

**Zur Bedeutung des kardialen Histamin H₂-Rezeptors für Arrhythmien
in einem transgenen Mausmodell mit herzspezifischer
H₂-Rezeptor-Überexpression**

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

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

von	Jacqueline Weisgut
Betreuer:	Prof. Dr. med. Joachim Neumann, Halle (Saale)
Gutachter*innen:	Prof. Dr. med. Joachim Neumann, Halle (Saale) Prof. Dr. rer. nat. Antje Gohle, Würzburg Prof. Dr. rer. nat. Detlef Neumann, Hannover
Datum der Verteidigung:	26.07.2023

Referat

Um die kardialen Effekte des H₂-Rezeptors am menschlichen Herzen näher analysieren zu können, entwickelte die Arbeitsgruppe mit Hilfe des α -MHC-Promotors ein transgenes Mausmodell, welches den humanen H₂-Rezeptor herzspezifisch überexprimiert (Gergs et al., 2019). Das Ziel dieser Arbeit war es, die kardialen Effekte des H₂-Rezeptors mit Hilfe des endogenen Liganden Histamin und Dimaprit, ein synthetischer Agonist an H₂-, H₃- und H₄-Rezeptoren, zu charakterisieren. Zudem sollten spontane und durch Histamin-Rezeptor-Agonisten induzierte Arrhythmien erfasst werden. Um neue Erkenntnisse über die Pathogenese dieser Arrhythmien zu gewinnen, wurden putativ relevante Signalwege durch den H₂-Rezeptorantagonisten Cimetidin, durch H89 für die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), durch W7 für die Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und durch SQ22536 für die Adenylatcyclase (AC) gehemmt. Unter Verwendung von Compound 48/80 sollten Rückschlüsse auf die endogene Histaminfreisetzung im Herzen erhoben werden. Hierfür wurden isolierte linke Vorhofpräparate, die mit 1 Hz stimuliert wurden, und spontan kontrahierende rechte Vorhofpräparate sowohl von H₂-Rezeptor überexprimierten (TG) als auch von Wildtyp-Mäusen (WT) in vitro unter isometrischen Bedingungen im Organbad untersucht. In vivo erfolgte an narkotisierten TG und WT eine transthorakale Echokardiografie unter basalen Bedingungen sowie nach intraperitonealer Histamin-Injektion, um die kardialen Effekte durch Histamin am gesamten Organismus analysieren zu können. In vitro zeigten Histamin und Dimaprit im Konzentrationsbereich von 1 nM bis 1 μ M einen positiv inotropen und chronotropen Effekt. Neben dem Auftreten von spontanen Arrhythmien führten Histamin und Dimaprit konzentrationsabhängig zu arrhythmischen Kontraktionen an den rechten TG-Vorhofpräparaten. Bei TG konnte gegenüber WT sowohl eine erhöhte Rate spontan auftretender Arrhythmien als auch Dimaprit-induzierter Arrhythmien beobachtet werden. Die Arrhythmien manifestierten sich zum Großteil als Bigeminus, teilweise auch als Trigeminus. Unter Cimetidin, sistierten die Arrhythmien. Hinsichtlich der Pathogenese dieser Arrhythmien konnte kein Zusammenhang zu der PKA und der CaMKII gestellt werden. Die AC-Hemmung führte hingegen bei TG zu einem proarrhythmogenen Effekt. Mit Hilfe von Compound 48/80 konnte gezeigt werden, dass in den TG-Vorhofpräparaten Histamin-Speicher existieren, aus denen Histamin freigesetzt werden kann. Der H₂-Rezeptor nimmt also Einfluss auf die physiologische Herzfunktion und scheint auch bei kardialen Erkrankungen, wie z.B. kardiale Arrhythmien, eine Rolle zu spielen.

Weisgut, Jacqueline; Zur Bedeutung des kardialen Histamin H₂-Rezeptors für Arrhythmien in einem transgenen Mausmodell mit herzspezifischer H₂-Rezeptor-Überexpression. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss. 99 Seiten, 2022.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Kardiovaskuläre Wirkungen von Histamin	2
1.3 Histamin-Rezeptoren.....	3
1.4 H ₂ -Rezeptoren	3
1.4.1 Signalkaskade von H ₂ -Rezeptoren des Herzens.....	5
1.4.2 Agonisten und Antagonisten des Histamin-Rezeptors	6
1.4.3 Bisherige Versuchsmodelle	7
1.4.4 Klinische Relevanz der Studien.....	10
2 Zielstellung der Arbeit	14
3 Material und Methoden.....	15
3.1 Puffer und Lösungen	15
3.1.1 Genotypisierung.....	15
3.1.2 Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an Mausvorhofpräparaten.....	15
3.2 Verwendete Substanzen.....	16
3.3 Strukturformeln der verwendeten Substanzen.....	17
3.4 Geräte und Bezugsquellen	18
3.5 Primer.....	19
3.6 Versuchstiere und Tierhaltung	19
3.7 Generierung der transgenen Mäuse.....	19
3.8 Genotypisierung.....	20
3.8.1 Isolation der DNA	20
3.8.2 Konzentrationsbestimmung der DNA.....	21
3.8.3 Polymerase-Kettenreaktion und Agarosegel-Elektrophorese	21
3.9 Hämodynamische echokardiografische Untersuchungen.....	23
3.9.1 Sedierung und Vorbereitung der Tiere.....	23
3.9.2 Echokardiografie.....	23
3.10 Kontraktionsversuche.....	24
3.10.1 Vorbereitung des Organbades	24
3.10.2 Vorbereitung und Kalibrierung der Messanlage	24

3.10.3	Präparation der Herzen	26
3.10.4	Versuchsdurchführung	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Kardiale Wirkungen von Histamin	29
4.1.1	Histamin-Effekte in vitro	29
4.1.2	Histamin-Effekte in vivo	33
4.2	Wirkung von Dimaprit	35
4.3	Arrhythmien	39
4.4	Cimetidin	44
4.5	Effekte von H89, W7, SQ22536	47
4.6	Effekt von Compound 48/80	51
5	Diskussion	55
5.1	Diskussion der Methoden	55
5.1.1	Transgenes Mausmodell	55
5.1.2	Kontraktionsversuche an isolierten Vorhofpräparaten	56
5.1.3	Mausmodell in vivo (Echokardiografie)	56
5.2	Effekte der Histaminrezeptor-Agonisten	57
5.2.1	Wirkung von Histamin	57
5.2.2	Compound 48/80	59
5.2.3	Wirkung von Dimaprit	61
5.3	Histamin-Antagonisten	63
5.3.1	Signaltransduktion der Hemmstoffe	63
5.3.2	Cimetidin	63
5.3.3	H89	64
5.3.4	W7	65
5.3.5	SQ22536	68
5.4	Fazit	72
5.5	Ausblick der Ergebnisse	73
6	Zusammenfassung	75
7	Literaturverzeichnis	76
8	Thesen	89
Anhang	IX
Erklärungen	IX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signaltransduktion des H ₂ -Rezeptors.....	5
Abbildung 2: Genkonstrukt	20
Abbildung 3: H ₂ -Genotypisierung	22
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Echokardiografie-Versuche	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Versuchsapparatur für isometrische Kontraktionsmessungen.....	25
Abbildung 6: Vorhofpräparat in der Versuchsapparatur	27
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Kontraktionsversuche.....	28
Abbildung 8: Mechanogramme mit Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Histamin an linken Vorhofpräparaten von WT und TG	30
Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Histamin an linken Vorhofpräparaten	31
Abbildung 10: Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Histamin an rechten Vorhofpräparaten	32
Abbildung 11: Histamineffekt in vivo an WT und TG (Echokardiografie)	34
Abbildung 12: Mechanogramme mit Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Dimaprit an linken Vorhofpräparaten von WT und TG	36
Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Dimaprit an linken Vorhofpräparaten	37
Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Dimaprit an rechten Vorhofpräparaten.....	39
Abbildung 15: Basale und induzierte Arrhythmien	41
Abbildung 16: Induzierte Arrhythmien an transgenen rechten Vorhofpräparaten in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration im Organbad.....	42
Abbildung 17: Charakterisierung der Arrhythmien.....	44
Abbildung 18: Effekt von Cimetidin an rechten und linken Vorhofpräparaten	45
Abbildung 19: Cimetidin-sensitive Arrhythmien	47
Abbildung 20: Effekte von H89, W7 und SQ22536 an WT und TG.....	49
Abbildung 21: Mechanogramme mit dem Effekt von H89 an linken Vorhofpräparaten von WT und TG	50
Abbildung 22: Mechanogramme mit dem Effekt von W7 an linken Vorhofpräparaten von WT und TG	51
Abbildung 23: Effekte von Compound 48/80.....	53
Abbildung 24: Hemmstoffe in der Signaltransduktion des H ₂ -Rezeptors.....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22
Tabelle 2: Auftreten von Arrhythmien unter Compound 48/80	54
Tabelle 3: Charakterisierung der aufgetretenen Arrhythmien unter Compound 48/80.....	54

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
Arr.	Arrhythmien
ATP	Adenosintri-phosphat
bp	Basenpaare
bpm	Herzschläge pro Minute (Beats per minute)
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
C48/80	Compound 48/80
Ca ²⁺	Ca ²⁺ -Ionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
DAD	Späte Nachdepolarisation
EAD	Frühe Nachdepolarisation
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EC ₅₀	Halbmaximale effektive Konzentration
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
E _{max}	Maximaleffekt
FS	Fraktionierte Verkürzung des Herzens (Fractional Shortening)
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GRK	G-Protein-Rezeptor-Kinase; phosphoryliert GTP bindende Proteine
G _i	Inhibierendes GTP- bindendes Protein
G _s	Stimulierendes GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintri-phosphat
H89	N-[2-(Methylamino)äthyl]-5-isoquinolin-sulfonamid
H ₁ -Rezeptor	Histamin-1-Rezeptor
H ₂ -Rezeptor	Histamin-2-Rezeptor

H ₃ -Rezeptor	Histamin-3-Rezeptor
H ₄ -Rezeptor	Histamin-4-Rezeptor
HCN-Kanäle	Durch Hyperpolarisierung aktivierte Zyklonukleotid-regulierte Kationenkanäle (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel)
HF	Herzfrequenz
Hz	Hertz (pro Minute)
IE	Internationale Einheit
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
Iso	Isoprenalin
kg	Kilogramm
Ktr	Kontrolle
KWK	Konzentrationswirkungskurve
log	Dekadischer Logarithmus
LTCC	L-Typ-Calcium-Kanal
M	Molar (Mol/Liter)
mA	Milliampère
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (Mitogen-activated-protein kinase)
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium ²⁺ -Ionen
MHC	Schwere Kette des Myosins
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromolar
mm	Millimeter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
mmol	Millimol
mN	Millinewton
ms	Millisekunden
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (Messenger ribonucleic acid)
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
nm	Nanometer

nM	Nanomolar (Nanomol/Liter)
OD	Optische Dichte
P	Phosphor/Phosphorylierung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PDE	Phosphodiesterase
pEC ₅₀	Negativer dekadischer Logarithmus der EC ₅₀
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PLB	Phospholamban
Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (Revolutions per minute)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (Reverse transcription polymerase chain reaction)
RyR	Ryanodin-Rezeptor (Ca ²⁺ -Freisetzungskanal)
s	Sekunde
s.c.	Subkutan
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SQ22536	9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amin
SV 40 Poly A	Simian Virus 40-Poly-A-Sequenz (Simian virus 40 polyadenylation signal)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TG	Transgene Maus mit herzspezifischer Überexpression humaner H ₂ -Rezeptoren
TnC	Kalzium-bindendes Troponin (Calcium binding protein)
TnI	Troponin I (Troponin-Inhibitor)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
V	1. Volt / 2. Volumen
vs.	Versus, im Vergleich zu
W7	N-6-Aminoethyl-5-chlor-1-naphthalin-sulfonamid
WT	Wildtyp-Maus

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Die Erstbeschreibung von Histamin wurde im Jahre 1907 durch die deutschen Chemiker A. Windaus und W. Vogt veröffentlicht. Diesen gelang die Synthese von Histamin, damals als Imidazolyläthylamin oder 2-(1H-Imidazol-4-yl)ethanamin bezeichnet, aus der Imidazolylpropionsäure (Windaus und Vogt, 1907). Wenig später entdeckten H.H. Dale und P.P. Laidlaw das Vorkommen von Histamin im Gewebe und somit als körpereigene Substanz (Dale und Laidlaw, 1910; vgl. Neumann et al., 2021). Gleichzeitig beschrieben sie Histamin, unter anderem als Transmitter im Herz-Kreislauf-System und hinsichtlich der Beteiligung in der Anaphylaxie. Noch im selben Jahr zeigte D. Ackermann den Abbau von Histidin zu β -Imidazolyl-äthylamin durch Bakterien und klärte damit die Biosynthese des Histamins auf (Ackermann, 1910). Der Name Histamin anstelle des chemischen Namens Imidazolyläthylamin oder 2-(1H-Imidazol-4-yl)ethanamin wurde in der Zeitspanne von 1910 bis 1912 eingeführt und geprägt (Fühner, 1912).

In den darauffolgenden Jahren wurden sowohl weitere Funktionen von Histamin als auch diverse Histamin-Rezeptoren und Histamin-Wirkungsorte entdeckt und beschrieben. Die Konzentration von Histamin unterscheidet sich je nach Spezies und Organ und ist damit sowohl spezies- als auch organabhängig. Im Organismus kommt Histamin in der Peripherie und im zentralen Nervensystem vor (Li et al., 2007; Panula et al., 2015; vgl. Neumann et al., 2021). Beim Menschen befindet sich die Hauptmenge an Histamin in den Mastzellen, die funktionell heterogen sind (Patella et al., 1995; Jutel et al., 2009). Aber auch in anderen Zellen des Blutes wie Lymphozyten, Basophilen und Blutplättchen kann Histamin nachgewiesen werden (Mannaioni et al., 1997). Am Herzen scheint Histamin ebenfalls zu einem Teil aus Mastzellen zu stammen (Patella et al., 1995; He et al., 2012). Darüber hinaus lässt sich Histamin in sympathischen Nervenendigungen am menschlichen Herzen nachweisen (Singh et al., 1999; He et al., 2012). Die Freisetzung von Histamin aus den Mastzellen wird unter anderem durch Gewebshormone im Rahmen der anaphylaktischen Reaktion oder Arzneimittel, wie z.B. Opiate, Muskelrelaxantien oder Röntgen-Kontrastmittel bedingt. Darüber hinaus spielt auch die Hypoxie eine Rolle bei der Histaminfreisetzung aus den Mastzellen (Maintz et al., 2006).

Histamin spielt als Mediator in der Peripherie unter anderem eine wichtige Rolle bei Entzündungen, Allergien, der Magensäure-Sekretion, der Hämatopoese, der Embryonalentwicklung und der Zellproliferation im Rahmen der Regeneration und Wundheilung (Parsons und Genellin, 2006; Jutel et al., 2009; Coruzzi, 2012). Am Herzen führt Histamin zu

Veränderungen des Blutdruckes, der Frequenz und des Schlagvolumens und besitzt damit eine wichtige Funktion im Herz-Kreislaufsystem. Im zentralen Nervensystem nimmt Histamin Einfluss auf circadiane Rhythmen, die Regulation des Körpergewichts und Lernprozesse (Orr und Quay, 1974; Jørgensen et al., 2007; Zecharia et al., 2012; Almeida et al., 2015; Panula et al. 2015).

Bis heute konnten bereits viele dieser Funktionen von Histamin für die Medizin nutzbar gemacht werden. Sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie diverser Krankheiten finden Medikamente Verwendung., die in den Histamin-Stoffwechsel eingreifen, Histamin als Substanz wird unter anderem zur Diagnostik von Atopien und Allergien mittels Provokationstest und Intrakutantest eingesetzt. Mastzellstabilisatoren und Histamin-Antagonisten stehen bei allergischen Reaktionen zur symptomatischen Therapie zur Verfügung (Graefe, 2011, S. 112-122; Goodman und Gilman, 2018, Kapitel 39, S. 711-725). Zudem helfen Histamin-Antagonisten aufgrund ihrer Wirkungen über die Histamin-Rezeptoren als Antazida und bei Schlafstörungen, Übelkeit und Erbrechen (Orr und Quay, 1975; Zecharia et al., 2012; Gyawali und Foss, 2018; Athavale et al., 2020).

