histamin über den H₂-Rezeptor eine Steigerung der Kontraktionskraft sowie der Herzfrequenz zur Folge. Die Wirkung des Histamins am Herzen wird unter anderem über einen intrazellulären Anstieg des sekundären Botenstoffs cAMP verursacht. Phosphodiesterasen können cAMP zu 5'-AMP abbauen und so cAMP-vermittelte Effekte beenden. Welche Phosphodiesterasen die Effekte des Histamins am Herzen beeinflussen, ist aktuell noch unzureichend erforscht. Um sich dieser Frage anzunähern, wurden in dieser Arbeit Experimente mit spezifischen Hemmern der für die im Herzen relevantesten PDEs (PDE2, PDE3 sowie PDE4), Kombinationen dergleichen sowie einem unspezifischen PDE-Hemmer durchgeführt und deren Wirkung auf Histamin-vermittelte Effekte untersucht. Im Gegensatz zum Menschen zeigen Wildtyp-Mäuse keinen Histamin-vermittelten Kontraktionskraft- oder Frequenzanstieg. Aus diesem Grund wurden für die Experimente H₂-transgene Mäuse verwendet, die den humanen H₂-Rezeptor in Kardiomyozyten überexprimieren und so eine positiv inotrope und chronotrope Reaktion auf Histamin vorweisen. Die Kontraktionskraft wurde an elektrisch gereizten isolierten linken Vorhofpräparaten gemessen, wohingegen die Frequenz an spontan schlagenden isolierten rechten Vorhofpräparaten bestimmt werden konnte. Wildtyp-Geschwistertiere dienten als Kontrolle.

Bezüglich der Kontraktionskraft an H₂-transgenen linken isolierten Vorhofpräparaten konnte sowohl eine alleinige PDE3- als auch PDE4-Hemmung die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Histamin zu niedrigeren Konzentrationen verschieben. Die frequenzsteigernde Wirkung des Histamins an H₂-transgenen rechten isolierten Vorhofpräparaten konnte dagegen nur durch eine gemeinsame Hemmung der PDE2 und PDE4 potenziert werden.

Die Ergebnisse geben einen Einblick in die Regulationsfunktion der einzelnen PDEs auf die Histaminwirkung an linken und rechten Herzvorhöfen von H₂-Rezeptor-transgenen Mäusen. In diesem Zusammenhang konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die durch Histamin induzierte Tachykardie am humanen H₂-Rezeptor durch ein Zusammenspiel aus PDE2 und PDE4 am rechten isolierten Mäusevorhof vermindert werden kann. Im Gegensatz dazu können PDE3 und PDE4 auch alleine den positiv inotropen Effekt von Histamin am linken isolierten Vorhofpräparat der H₂-transgenen Mäuse antagonisieren. Sowohl die sich unterscheidende Regulation von Kontraktionskraft und Frequenz über PDEs als auch die divergente Steuerung der Beendigung des ebenfalls cAMP-vermittelten Effekts von Serotonin im Vergleich zu Histamin liefern Beispiele für funktionelle Kompartimente von PDEs im Herzen von Säugetieren.

Die vorliegende Arbeit vertieft die Kenntnisse über die physiologische Bedeutung des Histamins am Mäuse- und am Menschenherzen. Diese Ergebnisse zeigen mögliche Angriffspunkte für Pharmaka zur Beeinflussung der Herzfrequenz und Kontraktionskraft im menschlichen Herzen auf und könnten so in Zukunft eine bedeutsame klinische Relevanz besitzen.

7 Literaturverzeichnis

- Abi-Gerges, A; Richter, W; Lefebvre, F; Mateo, P; Varin, A; Heymes, C et al. 2009: Decreased expression and activity of cAMP phosphodiesterases in cardiac hypertrophy and its impact on beta-adrenergic cAMP signals. *Circulation research* 105, 784–792.
- Ackermann, D 1910: Über den bakteriellen Abbau des Histidins. *Zeitschr Physiol Chem*, 65, 504–510.
- Afzal, F; Andressen, K W.; Mørk, H K.; Aronsen, J M.; Sjaastad, I; Dahl, C P. et al. 2008: 5-HT₄-elicited positive inotropic response is mediated by cAMP and regulated by PDE3 in failing rat and human cardiac ventricles. *British journal of pharmacology* 155, 1005-14.
- Agata, N; Kato, Y; Namekata, I; Takahara, A; Tanaka, H; Chino, D et al. 2010: H₂receptor-mediated positive inotropic effect of histamine in neonatal guinea-pig left atria. *Biological & pharmaceutical bulletin* 33, 2033–2035.
- Akdis, C A.; Blaser, K 2003: Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 112, 15–22.
- Akdis, C A.; Simons, F E. 2006: Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *European Journal of Pharmacology* 533, 69-76.
- Arcangelis, V de; Liu, R; Soto, D; Xiang, Y 2009: Differential Association of Phosphodiesterase 4D Isoforms with β ₂-Adrenoceptor in Cardiac Myocytes*. *The Journal of biological chemistry* 284, 33824–33832.
- Baillie, G S. 2009: Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. *The FEBS journal* 276, 1790–1799.
- Baillie, G S.; Sood, A; McPhee, I; Gall, I; Perry, S J.; Lefkowitz, R J.; Houslay, M D. 2003: β -Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates β -adrenoceptor switching from G_s to G_i. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 940–945.
- Baillie, G S.; Tejada, G S.; Kelly, M P. 2019: Therapeutic targeting of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: inhibition and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 18, 770–796.
- Baumann, G; Loher, U; Felix, S B.; Heidecke, C D.; Rieß, G; Ludwig, L; Blömer, H 1982: Deleterious effects of cimetidine in the presence of histamine on coronary circulation. *Res. Exp. Med.* 180, 209–213.
- Beca, S; Ahmad, F; Shen, W; Liu, J; Makary, S; Polidovitch, N et al. 2013: Phosphodiesterase type 3A regulates basal myocardial contractility through interacting with sarcoplasmic reticulum calcium ATPase type 2a signaling complexes in mouse heart. *Circulation research* 112, 289–297.
- Berisha, F; Götz, K R.; Wegener, J W.; Brandenburg, S; Subramanian, H; Molina, C E. et al. 2021: cAMP Imaging at Ryanodine Receptors Reveals β ₂-Adrenoceptor Driven Arrhythmias. *Circulation research* 129, 81–94.
- Bers, D 2002: Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415, 198–205.
- Black, J W.; Duncan, W A.; Durant, C J.; Ganellin, C R.; Parsons, E M. 1972: Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature* 236, 385–390.
- Blair, C M.; Baillie, G S. 2019: Reshaping cAMP nanodomains through targeted disruption of compartmentalised phosphodiesterase signalosomes. *Biochem Soc Trans* 47, 1405–1414.
- Bobin, P; Belacel-Ouari, M; Bedioune, I; Zhang, L; Leroy, J; Leblais, V et al. 2016: Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective. *Archives of cardiovascular diseases* 109, 431–443.
- Borriello, F; Iannone, R; Marone, G 2017: Histamine Release from Mast Cells and Basophils. *Handbook of experimental pharmacology* 241, 121–139.
- Bouchez, S; Fedele, F; Giannakoulas, G; Gustafsson, F; Harjola, V-P; Karason, K et al. 2018: Levosimendan in Acute and Advanced Heart Failure: an Expert Perspective on Posology and Therapeutic Application. *Cardiovascular drugs and therapy* 32, 617–624.
- Bovet, D 1937: Action protectrice des éthers phénoliques au cours de intoxication histaminiques. *CR Soc Biol.* 124, 547–549.

- Bristow M R; Kantrowitz, N E.; Harrison, W D.; Minobe, W A.; Sageman, W S.; Billingham, M E. 1983: Mediation of subacute anthracycline cardiotoxicity in rabbits by cardiac histamine release. *Journal of cardiovascular pharmacology* 5, 913-919.
- Calamera, G; Moltzau, L R.; Levy, F O.; Andressen, K W. 2022: Phosphodiesterases and Compartmentation of cAMP and cGMP Signaling in Regulation of Cardiac Contractility in Normal and Failing Hearts. *International journal of molecular sciences* 23, 2145.
- Chan, N Y.-K.; Robador, P A.; Levi, R 2012: Natriuretic peptide-induced catecholamine release from cardiac sympathetic neurons: inhibition by histamine H3 and H4 receptor activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 343, 568–577.
- Chen, J; Hong, T; Ding, S; Deng, L; Abudupataer, M; Zhang, W et al. 2017: Aggravated myocardial infarction-induced cardiac remodeling and heart failure in histamine-deficient mice. *Scientific reports* 7, 44007.
- Chen, S; Knight, W; Yan, C 2018: Roles of PDE1 in Pathological Cardiac Remodeling and Dysfunction. *JCDD* 5, 22.
- Chiu, Y J.; Hu, S H.; Reid, I A. 1999: Inhibition of phosphodiesterase III with milrinone increases renin secretion in human subjects. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 290 1,16–19.
- Chong, L Y. Z.; Satya, K; Kim, B; Berkowitz, R 2018: Milrinone Dosing and a Culture of Caution in Clinical Practice. *Cardiology in review* 26, 35–42.
- Christ, T; Galindo-Tovar, A; Thoms, M; Ravens, U; Kaumann, A J. 2009: Inotropy and L-type Ca²⁺ current, activated by β 1- and β 2-adrenoceptors, are differently controlled by phosphodiesterases 3 and 4 in rat heart. *British journal of pharmacology* 156, 62–83.
- Coelho, M H.; Silva, I J.; Azevedo, M S.; Manso, C F. 1991: Decrease in blood histamine in drug-treated Parkinsonian patients. *Molecular and Chemical Neuropathology* 14, 77–85.
- Dale, H H.; Laidlaw, P P. 1910: The physiological action of beta-iminazolyethylamine. *The Journal of physiology* 41, 318–344.
- Ding, B; Abe, J; Wei, H; Huang, Q; Walsh, R A.; Molina, C A. et al. 2005: Functional role of phosphodiesterase 3 in cardiomyocyte apoptosis: implication in heart failure. *Circulation* 111, 2469–2476.
- Dodge-Kafka, K L.; Soughayer, J; Pare, G C.; Carlisle, M J. J.; Langeberg, L K.; Kapiloff, M S.; Scott, J D. 2005: The Protein Kinase A Anchoring Protein mAKAP Coordinates Two Integrated cAMP Effector Pathways. *Nature* 437, 574-578.
- Eckel, L; Gristwood, R W.; Nawrath, H; Owen, D A.; Satter, P 1982: Inotropic and electrophysiological effects of histamine on human ventricular heart muscle. *The Journal of physiology* 330, 111–123.
- Elizalde, A; Perez-Chavez, J; Sanchez-Chapula, J 1986: Further characterization of the receptors involved in the positive inotropic effect of histamine on rabbit papillary muscle. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 64, 1484–1488.
- Esch, I J. P. de; Thurmond, R L.; Jongejan, A; Leurs, R 2005: The histamine H4 receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends in pharmacological sciences* 26, 462–469.
- Fertig, B A.; Baillie, G S. 2018: PDE4-Mediated cAMP Signalling. *Journal of cardiovascular development and disease* 5, 8.
- Fitzsimons, C P.; Lazar-Molnar, E; Tomoskozi, Z; Buzás, E; Rivera, E S.; Falus, A 2001: Histamine deficiency induces tissue-specific down-regulation of histamine H2 receptor expression in histidine decarboxylase knockout mice. *FEBS Letters* 508, 245–248.
- Galindo-Tovar, A; Kaumann, A J. 2008: Phosphodiesterase-4 blunts inotropism and arrhythmias but not sinoatrial tachycardia of (-)-adrenaline mediated through mouse cardiac beta(1)-adrenoceptors. *British journal of pharmacology* 153, 710–720.
- Galindo-Tovar, A; Vargas, M L.; Escudero, E; Kaumann, A J. 2009a: Ontogenic changes of the control by phosphodiesterase-3 and -4 of 5-HT responses in porcine heart and relevance to human atrial 5-HT(4) receptors. *British journal of pharmacology* 156, 237–249.