1.2 Kardiovaskuläre Wirkungen von Histamin

Histamin vermittelt aufgrund verschiedener Histamin-Rezeptoren unterschiedliche kardiovaskuläre Wirkungen. Am Herzen bewirkt Histamin über H₂-Rezeptoren sowohl eine positiv chronotrope als auch eine positiv inotrope Wirkung (Graefe, 2011, S. 112-122; Goodman und Gilman, 2018, Kapitel 39, S. 711-725). An den Blutgefäßen kommt es in Abhängigkeit des Gefäßdurchmessers H₁-Rezeptor-vermittelt zu einer Kontraktion an den großen Blutgefäßen, was nachfolgend zu einer Dilatation kleinerer Blutgefäße führt (Marshall, 1984). Bereits 1927 beschrieb C.H. Best exogen eine Blutdrucksenkung durch die Relaxation der glatten Muskulatur arterieller Gefäße und endogen eine Vasodilatation mit ebenfalls folgender Hypotonie (Best et al., 1927). Am menschlichen Herzen bewirkte Histamin an isolierten Trabekeln aus dem rechten Vorhof einen positiv inotropen Effekt (Levi et al., 1981; vgl. Neumann et al., 2021). Auch hatte Histamin an rechten menschlichen Vorhofpräparaten einen positiv chronotropen Effekt über H₂-Rezeptoren, über H₁-Rezeptoren hingegen einen negativ chronotropen und inotropen Effekt (Genovese et al., 1988). Histamin löst je nach Gefäßtyp und in Abhängigkeit von der Spezies entweder eine Vasodilatation oder eine Vasokontraktion aus, teilweise können beide Effekte auch hintereinander ablaufen (Dale und Laidlaw, 1910; Matsuda et al., 2002).

Bisher wurde die kardiovaskuläre Wirkung von Histamin in Bezug auf die Herzfrequenz und auf das Schlagvolumen im Sinne der Inotropie und Chronotropie betrachtet. Darüber hinaus ist Histamin auch für einen negativ dromotropen Effekt verantwortlich. Am Meerschweinchen-

Tiermodell beschrieben Levi und Kuye einen negativ dromotropen Effekt, unter anderem mit Auftreten eines AV-Blocks 3. Grades, der H_1 -Rezeptor vermittelt war (Levi und Kuye, 1974). Darüber hinaus konnte in Versuchsreihen an Hunden in vivo ein dromotroper Effekt beobachtet werden. Nach intravenöser Gabe von Histamin traten unter anderem Herzrhythmusstörungen im Rahmen eines AV-Blocks 1. bis 3. Grades und auch ventrikuläre Arrhythmien auf (Flacke et al., 1967).

1.3 Histamin-Rezeptoren

Aktuell werden vier verschiedene Histamin-Rezeptor-Subtypen (H_1 - H_4) unterschieden (Hill et al., 1997; Jutel et al., 2009; Panula et al. 2015). Diese unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz und in der Größe. Dabei erreichen die H_3 -Rezeptoren durch Spleißvarianten eine besonders große Rezeptorvielfalt. Alle Subtypen der Histamin-Rezeptoren zeigen den Aufbau eines typischen G-Protein-gekoppelten Rezeptors und besitzen jeweils sieben Transmembrandomänen (heptahelikale Membranproteine). Um eine Signaltransduktion und die spezifische Wirkung des Histamins in den verschiedenen Organen zu bewirken sind die Histamin-Rezeptoren an intrazelluläre G-Proteine gekoppelt. Die G-Proteine unterscheiden sich je nach Art des Histamin-Rezeptors. Histamin wirkt dabei entweder als Neurotransmitter oder als Gewebshormon. Die H_1 -Rezeptoren aktivieren die Phospholipase C (Leurs, 1994; Kühn et al., 1996). Die Aktivierung von H_2 -Rezeptoren stimuliert hauptsächlich die Adenylatcyclase aber teilweise auch die Phospholipase C (Kühn et al., 1996). Demgegenüber stehen die H_3 - und H_4 -Rezeptoren, die unter anderem eine Hemmung der Adenylatcyclase bewirken (Chan et al., 2012).

1.4 H_2 -Rezeptoren

Der H_2 -Rezeptorsubtyp wurde im Jahr 1972 zum ersten Mal durch Sir James Whyte Black in seiner Veröffentlichung beschrieben (Black et al., 1988). Zusammen mit dem H_1 -Rezeptorsubtyp nimmt er eine wichtige Rolle im Rahmen der kardiovaskulären Funktionen und somit in der kardiovaskulären Forschung ein. Der H_2 -Rezeptor vermittelt sowohl einen positiv chronotropen als auch positiv inotropen Effekt am Herzen. Zudem kommt der H_2 -Rezeptor auch in Zellen des Gastrointestinaltraktes, in zentralen und peripheren Nervenzellen, in glatten Muskelzellen (z.B. Lunge und Gefäße), in Endothel- und Epithelzellen und in Zellen des Blutes (Neutrophile, Eosinophile, Monozyten, dendritische Zellen, T- und B-Zellen) vor (Akidis und Simons, 2006).

Im Gastrointestinaltrakt sorgt der H_2 -Rezeptor unter anderem für die Stimulation der Magensäure. Bisher sind den H_2 -Rezeptor antagonisierende Medikamente klinisch relevant, die in der Therapie von Magensäure-assoziierten Erkrankungen eingesetzt werden (Graefe, 2011; Goodman und Gilman, 2018). Darüber hinaus kommen H_2 -Rezeptor-Antagonisten in

Kombination mit H₁-Rezeptor-Antagonisten sowohl zur Akuttherapie als auch zur Prophylaxe anaphylaktischer Reaktionen zum Einsatz (Ahnefeld et al., 1994; Pflipsen und Vega Colon, 2020).

Das Gen des humanen H₂-Rezeptors ist auf dem Chromosom 5 lokalisiert und enthält nur ein Exon (Hill et al., 1997). Die Anzahl der Aminosäuren bestimmt die Größe des Rezeptors. H₂-Rezeptoren bestehen aus 359 Aminosäuren und sind im Vergleich zu den anderen Histamin-Subtypen relativ klein. Verschiedene Spleißvarianten und demzufolge mehrere Isoformen, wie bei dem H₃-Rezeptor, sind bei dem H₂-Rezeptor bisher nicht gefunden worden.

Sowohl die Verteilung als auch die Wirkung von H₂- im Vergleich zu H₁-Rezeptoren am Herzen ist unter anderem vom Entwicklungsstand und von der Spezies abhängig. Die Vorhöfe und Ventrikel der Ratten besitzen z.B. wenig H₂-Rezeptoren, hingegen eine hohe Anzahl an H₁-Rezeptoren (Matsuda et al., 2004; vgl. Neumann et al., 2021). In Experimenten konnte Histamin bei den Ratten jedoch keinen relevanten kardialen Effekt auslösen (Matsuda et al., 2004). Im Vergleich zu anderen Spezies findet man am menschlichen Herzen einen hohen Anteil an H₂-Rezeptor-mRNA. Der humane Vorhof exprimiert dabei deutlich größere Mengen an H₂-Rezeptor-mRNA im Vergleich zu den Ventrikeln (Matsuda et al., 2004). Die Expression der H₂-Rezeptoren und auch der H₁-Rezeptoren ist bei den unterschiedlichen Spezies stark altersabhängig. Dies zeigte sich in Experimenten an Meerschweinchen, bei denen der Histamin-Effekt an adulten Tieren denen von postnatalen Tieren gegenüber gestellt wurde (Agata et al., 2010). Bei den neugeborenen Tieren wurde die positiv inotrope Wirkung durch Ranitidin, ein H₂-Rezeptor-Antagonist, gehemmt. H₁- und H₃-Antagonisten hingegen blieben ohne Effekt. Dies führte zur Annahme, dass die positiv inotrope Wirkung von Histamin am linken Ventrikel bei Neugeborenen durch H₂-Rezeptoren vermittelt wird, wohingegen die positiv inotrope Wirkung bei den adulten Tieren über H₁-Rezeptoren erfolgte.

1.4.1 Signalkaskade von H₂-Rezeptoren des Herzens

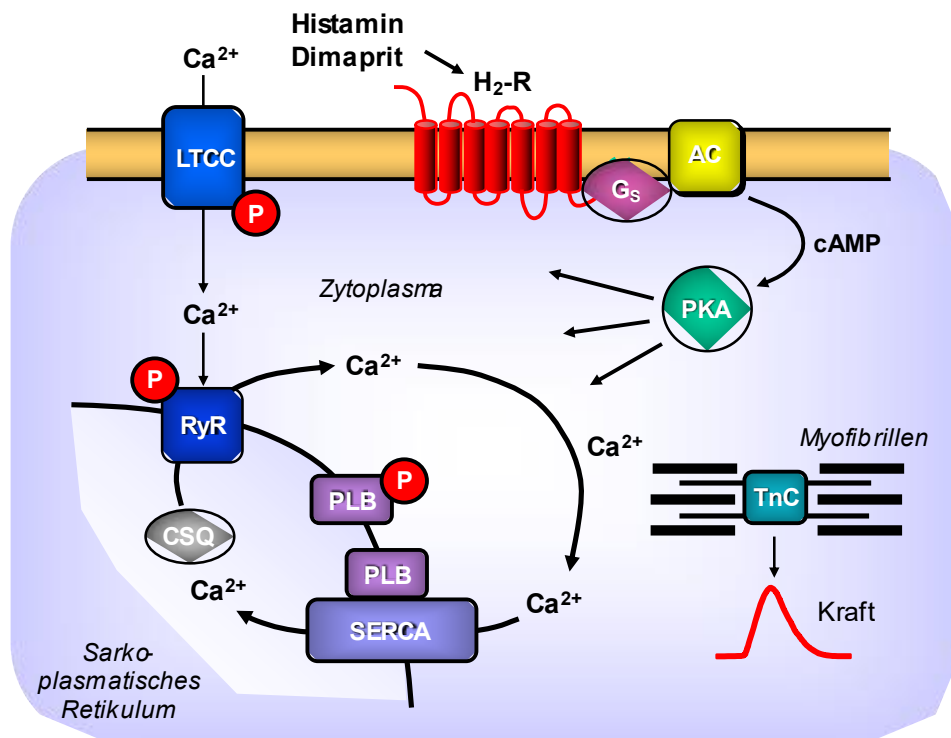


Abbildung 1: Signaltransduktion des H₂-Rezeptors

Histamin bindet an den H₂-Rezeptor. Dadurch wird das G_s-Protein aktiviert, welches wiederum für die Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) zuständig ist. Die Adenylatcyclase steigert cAMP-vermittelt die Aktivität der Proteinkinase A (PKA), wodurch verschiedene Zielproteine in der Zelle phosphoryliert werden. Die Zielproteine der Proteinkinase A sind Phospholamban (PLB), L-Typ-Calcium-Kanäle (LTCC) und Ryanodin-Rezeptoren (RyR). Durch dessen Phosphorylierung kommt es nachfolgend zu einer zytosolischen Ca²⁺-Erhöhung. Diese Ca²⁺-Erhöhung ist notwendig, um eine Kontraktion der Muskelzelle zu bewirken (Libby et al., 2021).

Der H₂-Rezeptor liegt im Sarkolemma und kann durch unterschiedliche Liganden entweder aktiviert oder geblockt werden. Liganden, wie Histamin selbst oder synthetisch hergestellte Agonisten aktivieren, Antagonisten wie z.B. Cimetidin blockieren den H₂-Rezeptor. Der H₂-Rezeptor ist ein G-Protein (=Guanosindiphosphat(GDP)-bindendes Protein) gekoppelter Rezeptor. Bindet ein aktivierender Ligand an den H₂-Rezeptor, wird das gekoppelte G-Protein, welches aus drei Untereinheiten besteht (α , β und γ), aktiviert. Insgesamt werden zwischen drei verschiedenen G-Proteinen unterschieden (G_s, G_i, G_q), die jeweils eine andere Reaktionskaskade auslösen. Im Falle des H₂-Rezeptors wird zumeist das G_s-Protein aktiviert, welches anschließend eine cAMP-abhängige Reaktion auslöst (Jutel et al., 2009). Die Aktivierung des G_s-Proteins hat zur Folge, dass sich die α -Untereinheit, an der das inaktive GDP gebunden ist, von dem Komplex aus β - und γ -Untereinheit absplattet. Das inaktive GDP wird dabei zum aktiven GTP

phosphoryliert. Der Komplex aus α -Untereinheit und GTP bindet an die Adenylatcyclase (AC), welche wiederum aus Adenosintriphosphat (ATP) den sekundären Botenstoff cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) herstellt (Dumius et al., 1988). Bei dieser Reaktion wird GTP zurück zu GDP hydrolysiert, wobei Regulatoren der G-Protein-Signaltransduktion die Hydrolyse beschleunigen (Magalhaes et al., 2012). Der Prozess ist beendet, sobald sich alle G-Protein-Untereinheiten als inaktive Ursprungsform an dem H_2 -Rezeptor befinden. Das entstandene cAMP aktiviert wiederum die Proteinkinase A (PKA) (Kaufmann et al., 1990). Die Proteinkinase A ist ein Enzym, welche im aktivierten Zustand die Serin- oder Threoninreste von verschiedenen Zielproteinen phosphoryliert (Wellner-Kienitz et al., 2003; Zhang et al., 2018).

In der Signalkaskade von H_2 -Rezeptoren am Herzen phosphoryliert die Proteinkinase A drei Zielproteine, die nachfolgend eine zytosolische Ca^{2+} -Erhöhung bewirken. Diese Ca^{2+} -Erhöhung ist notwendig, um eine Kontraktion der Muskelzelle zu bewirken. In der Herzmuskelzelle wird die Ca^{2+} -Erhöhung zum einen durch eine Calcium-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und zum anderen durch eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung erreicht (Fabiato, 1975; Bers, 2008).

Zielproteine der PKA sind Phospholamban (PLB), L-Typ-Calcium-Kanäle (LTCC) und Ryanodin-Rezeptoren (RyR). Der Ryanodin-Rezeptor ist ein Calcium-Kanal, der in phosphoryliertem Zustand vermehrt Calcium-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytosol ausströmen lässt.

Die L-Typ-Calcium-Kanäle, die wie der Histamin-Rezeptor im Sarkolemma lokalisiert sind, sorgen phosphoryliert für den Transport von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum nach intrazellulär in das Zytosol (Libby et al., 2021). Phospholamban hemmt die Ca^{2+} -ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum (SERCA). Bei der Phosphorylierung von Phospholamban wird die Hemmung der Ca^{2+} -ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum (SERCA) aufgehoben, sodass die SERCA ungehindert Ca^{2+} -Ionen zurück in das sarkoplasmatische Retikulum transportieren kann. Hier stehen die Ca^{2+} -Ionen für eine erneute Freisetzung in das Zytosol zur Verfügung (Gergs et al., 2019).

1.4.2 Agonisten und Antagonisten des Histamin-Rezeptors

Die Histamin-Rezeptoren können nicht nur durch Histamin selbst stimuliert werden. Sogenannte Histamin-Analoga, wie zum Beispiel Dimaprit, unterscheiden sich in der Bindungsstruktur für den Histamin-Rezeptor nur geringfügig, sodass Dimaprit als selektiver H_2 -Histamin-Rezeptor-Agonist wirken kann (Seifert et al., 2013). Neben Dimaprit, das in dieser Arbeit eine bedeutende Rolle spielt, gibt es noch zahlreiche weitere Histamin-Analoga, unter anderem Amthamin, Impromidin und 4-Methyl-Histamin (Seifert et al., 2013).