- Galindo-Tovar, A; Vargas, M L.; Kaumann, A J. 2009b: Phosphodiesterases PDE3 and PDE4 jointly control the inotropic effects but not chronotropic effects of (-)-CGP12177 despite PDE4-evoked sinoatrial bradycardia in rat atrium. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 379, 379–384.
- Galindo-Tovar, A; Vargas, M L.; Kaumann, A J. 2016: Inhibitors of phosphodiesterases PDE2, PDE3, and PDE4 do not increase the sinoatrial tachycardia of noradrenaline and prostaglandin PGE(1) in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 389, 177–186.
- Galindo-Tovar, A; Vargas, M L.; Kaumann, A J. 2018: Phosphodiesterase PDE2 activity, increased by isoprenaline, does not reduce β -adrenoceptor-mediated chronotropic and inotropic effects in rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 391, 571–585.
- Ganellin C R and Parsons M E: Histamine receptors and cyclic nucleotides. In *Pharmacology of Histamine Receptors*. 1. Aufl. Elsevier, London, 2013, 146–216.
- Garnier, A; Bork, N I.; Jacquet, E; Zipfel, S; Muñoz-Guijosa, C; Baczkó, I et al. 2021: Mapping genetic changes in the cAMP-signaling cascade in human atria. *Journal of molecular and cellular cardiology* 155, 10–20.
- Genovese, A; Gross, S S.; Sakuma, I; Levi, R 1988: Adenosine promotes histamine H1-mediated negative chronotropic and inotropic effects on human atrial myocardium. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 247 3, 844–849.
- Gergs, U; Bernhardt, G; Buchwalow, I B.; Edler, H; Fröba, J; Keller, M et al. 2019: Initial Characterization of Transgenic Mice Overexpressing Human Histamine H2 Receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 369, 129–141.
- Gergs, U; Böckler, A; Ebelt, H; Hauptmann, S; Keller, N; Otto, V et al. 2013: Human 5-HT4 receptor stimulation in atria of transgenic mice. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 386, 357–367.
- Gergs, U; Kirchhefer, U; Bergmann, F; Künstler, B; Mißlinger, N; Au, B et al. 2020: Characterization of Stressed Transgenic Mice Overexpressing H2-Histamine Receptors in the Heart. *J Pharmacol Exp Ther* 374, 479–488.
- Gergs, U; Weisgut, J; Griethe, K; Mißlinger, N; Kirchhefer, U; Neumann, J 2021: Human histamine H2 receptors can initiate cardiac arrhythmias in a transgenic mouse. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 394, 1963–1973.
- Ginsburg, R; Bristow, M R.; Stinson, E B.; Harrison, D C. 1980: Histamine receptors in the human heart. *Life sciences* 26, 2245–2249.
- Glaß, D; Buschauer, A; Tenor, H; Bartel, S; Will-Shahab, L; Krause, E-G 1995: 4-(4-Guanidinobenzoyl)-2-imidazolones and related compounds: Phosphodiesterase inhibitors and novel cardiotonics with combined histamine H2 receptor agonist and PDE III inhibitor activity. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 328, 709–719.
- Graver, L; Robertson, D A.; Levi, R; Becker, C G.; Weksler, B B.; Gay, W A. 1986: IgE-mediated hypersensitivity in human heart tissue: Histamine release and functional changes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 77, 709–714.
- Greaves, M W. 2010: Pathogenesis and treatment of pruritus. *Current allergy and asthma reports* 10, 236–242.
- Gristwood, R W.; Lincoln, J C.; Owen, D A. 1980: Effects of histamine on human isolated heart muscle: comparison with effects of noradrenaline. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 32, 145–146.
- Gristwood, R W.; Lincoln, J C.; Owen, D A.; Smith, I R. 1981: Histamine release from human right atrium. *British journal of pharmacology* 74, 7–9.
- Haas, H L.; Sergeeva, O A.; Selbach, O 2008: Histamine in the nervous system. *Physiological reviews* 88, 1183–1241.
- Hattori, Y 1999: Cardiac histamine receptors: their pharmacological consequences and signal transduction pathways. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 21, 123–131.
- Hattori, Y; Hattori, K; Matsuda, N 2017: Regulation of the Cardiovascular System by Histamine. *Handbook of experimental pharmacology* 241, 239–258.

- Hayes, J S.; Brunton, L L.; Mayer, S E. 1980: Selective activation of particulate cAMP-dependent protein kinase by isoproterenol and prostaglandin E1. *The Journal of biological chemistry* 255 11, 5113–5119.
- He, G; Hu, J; Li, T; Ma, X; Meng, J; Jia, M et al. 2012: Arrhythmogenic effect of sympathetic histamine in mouse hearts subjected to acute ischemia. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 18, 1–9.
- He, G H; Cai, W K; Zhang, J B; Ma, C Y; Yan, F; Lu, J; Xu, G-L 2016: Associations of Polymorphisms in HRH2, HRH3, DAO, and HNMT Genes with Risk of Chronic Heart Failure. *BioMed research international* 2016, 1208476.
- Hershcovici, T; Fass, R 2011: Pharmacological management of GERD: where does it stand now? *Trends in pharmacological sciences* 32, 258–264.
- Hill, S J.; Ganellin, C R.; Timmerman, H; Schwartz, J C.; Shankley, N P.; Young, J M. et al. 1997: International Union of Pharmacology. XIII. Classification of Histamine Receptors. *Pharmacol Rev* 49 3, 253–278.
- Hu, W; Chen, Z 2017: The roles of histamine and its receptor ligands in central nervous system disorders: An update. *Pharmacology & therapeutics* 175, 116–132.
- Hua, R; Adamczyk, A; Robbins, C; Ray, G; Rose, R A. 2012: Distinct Patterns of Constitutive Phosphodiesterase Activity in Mouse Sinoatrial Node and Atrial Myocardium. *PLOS ONE* 7, e47652.
- Hutchings, D C.; Anderson, S G.; Caldwell, J L.; Trafford, A W. 2018: Phosphodiesterase-5 inhibitors and the heart: compound cardioprotection? *Heart* 104, 1244–1250.
- Johnson, C L; Weinstein, H; Green, J P. 1979: Studies on Histamine H2 Receptors Coupled to Cardiac Adenylate Cyclase. *Mol Pharmacol* 16 2, 417–428.
- Jones, B L.; Kearns, G L. 2011: Histamine: new thoughts about a familiar mediator. *Clinical pharmacology and therapeutics* 89, 189–197.
- Jutel, M; Akdis, M; Akdis, C A. 2009: Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39, 1786–1800.
- Karam, S; Margaria, J P.; Bourcier, A; Mika, D; Varin, A; Bedioune, I et al. 2020: Cardiac Overexpression of PDE4B Blunts β -Adrenergic Response and Maladaptive Remodeling in Heart Failure. *Circulation* 142, 161-174.
- Kaumann, A J. 2011: Phosphodiesterases reduce spontaneous sinoatrial beating but not the 'fight or flight' tachycardia elicited by agonists through Gs-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences* 32, 377–383.
- Kaumann, A J.; Galindo-Tovar, A; Escudero, E; Vargas, M L. 2009: Phosphodiesterases do not limit beta1-adrenoceptor-mediated sinoatrial tachycardia: evidence with PDE3 and PDE4 in rabbits and PDE1-5 in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 380, 421–430.
- Kelso, E J.; McDermott, B J.; Silke, B 1993: Cardiotonic actions of selective phosphodiesterase inhibitors in rat isolated ventricular cardiomyocytes. *British journal of pharmacology* 110, 1387–1394.
- Klein, I; Levey, G S. 1971: Activation of myocardial adenyl cyclase by histamine in guinea pig, cat, and human heart. *The Journal of clinical investigation* 50, 1012–1015.
- Knight, W; Yan, C 2013: Therapeutic potential of PDE modulation in treating heart disease. *Future medicinal chemistry* 5, 1607–1620.
- Kokkonen, K; Kass, D A. 2017: Nanodomain Regulation of Cardiac Cyclic Nucleotide Signaling by Phosphodiesterases. *Annual review of pharmacology and toxicology* 57, 455–479.
- Kondru, S K.; Potnuri, A G.; Allakonda, L; Konduri, P 2018: Histamine 2 receptor antagonism elicits protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rodent model. *Molecular and cellular biochemistry* 441, 77-88.
- Kukovetz, W R; Pösch, G; Wurm, A 1973: Effect of catecholamines, histamine and oxyfedrine on isotonic contraction and cyclic AMP in the guinea-pig heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 278, 403–424.

- Laher, I; McNeill, J H. 1980: Effects of histamine on rat isolated atria. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 58, 1114–1116.
- Leary, P J.; Kronmal, R A.; Bluemke, D A.; Buttrick, P M.; Jones, K L.; Kao, D P. et al. 2018: Histamine H2 Receptor Polymorphisms, Myocardial Transcripts, and Heart Failure (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis and Beta-Blocker Effect on Remodeling and Gene Expression Trial). *The American journal of cardiology* 121, 256–261.
- Leary, P J.; Tedford, R J.; Bluemke, D A.; Bristow, M R.; Heckbert, S R.; Kawut, S M. et al. 2016: Histamine H2 Receptor Antagonists, Left Ventricular Morphology, and Heart Failure Risk: The MESA Study. *Journal of the American College of Cardiology* 67, 1544–1552.
- Lee, D I.; Zhu, G; Sasaki, T; Cho, G-S; Hamdani, N; Holewinski, R et al. 2015: Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease. *Nature* 519, 472–476.
- Lehnart, S E.; Wehrens, X H. T.; Reiken, S; Warriar, S; Belevych, A E.; Harvey, R D. et al. 2005: Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 123, 25–35.
- Leroy, J; Richter, W; Mika, D; Castro, L R.; Abi-Gerges, A; Xie, M et al. 2011: Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca²⁺ channel complex regulates Ca²⁺ current and protects against ventricular arrhythmias in mice. *The Journal of clinical investigation* 121, 2651–2661.
- Levi, R; Malm, J R.; Bowman, F O.; Rosen, M R. 1981: The arrhythmogenic actions of histamine on human atrial fibers. *Circulation research* 49, 545–550.
- Levi, R; Rubin, L E.; Gross, S S.: Histamine in Cardiovascular Function and Dysfunction: Recent Developments. 1. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg, 1991, 347–383.
- Levick, S P. 2021: Histamine receptors in heart failure. *Heart Fail Rev* 27, 1355-1372.
- Liu, X; Callaerts-Vegh, Z; Evans, K L. J.; Bond, R A. 2002: Chronic infusion of beta-adrenoceptor antagonist and inverse agonists decreases elevated protein kinase A activity in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of human beta 2-adrenoceptor. *Journal of cardiovascular pharmacology* 40, 448–455.
- Luo, T; Chen, B; Zhao, Z; He, N; Zeng, Z; Wu, B et al. 2013: Histamine H2 receptor activation exacerbates myocardial ischemia/reperfusion injury by disturbing mitochondrial and endothelial function. *Basic research in cardiology* 108, 342.
- MacKenzie, S J.; Baillie, G S.; McPhee, I; MacKenzie, C; Seamons, R; McSorley, T et al. 2002: Long PDE4 cAMP specific phosphodiesterases are activated by protein kinase A-mediated phosphorylation of a single serine residue in Upstream Conserved Region 1 (UCR1). *British journal of pharmacology* 136, 421–433.
- Maintz, L; Novak, N 2007: Histamine and histamine intolerance. *The American journal of clinical nutrition* 85, 1185–1196.
- Marshall, I 1984: Characterization and distribution of histamine H1- and H2-receptors in precapillary vessels. *Journal of cardiovascular pharmacology* 6 Suppl 4, 587-97.
- Martins, T J.; Mumby, M C.; Beavo, J A. 1982: Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *The Journal of biological chemistry* 257, 1973-1979.
- Masaki, T; Yoshimatsu, H 2010: Neuronal histamine and its receptors: implication of the pharmacological treatment of obesity. *Current medicinal chemistry* 17, 4587–4592.
- Matsuda, N; Jesmin, S; Takahashi, Y; Hatta, E; Kobayashi, M; Matsuyama, K et al. 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* 309, 786–795.
- Maurice, D H.; Ke, H; Ahmad, F; Wang, Y; Chung, J; Manganiello, V C. 2014: Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nature reviews. Drug discovery* 13, 290–314.
- Mehel, H; Emons, J; Vettel, C; Wittkopper, K; Seppelt, D; Dewenter, M et al. 2013: Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts beta-adrenergic responses in cardiomyocytes. *Journal of the American College of Cardiology* 62, 1596–1606.