Auf Zellebene wurden Versuche mit Histamin und seinem Analogon Dimaprit an U937-Zellen durchgeführt. U937-Zellen wurden aus einem histiozytären Lymphom eines 37 Jahre alten Mannes im Jahr 1974 isoliert. Aufgrund ihrer monozytischen Eigenschaften werden sie unter anderem zur Forschung und Differenzierung von Monozyten eingesetzt (Sundström und Nilsson, 1976). In Versuchen mit U937-Zellen führte Histamin zu einem erhöhten cAMP-Gehalt in den Zellen. Dimaprit als Histamin-Analogon erzielte hier einen Effekt, der gleich potent und effektiv war, wie der von Histamin (Smit et al., 1994). An T-Lymphozyten hingegen induzierten die Analoga Dimaprit und Impromidin einen cAMP-Anstieg, der im Vergleich zu Histamin eine ähnliche Potenz aufwies, jedoch weniger effektiv war (Schreurs et al., 1984). Dimaprit und Impromidin agieren somit als partielle Agonisten und sind aufgrund der geringeren intrinsischen Aktivität im Vergleich zu Histamin (voller Agonist) gleichzeitig auch kompetitive Antagonisten. Im Gegensatz dazu bewirkten einige Guanidin-Derivate als Histamin-Analoga an rechten Vorhöfen des Meerschweinchens einen Effekt, der bis zu 400-mal potenter war als der von Histamin (Dove, 2004 in Preuss et al., 2007).

Neben Histamin-Analoga nimmt in dieser Arbeit Cimetidin als Histamin-Antagonist einen großen Stellenwert ein. Antagonisten können an den Rezeptor binden, ohne diesen zu aktivieren. Durch die Bindung von Antagonisten an den Rezeptor wird die Rezeptoraktivierung durch Agonisten verhindert (Graefe, 2011, S. 112-122; Goodman und Gilman, 2018, Kapitel 39, S. 711-725). Genauso wie sich die Histamin-Rezeptoren untereinander unterscheiden, gibt es entsprechende Unterschiede bei den Histamin-Rezeptor-Antagonisten – ein Großteil sind selektive Antagonisten. Cimetidin ist zum Beispiel ein selektiver Antagonist, der an den H₂-Rezeptor bindet und diesen blockiert. Zu den Substanzen, die selektiv den H₂-Rezeptor antagonisieren, gehören auch Famotidin, Ranitidin, Burimamid, Tiotidin und Metiamid (Black et al., 1972; Ganellin, 1981; Seifert et al., 2013). Psychopharmaka können teilweise den H₁- und den H₂-Rezeptor antagonisieren (Appl et al., 2012).

Sowohl der Agonismus und der Antagonismus als auch die Effektivität und die Potenz sind Spezies- und auch Substanz-abhängig (Dove 2004 in Preuss et al., 2007).

1.4.3 Bisherige Versuchsmodelle

Die Grundlagenforschung beschäftigt sich schon lange mit dem Thema wie sich Histamin, dessen Analoga und Antagonisten, auf den Organismus auswirken. Hierbei erlangt die Differenzierung der unterschiedlichen Histamin-Rezeptoren und deren Funktion eine immer größer werdende Bedeutung. Es wurden bereits zahlreiche Versuche durchgeführt, sowohl in vitro an

rekombinanten Zellsystemen, an tierischen und humanen Geweben als auch in vivo am gesamten Organismus.

Die kardialen Effekte von Histamin sind am Menschen schon sehr früh untersucht worden (Jäger, 1913). Bereits 1932 erschien eine umfangreiche Arbeit, in der die kardialen Wirkungen von Histamin am Menschen in vivo untersucht worden sind (Weiss et al., 1932). Histamin wurde den Versuchspersonen auf unterschiedliche Weise injiziert (intravenös, oral oder subkutan). Es bewirkte bei intravenöser Gabe eine Dosis-abhängige Tachykardie; das Schlagvolumen fiel, das Herzzeitvolumen stieg jedoch geringfügig an. Im abgeleiteten Oberflächen-EKG fiel ebenfalls eine Tachykardie und ein Abfall der T-Welle auf. Arrhythmien wurden in der Versuchsreihe nicht beschrieben.

Weitere Versuche in vivo am Menschen wurden mithilfe von Linksherzkatheteruntersuchungen durchgeführt. Histamin bewirkte nach Infusion in die Vena brachialis eine Zunahme der Herzfrequenz, des Schlagvolumens sowie des Herzzeitvolumens und eine Senkung des peripheren Widerstandes sowie des linksventrikulären end-diastolischen Drucks. Es blieb jedoch unklar, welche dieser Effekte direkt über H_1 -Histamin-Rezeptoren, H_2 -Histamin-Rezeptoren oder auch über β -Adrenozeptoren bedingt waren (Vigorito et al., 1983).

Um die Effekte von Histamin speziell auf das Herz und auf die Gefäße weiter zu differenzieren, wurden Versuche in vitro an isolierten Gefäßen, Vorhöfen und Ventrikelpräparaten durchgeführt. An menschlichen Koronarien, die im Rahmen von Operationen am Herzen explantiert wurden, konnte Histamin an den rechten und linken Koronarien eine Vasokonstriktion über H_1 - und eine Vasodilatation über H_2 -Histamin-Rezeptoren auslösen (Ginsburg et al., 1980; vgl. Neumann et al., 2021).

Je nach Gefäß-Typ und Spezies vermittelte Histamin entweder eine Vasodilatation oder eine Vasokonstriktion, teilweise trat auch beides hintereinander auf (Dale und Laidlaw, 1910; Matsuda et al., 2002).

An isolierten Trabekeln aus dem rechten Vorhof des menschlichen Herzens bewirkte Histamin einen positiv chronotropen Effekt, der Cimetidin-sensitiv war. Zudem wurden durch Histamin Arrhythmien indiziert, die sowohl Verapamil- als auch Cimetidin-sensitiv waren (Levi et al., 1981). Neben dem chronotropen Effekt konnte zudem ein zeit- und konzentrationsabhängiger positiv inotroper Effekt unter Histamin-Gabe gemessen werden.

Neben den humanen Versuchsreihen wurde die Wirkung von Histamin auch an Tiermodellen untersucht. An Vorhöfen von Kaninchen konnte sowohl der positiv inotrope Effekt an linken Vorhöfen als auch der positiv chronotrope Effekt an rechten Vorhöfen untersucht werden. Die

positiv inotropen und positiv chronotropen Effekte gingen jeweils mit einem cAMP- und cGMP-Anstieg einher, der durch Cimetidin als H₂-Rezeptor-Antagonist blockierbar war. (Hattori et al., 1988; vgl. Neumann et al., 2021).

Das Meerschweinchen ist ein häufig verwendetes Tiermodell in Versuchen, die sich mit den H₁- und H₂-Histamin-Rezeptoren beschäftigen. An isolierten linken Vorhöfen konnte durch Histamin ein positiv inotroper Effekt über H₁-Histamin-Rezeptoren ohne cAMP-Anstieg; an den rechten Vorhöfen ein positiv inotroper Effekt über H₂-Histamin-Rezeptoren, teilweise mit und ohne cAMP-Anstieg, beobachtet werden (Reinhardt et al., 1977; Verma und McNeill, 1977). Bei weiteren Versuchen wurden mithilfe von Bindungsstudien an den linken Vorhöfen des Meerschweinchens H₁- und H₂-Histamin-Rezeptoren gefunden; der Kraftanstieg bzw. der positiv inotrope Effekt war jedoch IP₃-bedingt und somit nur über die H₁-Histamin-Rezeptoren vermittelt (Francis et al., 2012). Die H₂-Histamin-Rezeptoren sind demnach in den linken Vorhöfen der Meerschweinchen zwar präsent, koppeln anscheinend jedoch nicht an die Kontraktionskraft.

Der durch Histamin induzierte positiv chronotrope Effekt an isoliert perfundierten Meerschweinchen-Herzen und der positiv inotrope Effekt an Präparaten aus dem rechten Ventrikel waren hingegen H₂-Rezeptor vermittelt (Levi und Kuye, 1974; Verma und McNeill, 1977).

Der H₂-Rezeptor stimuliert auf physiologischer Ebene die Adenylatcyclase-Aktivität; der cAMP-Gehalt steigt. Dieser Signalweg ist durch den H₂-Rezeptor-Antagonist Cimetidin hemmbar. Der H₁-Rezeptor vermittelte Effekt wirkte hingegen über Inositoltrisphosphat (Baumann et al., 1981; Klein und Levey, 1971).

Auch bei diesem Tiermodell bleibt unklar, ob die Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen exprimiert sind, da die Versuche an multizellulären Präparaten durchgeführt worden sind (Hattori et al., 1991).

Histamin führt in Abhängigkeit von der Konzentration, der Spezies und des Gewebes zu verschiedenen Effekten. Selbst bei Spezies einer Art gab es lokale Unterschiede in Abhängigkeit von der geografischen Region, in der sie lebten (Verma und McNeill, 1977). Die Histamin-Rezeptoren können je nach Gewebe unterschiedliche Signalwege aktivieren. Diese wiederum differieren je nach Histamin-Rezeptor-Subtyp. Um die Signalwege der Histamin-Rezeptoren bzw. des H₂-Histamin-Rezeptors besser analysieren und verstehen zu können, ist eine differenzierte Betrachtung des H₂-Histamin-Rezeptors notwendig.

Für viele Forschungsreihen werden als Tiermodelle üblicherweise Mäuse oder Ratten verwendet. Diese eignen sich jedoch für die Differenzierung des H₂-Histamin-Rezeptors nur bedingt. Bei Versuchen an Vorhöfen der Ratte kam es unter Histamin zwar zu einem negativ

chronotropen Effekt, der jedoch weder durch H₁- noch H₂-Histamin-Rezeptor-Stimulation erklärt werden konnte (Dai et al., 1976). Es ist davon auszugehen, dass die Ratte keinen funktionell wirksamen Histamin-Rezeptor im Vorhof besitzt (Wellner-Kienitz et al., 2003) und der negativ chronotrope Effekt von Histamin durch die Freisetzung von Acetylcholin bedingt ist (Laher und McNeill, 1980). Auch der negativ inotrope Effekt an isoliert perfundierten Herzen der Ratte konnte nicht mit einer H₁- oder H₂-Histamin-Rezeptor-Stimulation erklärt werden, sondern wurde durch die Freisetzung von Noradrenalin erklärt (Went et al., 1952).

Bei Mäusen bewirkte Histamin intravenös injiziert einen Blutdruckabfall, jedoch keine Änderung der Herzfrequenz (Suzuki et al., 2005). Höhere Konzentrationen von Histamin führten hingegen zu einem geringen Blutdruckanstieg und Abfall der Herzfrequenz (Suzuki et al., 2005). In einer weiteren Versuchsreihe mit H₂- oder H₁-Histamin-Rezeptor-Knock-out oder Doppel-Knock-out Mäusen wurde unter basalen Bedingungen durch Histamin keine Veränderungen der Herzfrequenz oder des Blutdrucks eruiert (Suzuki et al., 2005). An linken und rechten Vorhöfen von Mäusen blieb die Gabe von Histamin ohne Effekt; erst sehr hohe Histamin-Konzentrationen führten am linken Vorhof zu einem negativ inotropen und am rechten Vorhof zu einem positiv chronotropen Effekt, die durch H₂-Rezeptor-Antagonisten blockierbar waren (Goren et al., 1995; Liu et al., 2002). Ebenso bewirkte Histamin am Ventrikel der Maus keinen Effekt, bzw. war erst bei sehr hohen Histamin-Konzentrationen ein geringer negativ inotroper Effekt beobachtbar, ebenfalls durch H₂-Rezeptor-Antagonisten aufhebbar (Goren et al., 1994).

An isolierten Mauserzen wurde eine akute Ischämie induziert und die Freisetzung von kardialem Histamin und der damit verbundenen ventrikulären Arrhythmogenese beobachtet. Die Freisetzung von Histamin war dabei assoziiert mit der Entwicklung von Ischämie-induzierter ventrikulärer Tachykardie und Kammerflimmern. Gleichzeitig konnte die Inzidenz und die Dauer der induzierten ventrikulären Arrhythmien in Gegenwart des selektiven H₂-Rezeptor-Antagonisten Famotidin verringert werden (He et al., 2012; vgl. Neumann et al., 2021).

1.4.4 Klinische Relevanz der Studien

Histamin-Rezeptoren lassen sich am menschlichen Herzen nachweisen (Wolff und Levi, 1986; Patella et al., 1995). Durch Faktoren, die den Histamin-Spiegel deutlich erhöhen, bekommen die Histamin-Rezeptoren am Herzen eine klinische Bedeutung. Eine Erhöhung des Histamin-Spiegels kann unter anderem durch Pharmaka oder durch pathophysiologische Ereignisse bedingt sein. Morphin und dessen Derivate können beim Menschen Histamin aus Mastzellen freisetzen, sodass der Histamin-Spiegel im Plasma steigt und zu Blutdruckabfall, Hautrötung und Tachykardie führt (Moos und Rosow, 1983).

Neben Pharmaka, die eine Erhöhung der Histamin-Konzentration bedingen, gibt es auch Pharmaka, die als Agonist oder Antagonist an Rezeptoren agieren. Ein klassisches Beispiel hierfür sind typische Antidepressiva und Neuroleptika, die vorrangig als Antagonisten (selten auch als partielle Agonisten) an Histamin-Rezeptoren arbeiten. Amitriptylin blockiert als Antagonist H₂-Rezeptoren (Appl et al., 2012).

Ein Großteil der Patienten sind multimorbide und nehmen eine Vielzahl an Medikamenten ein, sodass auch Interaktionen mit Pharmaka betrachtet werden müssen. Nach längerer Gabe von β -Adrenozeptor-Blocker konnte in den Gewebeproben ein erhöhtes Auftreten von Histamin-bedingten Arrhythmien beobachtet werden (Sanders et al., 1996); diese waren durch Cimetidin oder Verapamil hemmbar und somit H₂-Rezeptoren und LTCC vermittelt. Auch bei gleichzeitiger Gabe von Herzglykosiden konnte Histamin häufiger Arrhythmien hervorrufen (Levi et al., 1981).

Neben Pharmaka gibt es auch diverse Pathomechanismen im Rahmen von Erkrankungen, die zu einer erhöhten Konzentration an Histamin führen. Während einer Ischämie bzw. eines Myokardinfarktes wird aus dem Herzen Histamin freigesetzt (Genovese et al., 1988; Reid et al., 2011). Auf Ebene der Rezeptoren konnte Histamin über NO-Bildung und H₂-Histamin-Rezeptoren eine Koronardilatation indizieren, sodass Histamin in einem infarzierten Gebiet über die H₂-Rezeptoren einen protektiven Mechanismus zugeschrieben werden könnte (Pierpaoli et al., 2003). In einer Versuchsreihe mit Hunden wurde den H₂-Rezeptoren eine kardioprotektive Wirkung zugeschrieben, indem sie das Herz vor Ischämien schützten und die Größe des Infarktes positiv beeinflussten (Asanuma et al., 2006).

Dass es einen engen Zusammenhang zwischen allergischem Schock und Histamin über H₁-Rezeptoren gibt, ist lange bekannt. In Allergie-Versuchen wurden in diesem Zusammenhang auch H₁-Rezeptor vermittelte Arrhythmien beschrieben, unter anderem Sinustachykardien, junctionale Extrasystolen, AV-Blöcke, ventrikuläre Ektopien bis hin zum Kammerflimmern (Capurro et Levi, 1973). Supraventrikuläre Arrhythmien werden durch H₂-Rezeptor-Blocker unterbrochen und eine Verlängerung der AV-Überleitung durch H₁-Rezeptor-Blocker bedingt. H₁- und H₂-Rezeptor-Blocker könnten klinisch demnach in Erwägung gezogen werden, wenn Standard-Arrhythmika wirkungslos bleiben (Wolff und Levi, 1986). Das Auftreten von Arrhythmien korreliert mit der Höhe des Histamin-Plasmaspiegels (Rai et al., 1976).

Auch bei Patienten mit Arteriosklerose spielt Histamin klinisch eine Rolle. An epikardialen Koronarien kann Histamin eine Kontraktion auslösen, die wiederum zu Vasokonstriktion, Ischämien und Arrhythmien führt (Ginsburg et al., 1981). In der Klinik kann dies zum Beispiel bei einer Anaphylaxie durch Gabe von Jod-haltigem Röntgen-Kontrastmittel auftreten. Gefäße

reagieren dabei empfindlicher auf Histamin, je höher der Grad der Arteriosklerose ausgeprägt ist (Ginsburg, 1984). Demgegenüber kann Histamin auch bei der Entstehung einer Arteriosklerose, eine proinflammatorische Erkrankung, in Zusammenhang stehen. Histamin wirkt proinflammatorisch und stimuliert die Proliferation von glatten Muskelzellen. Histamin freisetzende Mastzellen waren in arteriosklerotisch veränderten Karotiden und Koronarien von Menschen vermehrt nachweisbar (Jeziorska et al., 1997; Laine et al., 1999; Huang et al., 2002). Im Rahmen einer Arteriosklerose können diese Mastzellen zur Destabilisierung der Plaque führen und somit letztendlich eine Angina pectoris oder einen Myokardinfarkt bedingen (Kennedy et al., 2013).