- Mika, D; Leroy, J; Vandecasteele, G; Fischmeister, R 2012: PDEs create local domains of cAMP signaling. *Journal of molecular and cellular cardiology* 52, 323–329.
- Miller, C L.; Oikawa, M; Cai, Y; Wojtovich, A P.; Nagel, D J.; Xu, X et al. 2009: Role of Ca²⁺/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation research* 105, 956–964.
- Mohamed, T M. A.; Oceandy, D; Zi, M; Prehar, S; Alatwi, N; Wang, Y et al. 2011: Plasma Membrane Calcium Pump (PMCA4)-Neuronal Nitric-oxide Synthase Complex Regulates Cardiac Contractility through Modulation of a Compartmentalized Cyclic Nucleotide Microdomain. *The Journal of biological chemistry* 286, 41520–41529.
- Molenaar, P; Christ, T; Hussain, R I.; Engel, A; Berk, E; Gillette, K T. et al. 2013: PDE3, but Not PDE4, Reduces β_1 - and β_2 -Adrenoceptor-Mediated Inotropic and Lusitropic Effects in Failing Ventricle From Metoprolol-Treated Patients. *British journal of pharmacology* 169, 528-538.
- Molina, C E.; Leroy, J; Richter, W; Xie, M; Scheitrum, C; Lee, I-O et al. 2012: Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *Journal of the American College of Cardiology* 59, 2182–2190.
- Monczor, F; Fernandez, N 2016: Current Knowledge and Perspectives on Histamine H1 and H2 Receptor Pharmacology: Functional Selectivity, Receptor Crosstalk, and Repositioning of Classic Histaminergic Ligands. *Molecular pharmacology* 90, 640–648.
- Mongillo, M; Tocchetti, C G.; Terrin, A; Lissandron, V; Cheung, Y-F; Dostmann, W R. et al. 2006: Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circulation research* 98, 226–234.
- Nadur, N F.; de, A L. L.; Caruso, L; Graebin, C S.; Lacerda, R B.; Kümmerle, A E. 2021: The long and winding road of designing phosphodiesterase inhibitors for the treatment of heart failure. *European journal of medicinal chemistry* 212, 113-123.
- Nakano, S J.; Sucharov, J; van Dusen, R; Cecil, M; Nunley, K; Wickers, S et al. 2017: Cardiac Adenylyl Cyclase and Phosphodiesterase Expression Profiles Vary by Age, Disease, and Chronic Phosphodiesterase Inhibitor Treatment. *Journal of cardiac failure* 23, 72–80.
- Neumann, J; Boknik, P; Matherne, G P.; Lankford, A; Schmitz, W 2003: Pertussis toxin sensitive and insensitive effects of adenosine and carbachol in murine atria overexpressing A1-adenosine receptors. *British journal of pharmacology* 138, 209–217.
- Neumann, J; Grobe, J M.; Weisgut, J; Schwelberger, H G.; Fogel, W A.; Marušáková, M et al. 2021a: Histamine can be Formed and Degraded in the Human and Mouse Heart. *Frontiers in pharmacology* 12, 582916.
- Neumann, J; Käufler, B; Gergs, U 2019: Which phosphodiesterase can decrease cardiac effects of 5-HT₄ receptor activation in transgenic mice? *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 392, 991–1004.
- Neumann, J; Kirchhefer, U; Dhein, S; Hofmann, B; Gergs, U 2021b: The Roles of Cardiovascular H₂-Histamine Receptors Under Normal and Pathophysiological Conditions. *Frontiers in pharmacology* 12, 732842.
- Neumann, J; Voss, R; Laufs, U; Werner, C; Gergs, U 2021c: Phosphodiesterases 2, 3 and 4 can decrease cardiac effects of H₂-histamine-receptor activation in isolated atria of transgenic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 394, 1215-1229.
- Nieto-Alamilla, G; Márquez-Gómez, R; García-Gálvez, A-M; Morales-Figueroa, G-E; Arias-Montaña, J-A 2016: The Histamine H₃ Receptor: Structure, Pharmacology, and Function. *Molecular pharmacology* 90, 649–673.
- 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* 275, 36781–36786.
- Oikawa, M; Wu, M; Lim, S; Knight, W E.; Miller, C L.; Cai, Y et al. 2013: Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology* 64, 11–19.

- Omori, K; Kotera, J 2007: Overview of PDEs and their regulation. *Circulation research* 100, 309–327.
- Osadchii, O E. 2007: Myocardial phosphodiesterases and regulation of cardiac contractility in health and cardiac disease. *Cardiovascular drugs and therapy* 21, 171–194.
- Packer, M; Carver, J R.; Rodeheffer, R J.; Ivanhoe, R J.; DiBianco, R; Zeldis, S M. et al. 1991: Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *The New England journal of medicine* 325, 1468–1475.
- Panula, P; Chazot, P L.; Cowart, M; Gutzmer, R; Leurs, R; Liu, W L. S. et al. 2015: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. *Pharmacological reviews* 67, 601–655.
- Parsons, M E.; Ganellin, C R. 2006: Histamine and its receptors. *British journal of pharmacology* 147, 127-35.
- Patella, V; Marinò, I; Lampärter, B; Arbustini, E; Adt, M; Marone, G 1995: Human heart mast cells. Isolation, purification, ultrastructure, and immunologic characterization. *Journal of immunology* 154 6, 2855–2865.
- Petch, M C.; Nayler, W G. 1979: Concentration of catecholamines in human cardiac muscle. *British heart journal* 41, 340–344.
- Plouffe, B; Thomsen, A R.; Irannejad, R 2020: Emerging Role of Compartmentalized G Protein-Coupled Receptor Signaling in the Cardiovascular Field. *ACS pharmacology & translational science* 3, 221-236.
- Podzuweit, T; Nennstiel, P; Müller, A 1995: Isozyme selective inhibition of cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases by erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine. *Cellular signalling* 7, 733–738.
- Potnuri, A G.; Allakonda, L; Appavoo, A; Saheera, S; Nair, R R. 2018: Association of histamine with hypertension-induced cardiac remodeling and reduction of hypertrophy with the histamine-2-receptor antagonist famotidine compared with the beta-blocker metoprolol. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 41, 1023-1035.
- Rabe, K F. 2010: Roflumilast for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Review of Respiratory Medicine* 4, 543–555.
- Reinhardt, D; Schmidt, U; Brodde, O E.; Schümann, H J. 1977: H1 - and H2-receptor mediated responses to histamine on contractility and cyclic AMP of atrial and papillary muscles from guinea-pig hearts. *Agents and actions* 7, 1–12.
- Reinhardt, F; Beneke, K; Pavlidou, N G.; Conradi, L; Reichenspurner, H; Hove-Madsen, L; Molina, C E. 2021: Abnormal Calcium Handling in Atrial Fibrillation Is Linked to Changes in Cyclic AMP Dependent Signaling. *Cells* 10, 3042.
- Rudokas, M W.; Post, J P.; Sataray-Rodriguez, A; Sherpa, R T.; Moshal, K S.; Agarwal, SR; Harvey, R D. 2021: Compartmentation of β 2 -adrenoceptor stimulated cAMP responses by phosphodiesterase types 2 and 3 in cardiac ventricular myocytes. *British journal of pharmacology* 178, 289-97.
- Salazar, N C.; Chen, J; Rockman, H A. 2007: Cardiac GPCRs: GPCR Signaling in Healthy and Failing Hearts. *Biochimica et biophysica acta* 1768, 1006–1018.
- Sander, L E.; Lorentz, A; Sellge, G; Coëffier, M; Neipp, M; Veres, T et al. 2006: Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract. *Gut* 55, 498–504.
- Sanders, L; Lynham, J A.; Kaumann, A J. 1996: Chronic beta 1-adrenoceptor blockade sensitises the H1 and H2 receptor systems in human atrium: rôle of cyclic nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 353, 661–670.
- Schayer, R W.: The Origin and Fate of Histamine in the Body. Ciba Foundation symposium jointly with the Physiological Society and the British Pharmacological Society on histamine, Boston, 1956, 183–188.
- Shahid, M; Tripathi, T; Sobia, F; Moin, S; Siddiqui, M; Khan, R A. 2009: Histamine, Histamine Receptors, and their Role in Immunomodulation: An Updated Systematic Review. *TOIJ* 2, 9–41.
- Simons, F E. R.; Simons, K J. 2011: Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. *The Journal of allergy and clinical immunology* 128, 1139-1150.