Noch relativ neu in der Literatur beschrieben ist der „allergische Myokardinfarkt“ – das sogenannte Kounis-Syndrom, bei dem das gleichzeitige Auftreten eines akuten Koronarsyndroms bis hin zum Myokardinfarkt zusammen mit systemisch anaphylaktischen oder anaphylaktoiden Überempfindlichkeitsreaktionen beschrieben wird (Kraus et al., 2012). Hierfür werden Mediatoren aus Mastzellen, insbesondere Histamin, verantwortlich gemacht (Kennedy et al., 2013).

Bei dem Pathomechanismus der Herzinsuffizienz gibt es aktuell kontroverse Meinungen, inwiefern Histamin hier eine beeinflussende Rolle spielt. Zum einen konnten H₂-Rezeptor-Agonisten (z.B. Impromidin) bei Patienten mit einer dekompensierten Herzinsuffizienz eine hämodynamisch günstige Wirkung zeigen (Baumann et al., 1984; Felix et al., 1995; vgl. Neumann et al., 2021). Zum anderen reduzierte der H₂-Histamin-Rezeptor-Antagonist Famotidin die Inzidenz einer Herzinsuffizienz (Kim et al., 2004). Demgegenüber soll der Histamin-Anstieg im Rahmen einer Mastozytose die Entwicklung einer Herzinsuffizienz begünstigen (Klock et al., 2007). In einer Meta-Analyse wurden insgesamt zehn Studien einbezogen, um die Auswirkungen von H₂-Rezeptor-Antagonisten auf die Myokardfunktion bei Herzinsuffizienz-Patienten zu klären. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass H₂-Rezeptor-Antagonisten negativ inotrope und chronotrope Effekte ausüben, um die Herzfrequenz und den Blutdruck zu senken, was letztendlich den Myokard-Sauerstoffbedarf verringerte und zu einer Verbesserung der Herzinsuffizienz-Symptome führte (Zhang et al., 2018). Mit Hilfe einer weiteren Studie, der MESA-Studie (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis), wurde untersucht, ob die Einnahme von H₂-Rezeptor-Antagonisten über eine gewisse Zeit mit dem Vorkommen von Herzinsuffizienz und Veränderungen in der linksventrikulären Morphologie assoziiert ist. Die Anwendung der H₂-Rezeptor-Antagonisten war dabei mit einem reduzierten Risiko für das Vorkommen von Herzinsuffizienz verbunden. Zudem deutete die linksventrikuläre Herzmorphologie im Laufe der Zeit bei Anwendung von H₂-Rezeptor-Antagonisten auf weniger altersbedingte Veränderungen

hin. Eine Assoziation zwischen dem Einsatz der H₂-Rezeptor-Antagonisten und der linksventrikulären Masse oder der Auswurffraktion gab es hingegen nicht (Leary et al., 2016; vgl. Neumann et al., 2021).

Eine Sepsis bedingt oftmals einen tödlichen Verlauf. Ein neuer alternativer Therapieansatz könnten hier H₂-Rezeptor-Agonisten sein (Takahashi et al., 2004). Die Injektion von Histamin verbesserte über H₂-Histamin-Rezeptoren die Prognose einer Sepsis deutlich (Yokoyama et al., 2004).

Zusammenfassend gibt es im klinischen Alltag diverse (kardiale) Erkrankungen, Wechselwirkungen und Ansatzpunkte, die mit Histamin und dem H₂-Rezeptor in Verbindung stehen. Zum Verständnis der Pathomechanismen und der isolierten Wirkungen ist deshalb eine differenzierte Betrachtung des H₂-Rezeptors am Herzen notwendig, was mithilfe unseres transgenes Mausmodells ermöglicht wird.

2 Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Signalwege des H₂-Histamin-Rezeptors besser analysieren und verstehen zu können. Hierfür war eine differenzierte Betrachtung des H₂-Histamin-Rezeptors notwendig. Mit den bisher bekannten Versuchsmodellen konnte dieses Ziel nicht erreicht werden, sodass zunächst ein passendes Tiermodell zur Differenzierung des H₂-Rezeptors etabliert werden musste. Aufgrund dessen und der Tatsache, dass die Mausequenz auf Proteinebene mit der menschlichen Sequenz eine Homologie von 85% aufweist, war ein neues Versuchsmodell mit Mäusen nahe liegend. Ziel war es, die kardialen Einflüsse durch Histamin isoliert über den H₂-Histamin-Rezeptor differenzieren zu können. Hierfür war also eine Wildtyp-Maus notwendig, die durch funktionelle Histamin-Rezeptoren am Herzen keine kardialen Veränderungen unter Basalbedingungen zeigt. Demgegenüber steht die transgene Mausreihe, die den humanen H₂-Rezeptor ausschließlich im Herzen überexprimiert.

In Versuchsreihen mit diesem Mausmodell wurden an isolierten Vorhofpräparaten H₂-Rezeptor-überexprimierender Mäuse arrhythmische Kontraktionen beobachtet, die sowohl spontan als auch Histamin-induziert auftraten (Meister et al., 2014). Für die nähere Charakterisierung dieser möglichen proarrhythmischen Effekte erfolgten weitere Versuche am H₂-Rezeptor sowohl mit dem endogenen Agonisten Histamin als auch mit dem synthetischen Agonisten Dimaprit. Im Rahmen dieser Arbeit sollten neben der statistischen Erfassung und Differenzierung der Arrhythmien auch neue Erkenntnisse über die Pathogenese dieser Arrhythmien gewonnen werden. Hierzu wurden mithilfe von Antagonisten bzw. Gegenspieler (Cimetidin, H89, SQ22536 und W7) unterschiedliche Signalwege, wie die des H₂-Rezeptors, der Proteinkinase A (PKA), der Adenylatcyclase (AC) sowie der Ca²⁺-/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMKII) gezielt inhibiert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, dass unter Verwendung von Compound 48/80 in Versuchen an isolierten Vorhofpräparaten des genannten Mausmodells nicht nur die exogene, sondern auch die endogene Histaminfreisetzung näher charakterisiert wird.

3 Material und Methoden

3.1 Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden in pro *analysi*-Qualität oder im besten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, wurde für die Puffer und Lösungen Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage verwendet.

3.1.1 Genotypisierung

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

3.1.2 Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an Mausvorhofpräparaten

Tyrode- Lösung

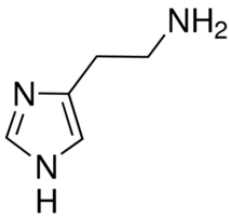
Stamm I	NaCl 17,5 % (g/V), KCl 1,005 % (g/V), MgCl ₂ x 6H ₂ O 0,56 % (g/V)
Stamm II	NaHCO ₃ 5,00 % (g/V)
Stamm III	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0,29 % (g/V)
NaCl	119,8 mM
KCl	5,4 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,1 mM
NaHCO ₃	22,6 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,42 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,8 mM
Glucose	5,05 mM
Ascorbinsäure	0,28 mM
Na ₂ EDTA	0,05 mM
pH 7,4	

3.2 Verwendete Substanzen

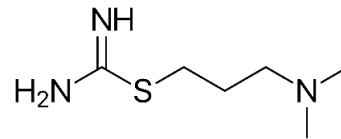
Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts, Philadelphia, USA
L (+) – Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma- Aldrich, Steinheim
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Chloroform	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Isoamylalkohol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Cimetidin	Sigma- Aldrich, Steinheim
Compound 48/80	Sigma- Aldrich, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma- Aldrich, Steinheim
Dimaprit	Sigma- Aldrich, Steinheim
Disulfiram	European Pharmacopoeia Reference Standard
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
Glycerol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
H89	Sigma- Aldrich, Steinheim
HCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Heparin	Biochrom AG, Berlin
Histamin	Sigma- Aldrich, Steinheim
Isoamylalkohol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Isoprenalin	Sigma- Aldrich, Steinheim
KCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ EDTA	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
NSD1015	Sigma- Aldrich, Steinheim

Pentobarbital	Spofa, Prag
Phenol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Pyridoxal-5- Phosphat	Sigma- Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Sigma- Aldrich, Steinheim
Propranolol	Sigma- Aldrich, Steinheim
Saccharose	Sigma- Aldrich, Steinheim
SQ22356	Sigma- Aldrich, Steinheim
PCR- Puffer, 15 mM MgCl ₂	Ampliqon, Odense
Taq- DNA- Polymerase	Ampliqon, Odense
Tranlylcypromin	Tocris Bioscience, Bristol
Tris- hydroxymethyl-aminomethan	Fluka AG, Buch
Tyramin	Sigma- Aldrich, Steinheim
W7	Sigma- Aldrich, Steinheim

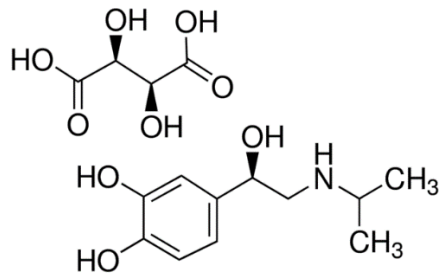
3.3 Strukturformeln der verwendeten Substanzen



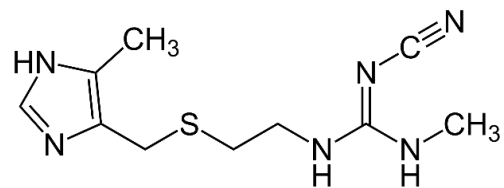
Histamin



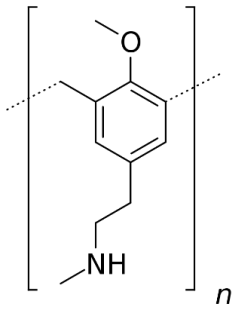
Dimaprit



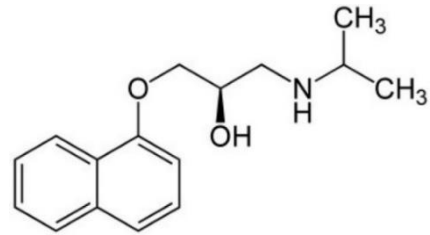
(-)-Isoproterenol -(+)-bitartratsalz



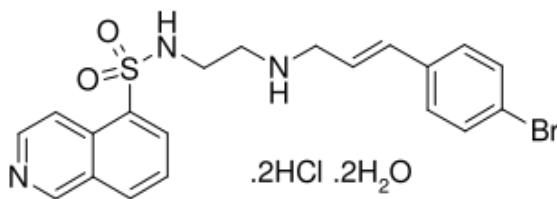
Cimetidin



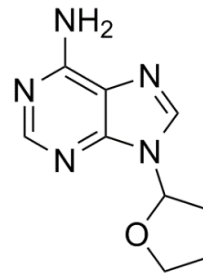
Compound 48/80
(Poly({2-methoxy-5-[2-(methylamino(ethyl)-1,3-phenylen)methylen



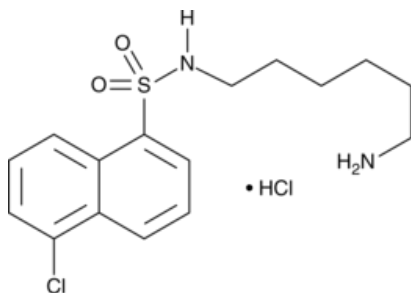
DL-Propranolol (Racemat)



H89
(N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamid Dihydrochlorid)



SQ22536
(9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amin)



W7
(N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamid Hydrochlorid)

3.4 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

Prism 5; Graphpad Software, San Diego, USA

3.5 Primer

Forward Primer MHC-Seq-P1 (5'-ACCCTTACCCCACATAGACC-3')

Reverse Primer hH2R-SEQ-P1R (5'-AGCAGGTCAGTGATAGCCAA-5')

3.6 Versuchstiere und Tierhaltung

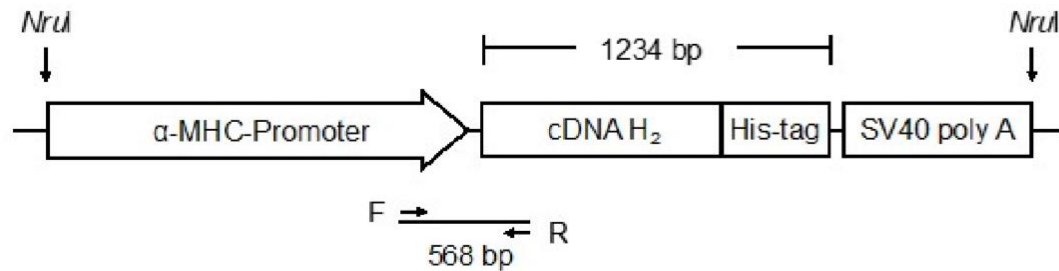
Für die Experimente wurden Mäuse der Auszuchtlinie CD1 verwendet. Das Durchschnittsalter der Versuchstiere betrug am Versuchstag $177 \pm 4,94$ Tage und sie wogen im Mittel $36,99 \pm 1,11$ Gramm. Männliche und weibliche Tiere wurden dabei in annähernd gleicher Anzahl verwendet.

Zuständig für Zucht und Haltung der Versuchstiere war die Core-Facility Tierhaltung der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Die Mäuse wurden mit handelsüblichem Labortierfutter und Wasser ad libitum versorgt. Die Mäuse wurden nach Geschlecht getrennt und nur für die Verpaarung zusammengesetzt. Sämtliche Genehmigungen für die Haltung als auch den Umgang mit gentechnisch veränderten Mäusen lagen sowohl für die Core-Facility Tierhaltung als auch für das Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor. Ultraschalluntersuchungen erfolgten entsprechend dem genehmigten Tierversuchsantrag (Az.:42502-2-1078-MLU,28.11.2011-28.11.2016).

3.7 Generierung der transgenen Mäuse

Für die Versuche wurde eine transgene Mauslinie verwendet, die den humanen H₂-Histamin-Rezeptor ausschließlich im Herzen überexprimiert (Gergs et al., 2019; vgl. Neumann et al., 2021). Die kodierende Sequenz des menschlichen Histamin-H₂-Rezeptors wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Seifert (Institut für Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt. Die cDNA wurde in eine Expressionskassette inkloniert, welche den Promotor der α -Isoform der schweren Kette des Myosins (α -MHC) der Maus enthielt. Mithilfe dieses Promotors konnte eine Herzmuskelzell-spezifische Expression des Rezeptorgens gewährleistet werden. Terminiert wurde die Transkription durch eine Simian-Virus-40 (SV40)-Poly-A-Signalsequenz, welche in der Expressionskassette enthalten war (Gergs et al., 2010, 2019).

Anschließend wurde die Expressionskassette in befruchtete Eizellen von FVB/N-Mäusen mikroinjiziert. Die dabei entstandenen transgenen Tiere zeigten eine herzspezifische Überexpression des H₂-Histamin-Rezeptors und wurden in einen CD1-Hintergrund eingekreuzt (Gergs et al., 2019).



Genotypisierungs-PCR:

F = Forward-Primer: MHC-Seq-P1 (5'-ACCCTTACCCCACATAGACC-3')

R = Reverse Primer: hH2R-SEQ-P1R (5'-AGCAGGTCAGTGATAGCCAA-3')

Produktgröße: 568 bp

Abbildung 2: Genkonstrukt

Die kodierende Sequenz des menschlichen Histamin-H₂-Rezeptors wurde mit einem C-terminalen His-tag (=6x Histidin) kombiniert und in die Herzmuskelzell-spezifische Expressionskassette inkloniert.