- Singh, S; Johnson, P I.; Javed, A; Gray, T S.; Lonchyna, V A.; Wurster, R D. 1999: Monoamine- and histamine-synthesizing enzymes and neurotransmitters within neurons of adult human cardiac ganglia. *Circulation* 99,411–419.
- Smith, C J.; Vasta, V; Degerman, E; Belfrage, P; Manganiello, V C. 1991: Hormone-sensitive cyclic GMP-inhibited cyclic AMP phosphodiesterase in rat adipocytes. Regulation of insulin- and cAMP-dependent activation by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 266 20, 13385-13390.
- Takahama, H; Asanuma, H; Sanada, S; Fujita, M; Sasaki, H; Wakeno, M et al. 2010: A histamine H₂ receptor blocker ameliorates development of heart failure in dogs independently of β -adrenergic receptor blockade. *Basic research in cardiology* 105, 787–794.
- Thakkar, M M. 2011: Histamine in the regulation of wakefulness. *Sleep medicine reviews* 15, 65–74.
- Thangam, E B.; Jemima, E A.; Singh, H; Baig, M S.; Khan, M; Mathias, C B. et al. 2018: The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Frontiers in immunology* 9, 1873.
- Tiligada, E; Ennis, M 2020: Histamine pharmacology: from Sir Henry Dale to the 21st century. *British journal of pharmacology* 177, 469-489.
- Togias, A 2003: H1-receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112, 60-68.
- Vandeput, F; Krall, J; Ockaili, R; Salloum, F N.; Florio, V; Corbin, J D. et al. 2009: cGMP-hydrolytic activity and its inhibition by sildenafil in normal and failing human and mouse myocardium. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 330, 884–891.
- Vargas, M L.; Hernandez, J; Kaumann, A J. 2005: Phosphodiesterase PDE3 blunts the positive inotropic and cyclic AMP enhancing effects of CGP12177 but not of noradrenaline in rat ventricle. *British journal of pharmacology* 147, 158–163.
- Vettel, C; Lämmle, S; Ewens, S; Cervirgen, C; Emons, J; Ongherth, A et al. 2014: PDE2-mediated cAMP hydrolysis accelerates cardiac fibroblast to myofibroblast conversion and is antagonized by exogenous activation of cGMP signaling pathways. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 306, 1246-1252.
- Vettel, C; Lindner, M; Dewenter, M; Lorenz, K; Schanbacher, C; Riedel, M et al. 2017: Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction. *Circulation research* 120, 120–132.
- Vigorito, C; Russo, P; Picotti, G B.; Chiariello, M; Poto, S; Marone, G 1983: Cardiovascular effects of histamine infusion in man. *Journal of cardiovascular pharmacology* 5, 531–537.
- Vinogradova, T M.; Kobrinsky, E; Lakatta, E G. 2018a: Dual Activation of Phosphodiesterases 3 and 4 Regulates Basal Spontaneous Beating Rate of Cardiac Pacemaker Cells: Role of Compartmentalization? *Frontiers in Physiology* 9, 1301.
- Vinogradova, T M.; Sirenko, S; Lukyanenko, Y O.; Yang, D; Tarasov, K V.; Lyashkov, A E. et al. 2018b: Basal Spontaneous Firing of Rabbit Sinoatrial Node Cells Is Regulated by Dual Activation of PDEs (Phosphodiesterases) 3 and 4. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology* 11, 5896.
- Wagner, M; Sadek, M S.; Dybkova, N; Mason, F E.; Klehr, J; Firneburg, R et al. 2021: Cellular Mechanisms of the Anti-Arrhythmic Effect of Cardiac PDE2 Overexpression. *International journal of molecular sciences* 22, 4816.
- Wang, Y W.; Gao, Q W.; Xiao, Y J.; Zhu, X J.; Gao, L; Zhang, W H. et al. 2021: Bay 60-7550, a PDE2 inhibitor, exerts positive inotropic effect of rat heart by increasing PKA-mediated phosphorylation of phospholamban. *European Journal of Pharmacology* 901, 174077.
- Wellner-Kienitz, M C.; Bender, K; Meyer, T; Pott, L 2003: Coupling to G_s and G_(q/11) of histamine H₂ receptors heterologously expressed in adult rat atrial myocytes. *Biochimica et biophysica acta* 1642, 67–77.
- Weninger; De Maeyer J H; Lefebvre R A 2012: Study of the regulation of the inotropic response to 5-HT₄ receptor activation via phosphodiesterases and its cross-talk with C-type natriuretic peptide in porcine left atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 385, 565–577.
- Windaus, A; Vogt, W 1907: Synthese des Imidazolyl-äthylamins. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 40, 3691–3695.

- Wolff, A A.; Levi, R 1986: Histamine and cardiac arrhythmias. *Circulation research* 58, 1–16.
- Zaccolo, M; Pozzan, T 2002: Discrete Microdomains With High Concentration of cAMP in Stimulated Rat Neonatal Cardiac Myocytes. *Science (New York, N.Y.)* 295, 1711-1715.
- Zeng, Z; Shen, L; Li, X; Luo, T; Wei, X; Zhang, J et al. 2014: Disruption of histamine H2 receptor slows heart failure progression through reducing myocardial apoptosis and fibrosis. *Clinical science (London, England : 1979)* 127, 435–448.
- Zerkowski, H R.; Broede, A; Kunde, K; Hillemann, S; Schäfer, E; Vogelsang, M et al. 1993: Comparison of the positive inotropic effects of serotonin, histamine, angiotensin II, endothelin and isoprenaline in the isolated human right atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 347, 347–352.
- Zhang, J; Cai, W-K; Zhang, Z; Wang, P; Lin, X-Q; Feng, J et al. 2018: Cardioprotective effect of histamine H2 antagonists in congestive heart failure: A systematic review and meta-analysis. *Medicine* 97, e0409.
- Zhang, P; Kofron, C M.; Mende, U 2015: Heterotrimeric G protein-mediated signaling and its non-canonical regulation in the heart. *Life sciences* 129, 35-41.
- Zimmermann, A S.; 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: C57Bl/6 and Balb/c. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 60, 1153–1159.

8 Thesen

1. Histamin erhöhte konzentrations- und zeitabhängig die Kontraktionskraft und Frequenz an isolierten Vorhofpräparaten transgener Mäuse, die den humanen kardialen Histamin-H₂-Rezeptor überexprimieren (H₂-TG).
2. Bei Wildtyp-Geschwistertieren konnte kein positiv inotroper oder chronotroper Effekt von Histamin beobachtet werden.
3. Phosphodiesterasen-Hemmstoffe konnten sowohl an isolierten Vorhofpräparaten H₂-transgener als auch an WT-Tieren die Kontraktilität und die Frequenz verändern.
4. Histamin-H₂-transgene Mäuse und WT-Tiere zeigten bezüglich verschiedener funktioneller Parameter der Herzfunktion unterschiedliche Reaktionen auf Phosphodiesterasen-Hemmstoffe.
5. Die Effektivität von Histamin bezüglich der Kontraktionskraft und der Frequenz an isolierten Vorhofpräparaten H₂-transgener Mäuse konnte durch vorherige Inkubation von PDE-Hemmern nicht zusätzlich gesteigert werden.
6. Für die Regulation der Potenz des Histamins auf die Kontraktilität scheinen an Histamin-H₂-transgenen linken Vorhöfen PDE4 und PDE3 maßgeblich verantwortlich zu sein.
7. Für die Regulation des positiv chronotropen Effekts des Histamins scheint an H₂-transgenen rechten Vorhöfen die simultane Wirkung von PDE2 und PDE4 maßgeblich zu sein.
8. Die Regulation des Histamineffekts durch PDEs erfolgt für Kontraktionskraft und Frequenz vermutlich in funktionell unterschiedlichen Kompartimenten mit unterschiedlicher PDE-Expression.
9. Der Histamin-H₂-Rezeptor und Phosphodiesterasen und die Interaktion untereinander könnten in Zukunft ein wertvoller Angriffspunkt für Therapeutika von Herz-Kreislauf-Krankheiten wie Herzinsuffizienz oder Herz-Rhythmus-Störungen darstellen.

Anhang

Puffer und Lösungen

Die Substanzen wurden alle in pro analysi-Qualität bzw. im besten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, wurde das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser als Reinstwasser (18 Ohm) aus einer Wasseraufbereitungsanlage gewonnen. Alle Chemikalien wurden vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt.

Genotypisierung der Versuchstiere

Protokoll:

Lösung 1:

1M NaOH 250 µl

10 mM EDTA pH 8.0 100 µl

ddH₂O 10 ml

→ Davon 250 µl je Probe, über Nacht bei 55°C schüttelnd inkubieren

Lösung 2:

Tris-HCl 0,23g/50 ml

→ 250 µl je Probe zum Neutralisieren

PCR-Mastermix: (Mengenangabe pro PCR-Reaktion)

dd H₂O 8 µl

2-Fach Super Master Mix

(Biotool) 10 µl

Reverse Primer

hH₂R-SEQ-P1R 0,5 µl

(5'-AGCAGGTCAGTGATAGCCAA-3')

Forward Primer

MHC-SEQ-P1 0,5 µl

(5'-ACCCTTACCCACATAGACC-3')

DNA 1 µl

2-Fach Super Master Mix (Biotool) Komponenten

B46015/8/9: 2 x PCR Super Master Mix (Dye Plus)

100 U/ml Taq DNA polymerase, 0,5 mM dNTPs, 4 mM MgCl₂, Stabilisatoren, Farbstoff

Agarosegel

Agarose 1 %, 1x TAE-Puffer, SafeRed Farbstoff

50x TAE-Puffer

Tris Base 1,99 M

Eisessig 0,99 M

EDTA 59,5 mM

GeneRuler

100 bp DNA Ladder

PCR-Programm

Denaturierung	94°C	5 Min	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	20 Sek	30 Zyklen
Annealing	60°C	30 Sek	30 Zyklen
Elongation	72°C	1 Min	30 Zyklen
Elongation	72°C	5 Min	1 Zyklus
Lagerung	4°C		

Tyrode-Lösung

Stamm I NaCl 17,5 % (g/V), KCl 1,005 % (g/V),

MgCl₂ x 6H₂O 0,56 % (g/V)

Stamm II NaHCO₃ 5,00 % (g/V)

Stamm III NaH₂PO₄ x H₂O 0,29 % (g/V)

Endkonzentration:

NaCl 119,8 mM

KCl 5,4 mM

MgCl₂ x 6H₂O 1,1 mM

NaHCO₃ 22,6 mM

NaH₂PO₄ x H₂O 0,42 mM

CaCl₂ x 2H₂O 1,8 mM

Glucose 5,05 mM

Ascorbinsäure 0,28 mM

Na₂-EDTA 0,05 mM

pH 7,4

Antikoagulation:

Heparin: 1000 IE i.p.

Narkose:

Pentobarbital: 0,5g/10 ml (50-75 mg/kg Körpergewicht) i.p.

Verwendete Substanzen

Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts, Philadelphia, USA
L (+) – Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt
Chloroform	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-Leiter GeneRuler™	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
Heparin	Biochrom AG, Berlin
Histamin	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Isoamylalkohol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Isoprenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ x 6H 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
Pentobarbital	Spofa, Prag, Tschechien
Phenol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
PCR-Puffer, 15 mM MgCl ₂	Ampliqon, Odense, Dänemark
Taq-DNA-Polymerase	Ampliqon, Odense, Dänemark
HCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Fluka AG, Buch

Geräte und Bezugsquellen

PCR-Gerät „Mastercycler gradient“; Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Zentrifuge Modell 5415 C; Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

Biophotometer; 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 (Graphtec, Linearorder mark, VII, WR 3101)
- Reizgerät mit 4 Kanälen (ELV Takt- und Impulsgenerator TIG 7000)
- Wärmebad (CS Lauda)
- 4 Transducer (Kent, Scientific corporation, Isometric Transducer)
- 4 Doppelwandgefäße, 4 Stative, 4 Elektroden, Halterungsstäbe, Haken

LabChart Pro und LabChart Reader v.8.1.13 19.11.2018, ADInstruments, Sidney, Australien

GraphPad Prism 5.0 für Windows, GraphPad Software, Inc, San Diego, USA

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen beziehungsweise eine Promotion begonnen habe.

(2) Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. med. Joachim Neumann, Leiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Vielen Dank für die zahlreichen Anregungen und die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. rer. nat. Ulrich Gergs für die hervorragende Betreuung meiner Promotionsarbeit, sein unermüdliches Engagement und die allzeit konstruktive Unterstützung.

Ich möchte mich beim gesamten Institut für Pharmakologie und Toxikologie für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und die außerordentliche Hilfsbereitschaft bedanken. Mein Dank gilt hier insbesondere Frau Sonja Reber und Frau Pia Willmy für die ausgezeichnete Einarbeitung in die Methodik und die fachkundige Hilfe bei technischen Problemen sowie Frau Stephanie Simmrodt für die zuverlässige organisatorische Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich bei Sophie Lichtenau, Johanna Häußler und Lena Bauer bedanken, die mich im Rahmen meiner Promotion mit produktiven Anregungen, konstruktiven Verbesserungsvorschlägen und mentaler Unterstützung begleitet haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Geschwistern, meiner Familie und meinen Freund*innen ganz besonders herzlich für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums bedanken, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.