3.8 Genotypisierung

3.8.1 Isolation der DNA

Jeder Maus wurde im Alter von vier Wochen ein etwa 3-5 mm langes Schwanzstück abgetrennt. Zur Erkennung erhielten sie eine individuelle Ohrmarkierung. Die Schwanzspitzenbiopsie wurde unter Zugabe von 700 µl TE-/SDS-Puffer und 30 µl Proteinase K bei konstanten 56°C ca. zwölf Stunden schüttelnd proteolytisch aufbereitet. Der TE-Puffer ist ein biochemischer Puffer, der aus einer wässrigen Lösung von Tromethamin und EDTA besteht. Er wird eingesetzt, um DNA und RNA zu lagern und diese gleichzeitig vor dem Abbau zu schützen. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Tensid mit denaturierender Wirkung für Proteine (Laemmli, 1970).

Um die genomische DNA aus dem Lysat zu gewinnen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion vorgenommen (Sambrook et al., 1989). Durch diese Vorgehensweise wird die Trennung der Proteine und Nukleinsäuren mithilfe des Phenols und Chloroforms (700 µl puffergesättigtes Phenol) erreicht. Durch Zentrifugation (5 Minuten; 14.000 rpm) entstanden dabei jeweils eine

wässrige (obere) und eine organische (untere) Phase. Die DNA war in der wässrigen Phase enthalten; Proteine und andere Verunreinigungen reichern sich hingegen in der organischen Phase und der Interphase an. Die wässrige Phase mit der DNA wurde separiert und anschließend einem zweiten Extraktionsschritt unterzogen. Dazu wurde sie mit jeweils 350 µl Phenol und einem Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) vermengt und zentrifugiert (5 Minuten; 14.000 rpm). Um Phenolreste zu beseitigen und um die DNA zu sedimentieren, wurde die wässrige Phase mit Natriumacetat (70 µl; pH=6) und absoluten Ethanol versetzt und anschließend zentrifugiert (10 Minuten; 14.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene DNA-Sediment mit Ethanol (1 ml; 70 %) gewaschen und zentrifugiert (10 Minuten; 14.000 rpm). Nach der erneuten Entfernung des Überstandes konnte das DNA-Sediment bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend mit 50 µl TE-Puffer versetzt und bei 65 °C für 15 Minuten gelöst werden. Die Lagerung der DNA-Proben bis zu ihrer Weiterverwendung erfolgte dann bei 4 °C.

3.8.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Durch Messung der Extinktion bei 260 nm (E_{260}) mit Hilfe eines Photometers (Biophotometer, Eppendorf) konnte die optische Dichte (OD) der DNA-Probe und somit ihre DNA-Konzentration bestimmt werden. Als Kontrollwert erfolgte eine Leerwertmessung ohne DNA. Bei einem OD_{260} -Messwert von 1,0 und der üblichen Schichtdicke der Messküvette von 1 cm enthält die Probe 50 µg/ml doppelsträngige DNA. Daraus ergibt sich die Formel für den DNA-Gehalt: $E_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} = X \text{ µg/ml}$. Die Qualität einer Probe kann mit Hilfe des Quotienten aus der OD_{260} und OD_{280} abgeschätzt und beurteilt werden. Liegt der Quotient dabei zwischen 1,8 und 2,0, ist die DNA-Probe annähernd frei von Proteinen und Verunreinigungen. Um die Qualität der verwendeten DNA-Probe zu ermitteln, wurde die optische Dichte deshalb ebenfalls bei 280 nm gemessen.

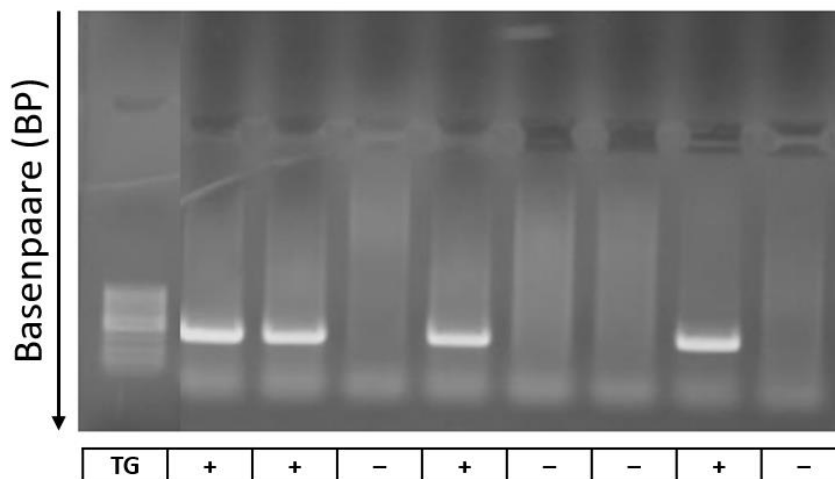
3.8.3 Polymerase-Kettenreaktion und Agarosegel-Elektrophorese

Die Amplifikation des gesuchten DNA-Fragments fand mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) statt. Dafür wurde die DNA-Probe einem entsprechenden Reaktionsansatz zugesetzt. Dieser enthielt pro Probe jeweils 1 x PCR-Puffer mit 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTP-Mix, je 1 µM forward- und reverse-Primer und 2,5 U Taq DNA-Polymerase. Die Proben wurden mit DEPC-Wasser aufgefüllt, um eine Gesamtmenge von 50 µl zu erreichen. Die Ausführung der PCR erfolgte mit einem Eppendorf Thermocycler. Das erwartete PCR-Produkt hatte eine Größe von 508 bp.

Tabelle 1: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Denaturierung	94°C	2 min	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	45 s	30 Zyklen
Annealing	56°C	15 s	
Elongation	72°C	30 s	
Elongation	72°C	10 min	1 Zyklus

Mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese, bei der kleine Moleküle im elektrischen Feld schneller wandern als große Moleküle, konnten die PCR-Produkte unter Verwendung eines interkalierenden DNA-Farbstoffs und UV-Licht nachgewiesen werden. Für die Bestimmung der Fragment-Größe wurde ein zusätzlicher Marker, sowie eine Positiv- und Negativkontrolle verwendet. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte hier in 1 %-igen Agarosegelen, wobei die Proben zuvor mit jeweils 8 µl Ladepuffer versehen wurden. Anschließend wurde das Agarosegel für ca. 45 Minuten an eine Spannung von 80 mV angeschlossen. Das Ergebnis der Genotypisierung ließ sich mittels Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht in Form von sichtbaren DNA-Banden ermitteln (Abb. 3).

Abbildung 3: H₂-Genotypisierung

3.9 Hämodynamische echokardiografische Untersuchungen

3.9.1 Sedierung und Vorbereitung der Tiere

Die Tiere wurden für die Herzultraschall-Versuche mit einem volatilen Narkosegas (Isofluran) narkotisiert. Hierfür wurden verschließbare Bechergläser verwendet, in denen der Gaszufuhrschlauch mit dem Isofluran mündete. Die Maus wurde in das Becherglas gesetzt und zwei Minuten lang mit einem Gemisch aus 2 Vol. % Isofluran und einem Sauerstoff Flow von 1,5 l/min begast. Nach suffizienter Narkotisierung erfolgte die Befestigung des Tieres über alle Extremitäten mittels Kunstseidenpflaster (Transpore M3) auf dem beheizbaren Untersuchungstisch. Die Extremitäten wurden auf speziellen Kontakten befestigt, worüber das EKG des Tieres abgeleitet wurde. Die Körpertemperatur des Tieres wurde rektal mithilfe eines Thermometers ermittelt und automatisch über die Heizfunktion des Tisches reguliert. Ein Inhalationsschlauch befand sich oberhalb des Mauskopfes, über den die Maus während des Versuches mit 1,5 Vol. % Isofluran weiter begast und ein vorzeitiges Aufwachen verhindert wurde. Im Anschluss erfolgte die Fellentfernung vom Thorax mithilfe einer handelsüblichen Enthaarungscreme (Plica-/Veet). Abschließend wurde angewärmtes Ultraschallgel auf den Thorax des Tieres aufgetragen.

3.9.2 Echokardiografie

Nach Beendigung aller Vorbereitungen wurde der verwendete Schallkopf (30-40 MHz) entsprechend ausgerichtet, sodass der linke Ventrikel des Herzens zusammen mit der Mitralklappe auf dem sonografischen Bild gut erkennbar war (parasternale Längsachse, PLAX). Mithilfe des B-Modes konnten 300 Bilder hintereinander angefertigt werden, sodass sowohl die Diastole als auch die Systole dargestellt werden konnte. Um die Herzfrequenz und die Ejektionsfraktion zu analysieren, diente hingegen der M-Mode, in dem die Herzaktion 5 Sekunden lang aufgezeichnet wurde. In der Versuchsreihe mittels Echokardiografie wurde die Wirkung von Histamin in vivo auf das Herz der Maus untersucht. Dazu wurde den Mäusen nach Aufzeichnung der basalen Herzfunktion 100 µl Histamin (10 mM) intraperitoneal injiziert. Anschließend wurden die Veränderungen der Herzfrequenz, der Ejektionsfraktion und das Auftreten von Arrhythmien im zeitlichen Verlauf beobachtet und ausgewertet.

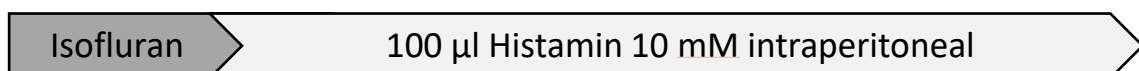


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Echokardiografie-Versuche

3.10 Kontraktionsversuche

3.10.1 Vorbereitung des Organbades

An jedem Versuchstag wurde die verwendete Tyrode-Lösung, die für ein physiologisches Milieu im Organbad notwendig war, frisch angesetzt. Die Tyrode-Lösung ist eine Lösung von Elektrolyten und Glukose in Wasser und wurde aus drei zuvor vorbereiteten Stammlösungen hergestellt (Zusammensetzung siehe Anhang). Nach einer 30-minütigen Begasung mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) zur Stabilisierung des pH-Wertes erfolgte die Zugabe von 0,8 ml Kalziumchlorid-Lösung (33,2 g CaCl₂/100 ml H₂O), 1 g Glucose, 49,3 mg Ascorbinsäure und 19 mg Na₂-EDTA. Die Tyrode-Lösung wurde während der Vorbereitungen und des gesamten Versuches auf eine Temperatur von 37,0 °C angewärmt und zur pH-Wert-Stabilisierung kontinuierlich mit Carbogen begast.

3.10.2 Vorbereitung und Kalibrierung der Messanlage

Die Messanlage für isometrische Kontraktionen bestand aus doppelwandigen Organbädern mit einem Volumen von je 10 ml (Abb. 5). Das Innengefäß wurde mit Tyrode-Lösung befüllt und bot Raum für je ein Muskelpräparat. Die Carbogenzufuhr in das Innengefäß erfolgte über einen Anschluss am unteren Teil des Organbades. Im äußeren Teil des doppelwandigen Gefäßes befand sich ein Zu- und Abfluss für einen Wasserkreislauf, mit dem die Tyrode-Lösung im Innengefäß indirekt beheizt werden konnte. Die Präparate wurden vorsichtig über zwei starre Metalldrähte befestigt und in das vorbereitete Organbad eingehängt. Dabei war der obere Metalldraht mit einem Kraftmesser verbunden, der die Kontraktionskraft des Präparates mit Hilfe eines Brückenverstärkers sowohl an einen Schreiber als auch an einen Computer weiterleitete. Die Vorschubgeschwindigkeit des Schreibers betrug zu Beginn der Versuche 5 mm pro Minute. Im Versuchsverlauf wurde der Vorschub für eine bessere Beurteilung der Einzelkontraktionen kurzzeitig auf 100 mm pro Sekunde erhöht und anschließend wieder auf 5 mm pro Minute zurückgestellt. Die linken Vorhofpräparate mussten mittels elektrischer Reizung zur Kontraktion angeregt werden. Hierfür befanden sich im Organbad zwei Reizelektroden, die neben den linken Vorhofpräparaten angebracht waren. Die elektrische Stimulation der linken Vorhofpräparate erfolgte mit einer Frequenz von einem Hz und Rechteckimpulsen mit einer Dauer von 5 ms. Dabei lag die angelegte Spannung ca. 10-20 % über der Reizschwelle. An den linken Vorhofpräparaten konnte die Kontraktionskraft gemessen werden. Bei gelungener Präparation enthielten die rechten Vorhofpräparate den intakten Sinusknoten und somit ein vorhandenes Reizleitungssystem. Demzufolge kontrahierten die rechten Vorhofpräparate spontan und mussten nicht elektrisch gereizt werden. Die Messung der spontanen Schlagfrequenz erfolgte an diesen Vorhofpräparaten.

Nach den Vorbereitungen am Organbad der Messanlage erfolgte die Kalibrierung des Schreibers. Dafür wurde zunächst ein Nullpunkt festgelegt. Mit Hilfe eines 500 mg schweren Gewichtes konnte eine Kraft von 5 mN erzeugt und somit der Ausschlag des Schreibers für verschiedene Empfindlichkeitsstufen dokumentiert werden. Somit ermöglichte die Kalibrierung die Übertragung und Korrelation der Zugkraft der Muskelpräparate auf eine definierte Kraft.

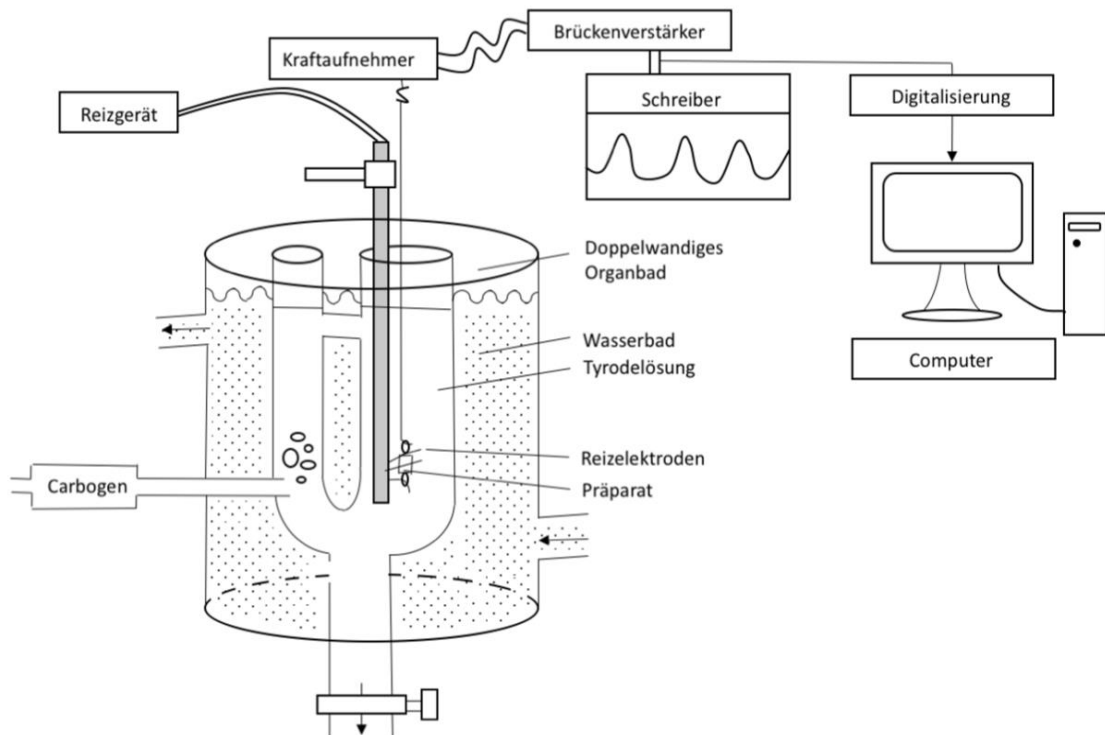


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für isometrische Kontraktionsmessungen

Dargestellt ist das doppelwandige Organbad mit einem aufgehängten Präparat, welches sich zwischen den beiden Reizelektroden befindet. Zudem sind das Reizgerät, der Kraftaufnehmer, der Brückenverstärker und der Schreiber, der die Muskelkontraktionen als Mechanogramm aufzeichnet, abgebildet. Die Tyrode-Lösung wird mithilfe des in der Doppelwand des Organbades befindlichen Wassermantels auf 37 °C temperiert und zudem mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast.

3.10.3 Präparation der Herzen

Die Mäuse hatten bis kurz vor der Präparation Zugang zu Wasser und Futter und mussten für die Versuche nicht nüchtern bleiben. Für die Berechnung der Dosis des Narkotikums wurde vor dem Versuch ihr aktuelles Gewicht erfasst und dokumentiert. Um eine Thrombusbildung im Herzen während der Präparation zu verhindern, wurde den Mäusen zeitgleich mit der Narkotisierung je 500 I.E. Heparin intraperitoneal injiziert.

Vor der Präparation erfolgte die Narkotisierung der Tiere, um schmerzbedingte Katecholamin-Ausschüttungen zu vermeiden. Hierfür wurde den Tieren 1,5 mg/kg/Körpergewicht Pentobarbital intraperitoneal injiziert und eine tiefe Bewusstlosigkeit erreicht. Um die kontinuierliche Oxygenierung des Herzmuskels zu gewährleisten, durfte die Anästhesie durch Pentobarbital nicht zu einem unmittelbaren Atemstillstand führen.

Nach Eintritt der Bewusstlosigkeit erfolgte die Fixierung an den Extremitäten der Mäuse in einer Präparationsschale. Mit einer Schere wurde im Bereich des Abdomens ein vertikaler Schnitt durch Fell und Haut bis zum Beginn des Sternums geführt. Mit zwei weiteren Schnitten entlang der Rippenbögen wurden Pleura und Peritoneum eröffnet. Anschließend konnten die abgetrennten Rippen mithilfe einer am Sternum fixierten Klemme nach kranial umgeschlagen werden, um eine freie Sicht auf das Herz für die weitere Präparation zu gewährleisten. Nach Freilegung der Vena cava und des Aortenbogens konnten diese durchtrennt und das Herz aus dem eröffneten Thorax entnommen werden. Für die Zeitüberbrückung zwischen Entnahme und der weiteren Präparation wurde der entnommene Herzmuskel unmittelbar in ein bereit gestelltes Gefäß mit raumtemperierter Tyrode-Lösung überführt und Blutreste durch vorsichtige Kompression aus dem noch schlagenden Herzen entfernt.

Nach der Präparation wurden die isolierten Mäuseherzen in eine mit Tyrode-Lösung gefüllten und mit Carbogen begasten Präparationsschale überführt. Die Fixierung erfolgte über eine Nadel an der Herzspitze. Der linke Vorhof wurde exzidiert und am oberen und unteren Pol des Präparates je ein Metallhaken in das Muskelgewebe eingeführt. Über die Metallhaken konnten die Präparate in die Versuchsapparatur eingehängt und anschließend in das mit Tyrode-Lösung gefüllte Organbad eingetaucht werden. Innerhalb der ersten 30 Minuten nach Einhängen der Präparate wurde die Tyrode-Lösung im Organbad drei Mal gewechselt. In dieser Äquilibratorphase pendelte sich die Kraft der linken Vorhofpräparate auf ein Gleichgewicht ein; die Präparate mussten dabei häufig noch nachgespannt werden. Das weitere Vorgehen des in der Versuchsapparatur eingehängten linken Vorhofes erfolgte wie in 3.10.4 beschrieben.

Nachdem der linke Vorhof präpariert und eingehängt wurde, erfolgte die Präparation des rechten Vorhofes. Hierfür mussten die Reste der Lungen und angrenzenden großen Blutgefäße entfernt werden. Anschließend wurde der rechte Vorhof vom restlichen Herzen abgetrennt. Dabei durfte der Sinusknoten, der sich im Bereich der Mündung der Vena cava superior befindet, nicht beschädigt werden. In den separierten rechten Vorhof wurden, ohne Beschädigung des Sinusknotens, zwei Metallhaken in das Muskelgewebe eingeführt. Nach dem Einhängen des rechten Vorhofes in die Versuchsapparatur wurden die Präparate bis zur maximalen Kraftentwicklung vorgespannt, sodass kein weiterer Kraftanstieg möglich war.

Bei korrekter Präparation enthielten die rechten Vorhofpräparate den intakten Sinusknoten. An den spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten konnte somit die Schlagfrequenz gemessen werden.

Teilweise traten bei den eingehängten Vorhofpräparaten schon zu Beginn Arrhythmien auf, die auch nach mehrfachem Wechsel der Tyrode-Lösung in der ersten Phase weiterhin persistierten. Die Arrhythmien können durch eine Schädigung des Muskelgewebes bzw. Sinusknotens während der Präparation bedingt sein. Bei Auftreten der Arrhythmien zu Beginn des Versuches trotz korrekter Präparation ist auch eine basal vorliegende Arrhythmie des Vorhofes denkbar.

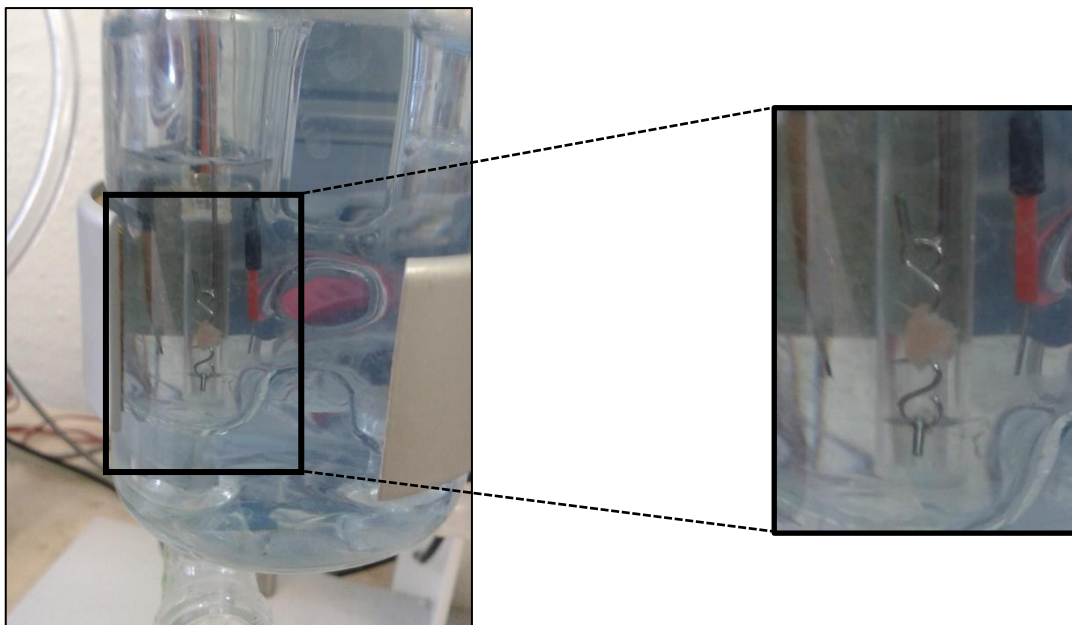


Abbildung 6: Vorhofpräparat in der Versuchsapparatur

3.10.4 Versuchsdurchführung

Die Präparation und der Versuchsbeginn waren für alle Präparate identisch. Nach dem Einhängen in das Organbad und dem Nachspannen der Präparate erfolgte innerhalb der ersten 30 Minuten im Abstand von zehn Minuten ein dreimaliger Badwechsel mit frischer Tyrode-Lösung. In dieser Zeit pendelten sich bei den linken und rechten Vorhofpräparaten eine stabile Schlagkraft bzw. Schlagfrequenz ein, die für die nachfolgenden Versuche als Ausgangslage diente. Anschließend konnten die verschiedenen Versuchsabläufe beginnen, die in Abbildung 7 dargestellt werden.

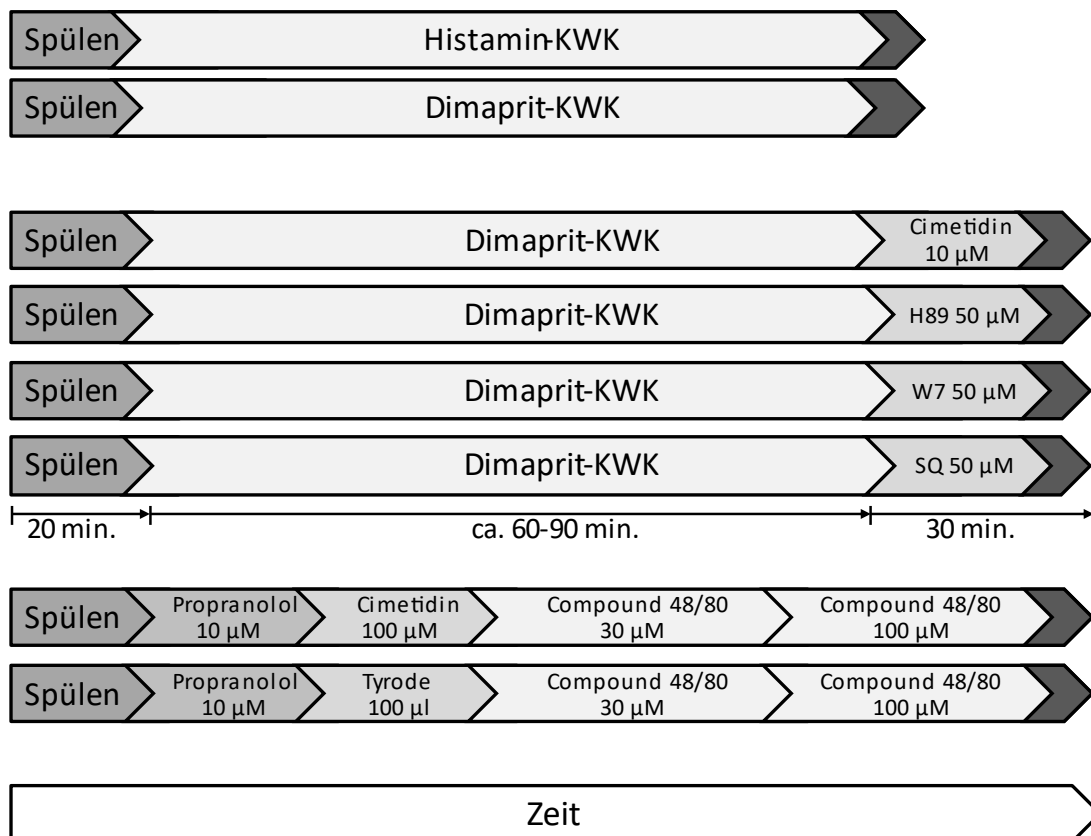


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Kontraktionsversuche

4 Ergebnisse

4.1 Kardiale Wirkungen von Histamin

4.1.1 Histamin-Effekte in vitro

Die isolierten Herzvorhofpräparate der Versuchstiere wurden in die Messanlage eingehängt und die Kontraktionskraft der linken Vorhofpräparate bzw. die Schlagfrequenz der rechten Vorhofpräparate erfasst. Nach dem Äquilibrieren wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mit Histamin in Konzentrationen von 1 nM bis zu 10 μ M als Maximalkonzentration durchgeführt.

Die mittlere Ausgangskraft der linken Vorhofpräparate von TG betrug $2,21 \pm 0,33$ (n=6) mN und war nicht verändert im Vergleich zu WT, die eine Ausgangskraft von $2,04 \pm 0,22$ (n=6) mN aufwies. Bei den rechten Vorhofpräparaten war die Grundfrequenz von TG mit 361 ± 61 (n=6) Schlägen pro Minute (bpm) um 41 bpm höher als die Frequenz von WT mit 320 ± 11 (n=6) bpm, was aber statistisch keinen signifikanten Unterschied darstellte.

Im Verlauf der Histamin-KWK konnte bei den linken Vorhofpräparaten von WT außer einer geringen linearen Minderung der Kontraktionskraft von $2,04 \pm 0,22$ (n=6) mN auf $1,38 \pm 0,13$ (n=6) mN keine weitere Reaktion beobachtet werden. Dieser Kraftabfall kann als Abschwächen der Präparate im Zeitverlauf der KWK gedeutet werden. Im Vergleich zeigten die linken Vorhofpräparate von TG bereits einen signifikanten Kraftanstieg bei einer Histamin-Konzentration von 0,03 μ M, der sowohl gegenüber der Ausgangslage als auch gegenüber WT statistisch signifikant war (Abb. 9). Es folgte ein Kraftanstieg der linken transgenen Vorhofpräparate auf $6,44 \pm 0,48$ (n=6) mN bei einer Histamin-Konzentration von 1 μ M. Ab dieser Konzentration wurde kein relevanter Kraftanstieg mehr verzeichnet (Abb. 9).

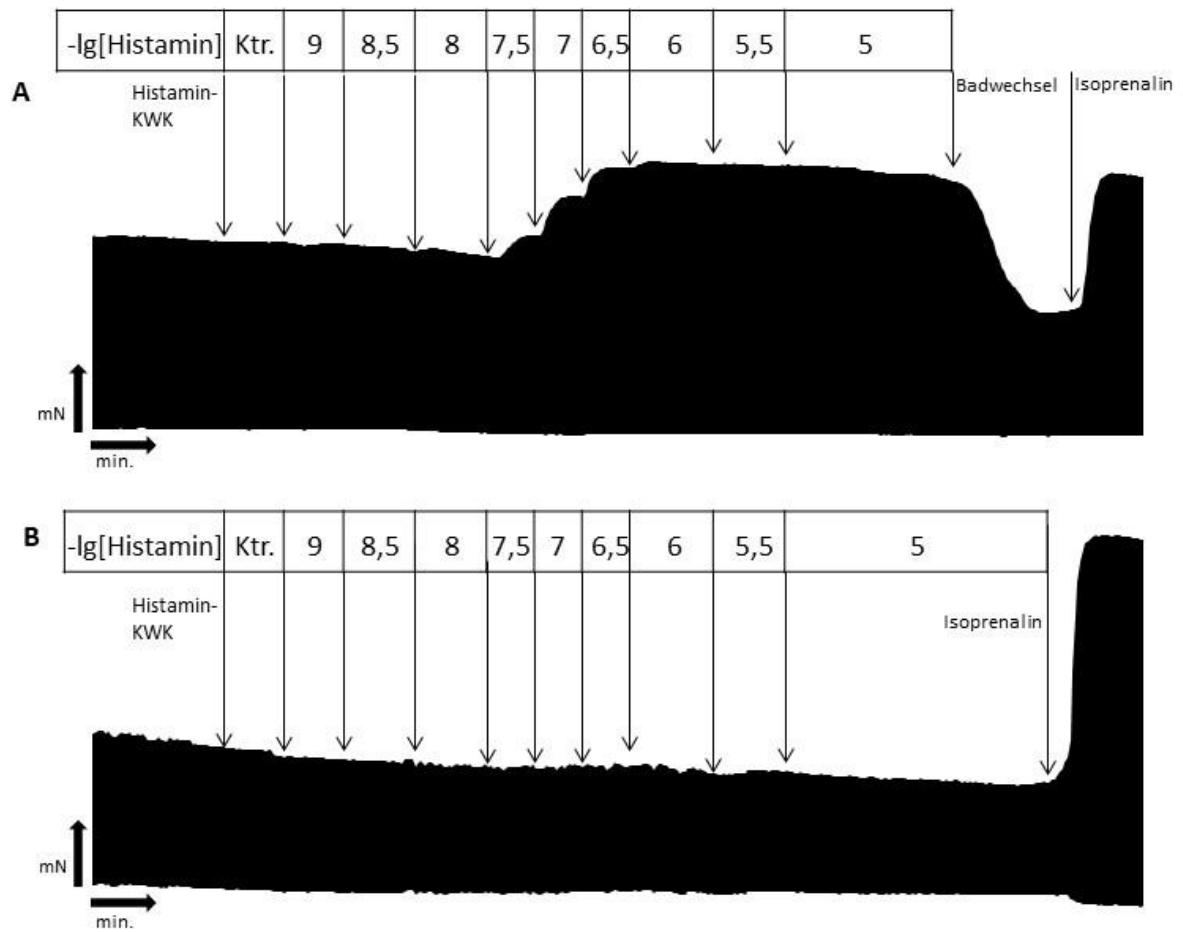


Abbildung 8: Mechanogramme mit Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Histamin an linken Vorhofpräparaten von WT und TG

Dargestellt werden die Mechanogramme einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) von Histamin an elektrisch gereizten linken Vorhofpräparaten (1 Hz) von TG [A] und WT [B]. Es wurden Histamin-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet und im Anschluss an die KWK Isoprenalin (10 μ M) zur Kontrolle hinzugegeben.

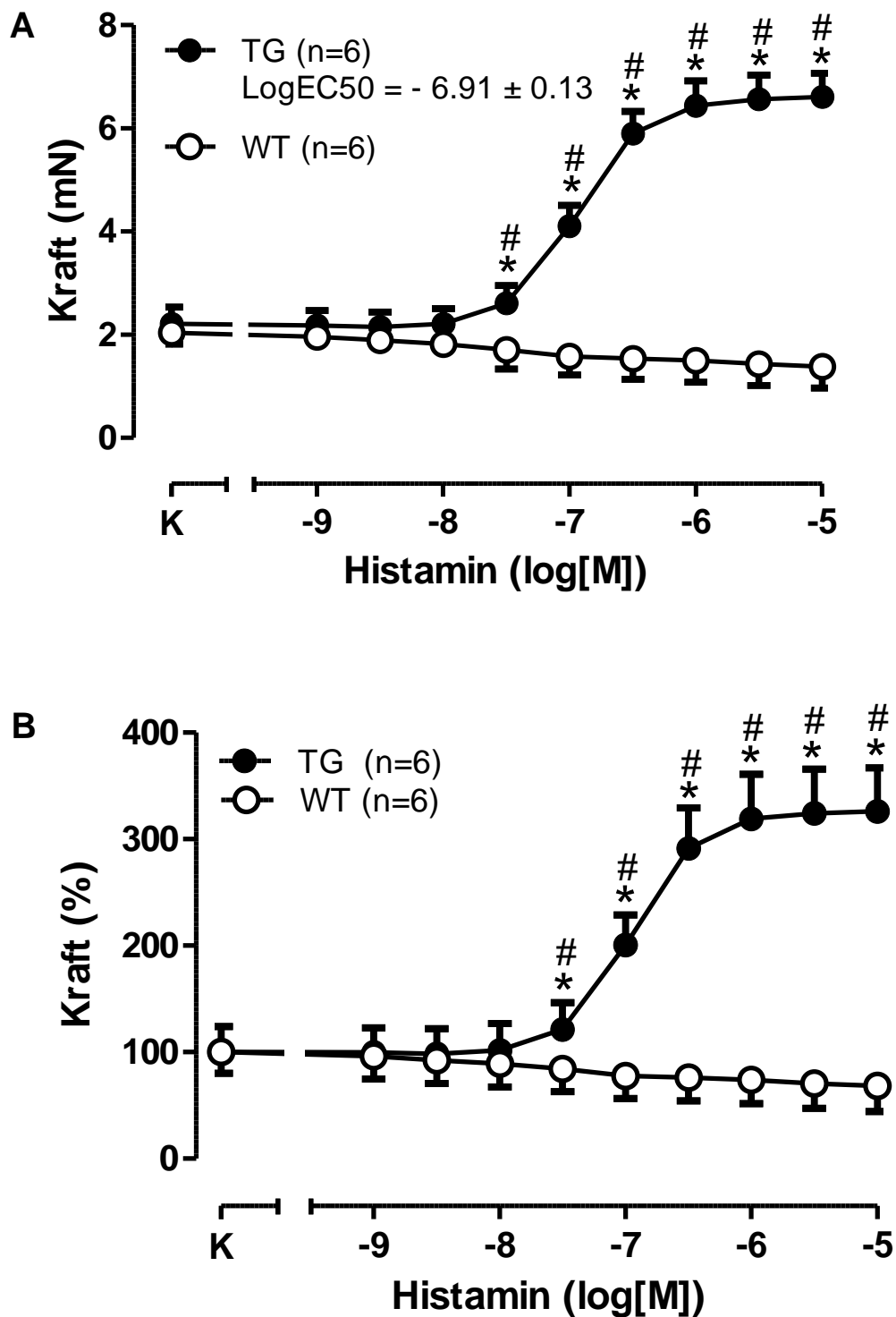


Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Histamin an linken Vorhofpräparaten

In den Abbildungen werden die Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) mit Histamin an elektrisch gereizten linken Vorhofpräparaten (1 Hz) von WT und TG dargestellt. Die Konzentrationskraft ist in mN [A] und in % der Kontrolle (K) [B] angegeben. Bei der KWK wurden Histamin-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet. *p < 0,05 vs. Kontrolle; #p < 0,05 vs. WT

Die rechten Vorhofpräparate von WT zeigten im Verlauf der KWK ab einer Histamin-Konzentration von 1 μM einen leichten Anstieg der Schlagfrequenz von 320 ± 11 ($n=6$) bpm auf 381 ± 13 ($n=6$) bpm bei 10 μM Histamin, der allerdings statistisch nicht signifikant war. Im Gegensatz dazu wiesen die rechten Vorhofpräparate von TG bereits ab einer Histamin-Konzentration von 0,1 μM eine deutliche Erhöhung der Schlagfrequenz auf. Die Schlagfrequenz stieg von 361 ± 61 ($n=6$) bpm als Ausgangswert auf 515 ± 31 ($n=6$) bpm ($p < 0,05$) bei 3 μM Histamin an (Abb. 10). Ein signifikanter Frequenzunterschied zwischen den rechten Vorhofpräparaten von WT und TG konnte ab einer Histamin-Konzentration von 0,3 μM beobachtet werden (Abb. 10).

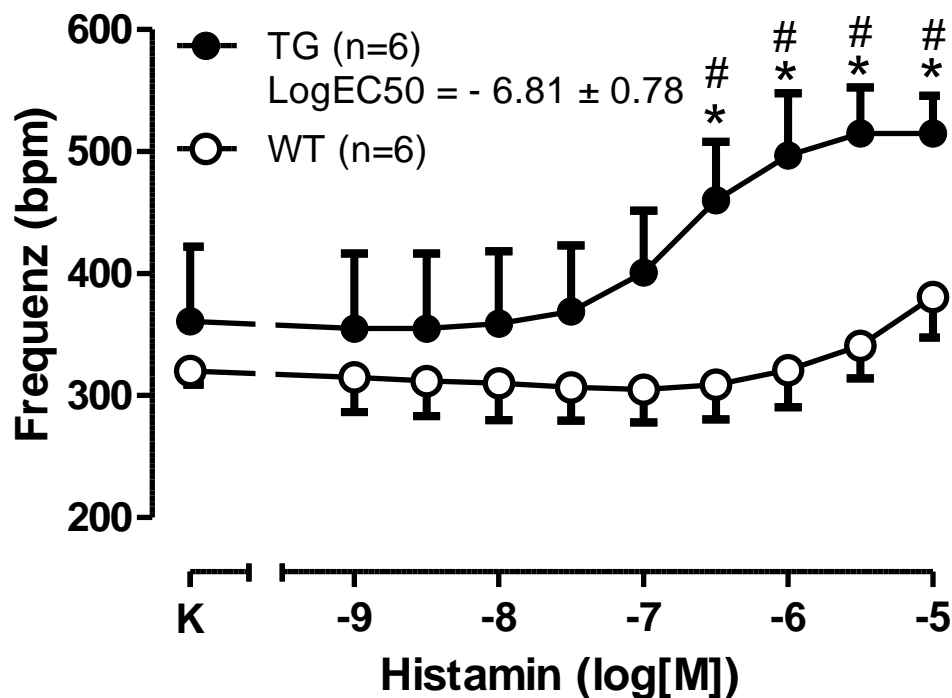


Abbildung 10: Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Histamin an rechten Vorhofpräparaten

In der Abbildung wird die Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mit Histamin an spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten von WT und TG dargestellt. Die Frequenz ist in Schlägen pro Minute (bpm) angegeben. Bei der KWK wurden Histamin-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μM verwendet. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert (K); # $p < 0,05$ vs. WT

4.1.2 Histamin-Effekte in vivo

Mithilfe der Echokardiografie an narkotisierten Mäusen (1,5 % Isofluran) konnte die Wirkung von Histamin auf das Herz in vivo unter Bezug auf die Ejektionsfraktion (EF), Herzfrequenz (HF) und fraktionierte Verkürzung des Herzens (FS von engl. Fractional Shortening) an WT und TG dargestellt werden. Die Messung erfolgte vor Gabe von Histamin als Ausgangswert und nach der Injektion von 100 μ l einer 10 mM Histamin-Lösung.

Bei TG war der Ausgangswert der EF um 11,12 % höher als bei WT ($p < 0,05$). Die Ejektionsfraktion von transgenen Mäusen stieg nach der Histamin-Injektion deutlich von basal 70,82 % auf 94,72 % an im Vergleich zu 75,12 % von basal 59,70 % bei den Wildtyp-Mäusen ($p < 0,05$). Somit hatte Histamin in vivo einen signifikanten Effekt auf die EF sowohl bei WT als auch bei TG.

Die Herzfrequenzmessungen wurden in Schlägen pro Minute (bpm) dargestellt. Als Ausgangswert vor der Histamin-Injektion wies WT eine HF von 521 ± 14 ($n=7$) bpm auf, TG eine HF von 561 ± 19 ($n=11$) bpm, was allerdings statistisch nicht signifikant war. Nach der Injektion von Histamin konnte sowohl bei WT als auch bei TG ein Anstieg der Herzfrequenz beobachtet werden. Die HF von WT stieg auf 674 ± 18 ($n=7$) bpm nach der Histamin-Injektion an ($p < 0,05$) und die von TG auf 762 ± 17 ($n=11$) bpm ($p < 0,05$). Der Effekt von Histamin auf die Herzfrequenz war bei TG mit einem Frequenzanstieg um 36 % stärker ausgeprägt als bei WT mit einem Frequenzanstieg um 29 % ($p < 0,05$, Abb. 11).

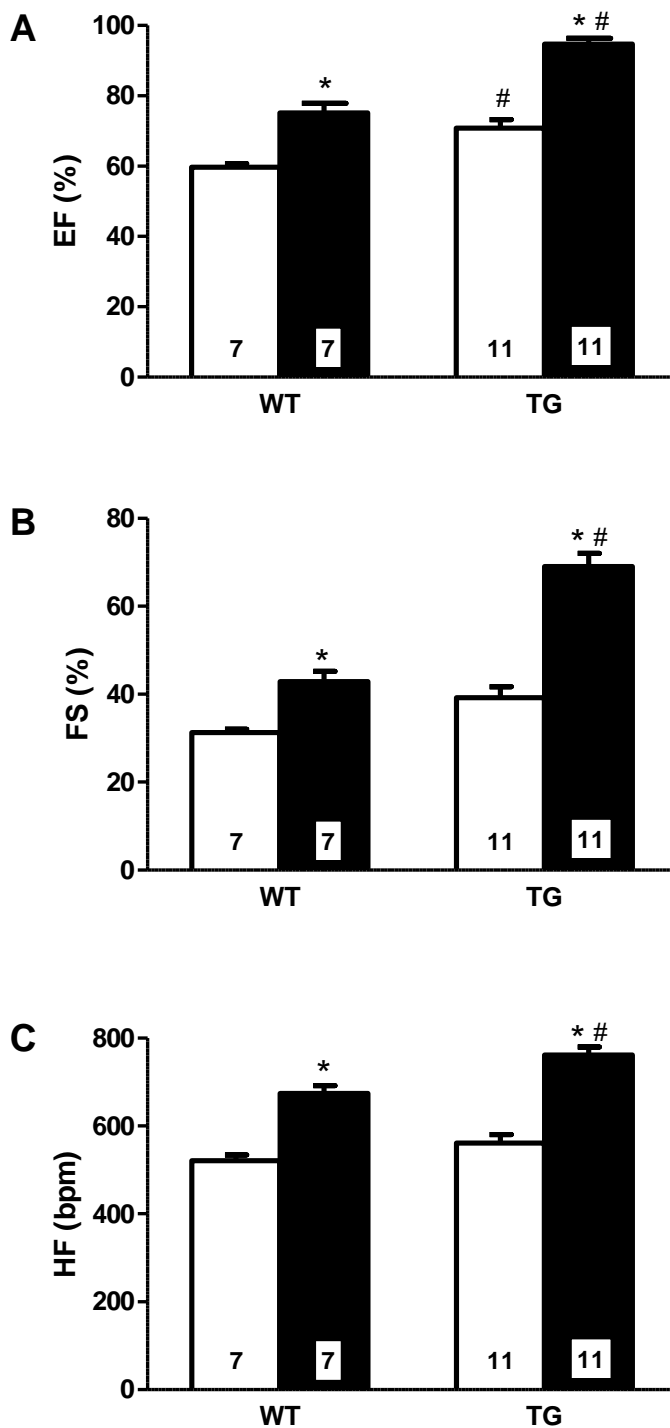


Abbildung 11: Histamineffekt in vivo an WT und TG (Echokardiografie)

Mithilfe der Echokardiografie an Isofluran-narkotisierten Mäusen wurde der Histamineffekt in vivo von WT und TG gemessen. Die Herzen der Mäuse wurden dafür zunächst unter basalen Bedingungen (Kontrolle) untersucht. Nach anschließender Injektion von 100 μ l einer 10 mM Histamin-Lösung konnte der Histamineffekt in vivo beobachtet werden. Die Säulendiagramme veranschaulichen die Wirkungen des Histamins anhand der Ejektionsfraktion (EF) [A], der fraktionierten Verkürzung des Herzens (FS von engl. Fractional Shortening) [B] und der Herzfrequenz (HF) [C]. * WT/TG vs. Kontrolle; $p < 0,05$; # TG vs. WT; $p < 0,05$

4.2 Wirkung von Dimaprit

In diesem Versuchsteil wurde an isolierten Mausvorhofpräparaten, analog zu den Histamin-Versuchen, der H₂-Rezeptor-Agonist Dimaprit untersucht. Nach der Äquilibrierung der Präparate wurde eine kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mit Dimaprit durchgeführt (Abb. 13). Es wurden Dimaprit-Konzentrationen von 1 nM bis 10 µM verwendet.

Sowohl die Ausgangskraft der linken Vorhofpräparate von WT als auch die Grundfrequenz von WT zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Vorhofpräparaten von TG. Durchschnittlich entwickelten die linken Vorhofpräparate von WT eine Kraft von $3,33 \pm 0,19$ (n=18) mN. Diese ist im Vergleich zu den Vorhofpräparaten von TG mit durchschnittlich $2,98 \pm 0,19$ (n=29) mN nicht verschieden. Bei den rechten Vorhofpräparaten war die Grundfrequenz von TG mit 426 ± 22 (n=29) Schlägen pro Minute (bpm) um 79 bpm höher als bei den Vorhofpräparaten von WT mit 347 ± 7 (n=18) bpm, was statistisch keinen signifikanten Unterschied darstellte (Abb. 14).

Im zeitlichen Verlauf der Dimaprit-KWK konnte bei den linken Vorhofpräparaten von WT kein inotroper Effekt von Dimaprit gemessen werden, sondern nur eine zeitabhängige Erschlaffung um 0,85 mN auf $2,48 \pm 0,16$ (n=18) mN. Wie bereits bei der Histamin-KWK, kann dieser Effekt als Abschwächen der Präparate im zeitlichen Verlauf der KWK gewertet werden (Abb. 13).

Die linken TG-Vorhofpräparate zeigten einen deutlichen positiv inotropen Effekt als Reaktion auf die ansteigenden Dimaprit-Konzentrationen im Organbad. Dabei konnte ein signifikanter Kraftanstieg im Vergleich zum Kontrollwert und gegenüber den WT-Präparaten ab einer Dimaprit-Konzentration von 0,1 µM gemessen werden. Die TG-Präparate erreichten bei dieser Konzentration eine Kraft von $3,64 \pm 0,21$ (n=29) mN. Die Maximalkraft von $8,71 \pm 0,34$ (n=29) mN war bei einer Dimaprit-Konzentration von 3 µM erreicht, die bis zur Maximalkonzentration im Organbad konstant blieb (Abb. 13).

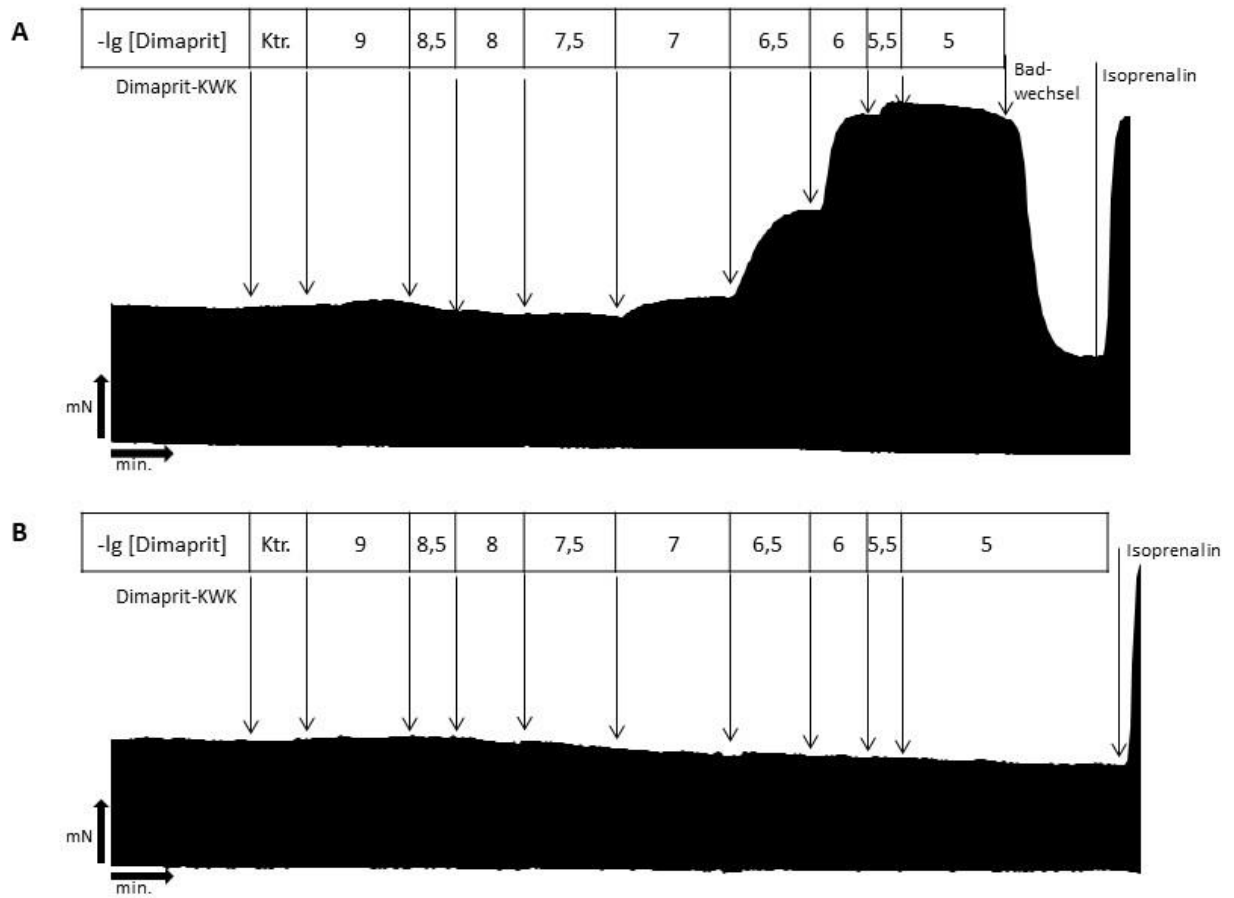


Abbildung 12: Mechanogramme mit Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Dimaprit an linken Vorhofpräparaten von WT und TG

Dargestellt sind repräsentative Originalaufzeichnungen von Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) mit Dimaprit an elektrisch gereizten linken Vorhofpräparaten (1 Hz) von TG [A] und WT [B]. Es wurden Dimaprit-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet und im Anschluss an die KWK Isoprenalin (10 μ M) zur Kontrolle hinzugegeben.

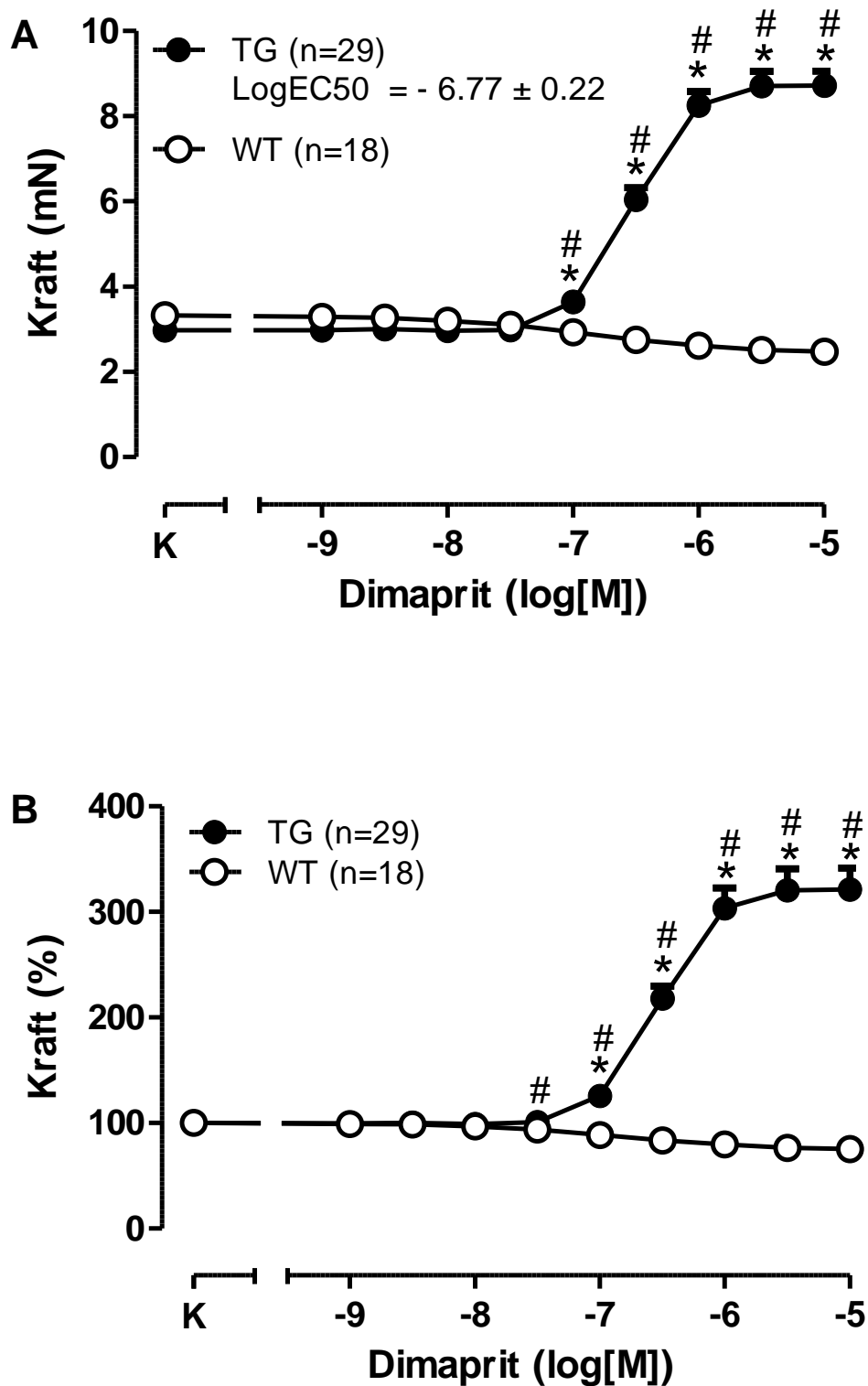


Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Dimaprit an linken Vorhofpräparaten

In den Abbildungen werden die Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) mit Dimaprit an elektrisch gereizten linken Vorhofpräparaten (1 Hz) von WT und TG dargestellt. Die Konzentrationskraft wird in mN [A], und % [B] angegeben. Bei der KWK wurden Dimaprit-Konzentrationen von 1 nM bis 10 µM verwendet. * p<0,05 vs. Kontrollwert (K); # p<0,05 vs. WT

Die Schlagfrequenz der rechten Vorhofpräparate von WT blieb bei steigender Dimaprit-Konzentration im Organbad konstant. Erst ab einer sehr hohen Dimaprit-Konzentration von 3 μM wurde ein Anstieg der Schlagfrequenz der rechten WT-Vorhofpräparate beobachtet. Bei der Maximalkonzentration von Dimaprit im Organbad (10 μM) konnte bei WT eine Schlagfrequenz von 390 ± 15 (n=14) bpm gemessen werden. Dieser Anstieg um 43 bpm im Vergleich zum Kontrollwert war statistisch nicht signifikant (Abb. 14).

Bei den rechten TG-Vorhofpräparaten konnte im Vergleich zu den WT-Präparaten ein deutlicher positiv chronotroper Effekt bei steigenden Dimaprit-Konzentrationen im Organbad gemessen werden. Bis zu einer Dimaprit-Konzentration von 0,03 μM blieb die Schlagfrequenz der TG-Präparate konstant. Bei einer Dimaprit-Konzentration von 0,1 μM erhöhte sich die Frequenz auf 469 ± 14 (n=21) bpm, was im Vergleich zum Kontrollwert und den WT-Präparaten statistisch signifikant war. Bei der Maximalkonzentration von 10 μM Dimaprit im Organbad wurde im Durchschnitt eine Schlagfrequenz von 579 ± 13 (n=21) bpm ermittelt. Diese war 153 bpm höher als die Ausgangsfrequenz (Kontrollwert) zu Beginn der Dimaprit-KWK und 139 bpm höher als die Schlagfrequenz der rechten WT-Präparate bei der Maximalkonzentration von Dimaprit im Organbad (Abb. 14).

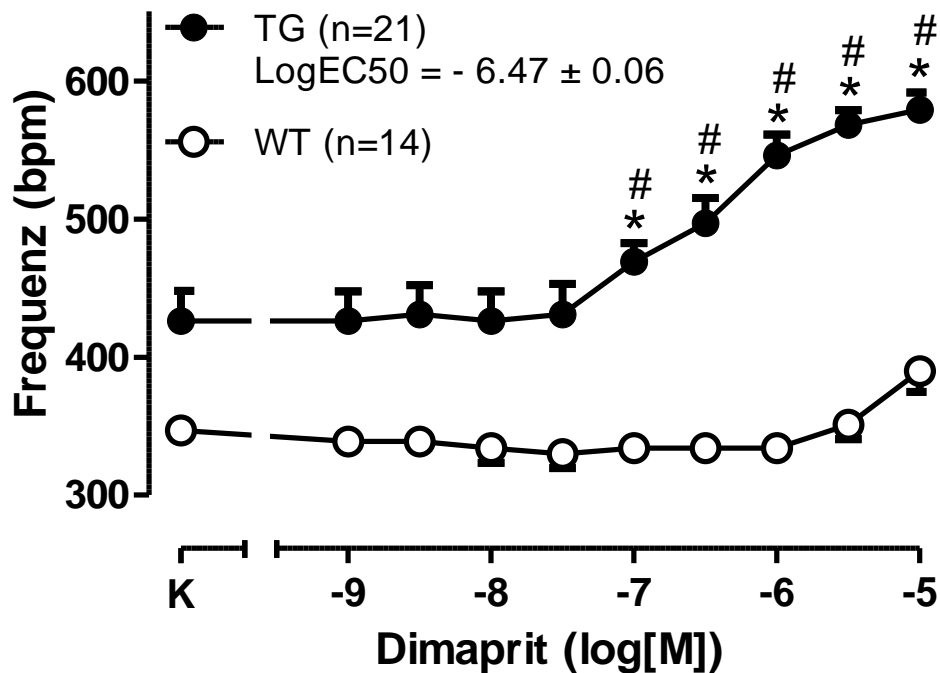


Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Dimaprit an rechten Vorhofpräparaten

In der Abbildung sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) mit Dimaprit an spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten von WT und TG dargestellt. Die Frequenz ist in Schlägen pro Minute (bpm) [A] angegeben. Für die KWK wurden Dimaprit-Konzentrationen von 1 nM bis 10 μ M verwendet. * $p < 0,05$ vs. Kontrollwert (K); # $p < 0,05$ vs. WT

4.3 Arrhythmien

Im Rahmen der Vorhof-Versuche mit Histamin und Dimaprit als Konzentration-Wirkungs-Kurven wurde das Auftreten von Arrhythmien beobachtet und ausgewertet. Die erfassten Arrhythmien wurden in drei Untergruppen eingeteilt. Die Kriterien der Untergruppen entsprachen den Umständen, unter welchen die Arrhythmien auftraten. Dies waren basal vorhandene Arrhythmien und Histamin- bzw. Dimaprit-induzierte Arrhythmien, die im Verlauf einer KWK auftraten.

Der Vergleich zwischen den rechten und linken Vorhofpräparaten zeigte, dass das Auftreten von Arrhythmien bei den rechten Vorhofpräparaten sowohl von transgenen als auch von Wildtyp-Mäusen signifikant höher war als bei den linken Vorhofpräparaten. Dieser Unterschied zwischen den linken und rechten Vorhofpräparaten wurde besonders bei den TG-Präparaten deutlich. Bei den linken Vorhofpräparaten traten nur bei sieben von 59 TG- und fünf von 53 WT-Präparaten initial Arrhythmien auf (keine Abbildung). Hingegen lag die Anzahl von Präparaten mit basalen

Arrhythmien bei rechten Vorhofpräparaten von transgenen Mäusen bei 22 von 40 ($p < 0,05$ im Chi-Quadratstest).

Demgegenüber steht der Vergleich zwischen Präparaten von transgenen und Wildtyp-Mäusen. Das Auftreten von Arrhythmien war sowohl unter basalen Bedingungen als auch Histamin- bzw. Dimaprit-induziert bei den rechten TG-Vorhofpräparaten höher als bei den WT-Präparaten (Abb. 15A). Bei den rechten Vorhofpräparaten von TG ließen sich unter basalen Bedingungen bei 22 von 40 Präparaten (55 %) Arrhythmien nachweisen. Die rechten Vorhofpräparate von WT zeigten hingegen unter basalen Bedingungen nur bei drei von 15 Präparaten (20 %) Arrhythmien ($p < 0,05$ vs. TG) (Abb. 15A).

Präparate, die unter basalen Bedingungen vor der Histamin- bzw. Dimaprit-KWK keine oder nur kurze Phasen von Arrhythmien aufwiesen, wurden während des Verlaufes der KWK beobachtet und neu aufgetretene Arrhythmien unter steigenden Histamin- bzw. Dimaprit-Konzentrationen registriert. Eine steigende Histamin-Konzentration im Organbad zeigte in Bezug auf Histamin-induzierte Arrhythmien keinen Effekt auf die rechten Vorhofpräparate von Wildtyp-Mäusen. Im Gegensatz dazu induzierte Histamin bei vier von fünf rechten TG-Vorhofpräparaten im Verlauf der KWK Arrhythmien, was im Vergleich zu den WT-Präparaten statistisch signifikant war (Abb. 15B). Auch bei der Dimaprit-KWK konnte ein Unterschied zwischen den Präparaten von WT und TG festgestellt werden. Bei den rechten TG-Vorhofpräparaten traten im Durchschnitt bei 19 von insgesamt 23 Präparaten (83 %) während der Dimaprit-KWK Arrhythmien auf. Die WT-Präparate zeigten hingegen nur bei einem rechten Vorhof von sechs Präparaten (17 %) eine Dimaprit-induzierte Arrhythmie ($p < 0,05$ vs. TG) (Abb.15C).

Das Auftreten von Histamin- bzw. Dimaprit-induzierten Arrhythmien wurde hinsichtlich der entsprechenden Agonisten-Konzentrationen im Organbad bei insgesamt 18 Präparaten näher betrachtet. Ab einer Histamin- bzw. Dimaprit-Konzentration von $0,03 \mu\text{M}$ traten bei den rechten Vorhofpräparaten der transgenen Mäuse zunehmend induzierte Arrhythmien auf. Der Großteil der Arrhythmien, induziert durch Histamin bzw. Dimaprit, wurden bei Konzentrationen von $0,3 \mu\text{M}$ bis $10 \mu\text{M}$ (Maximalkonzentration) registriert. In diesem Konzentrationsbereich manifestierten sich zwölf der 18 induzierten Arrhythmien (Abb. 16).

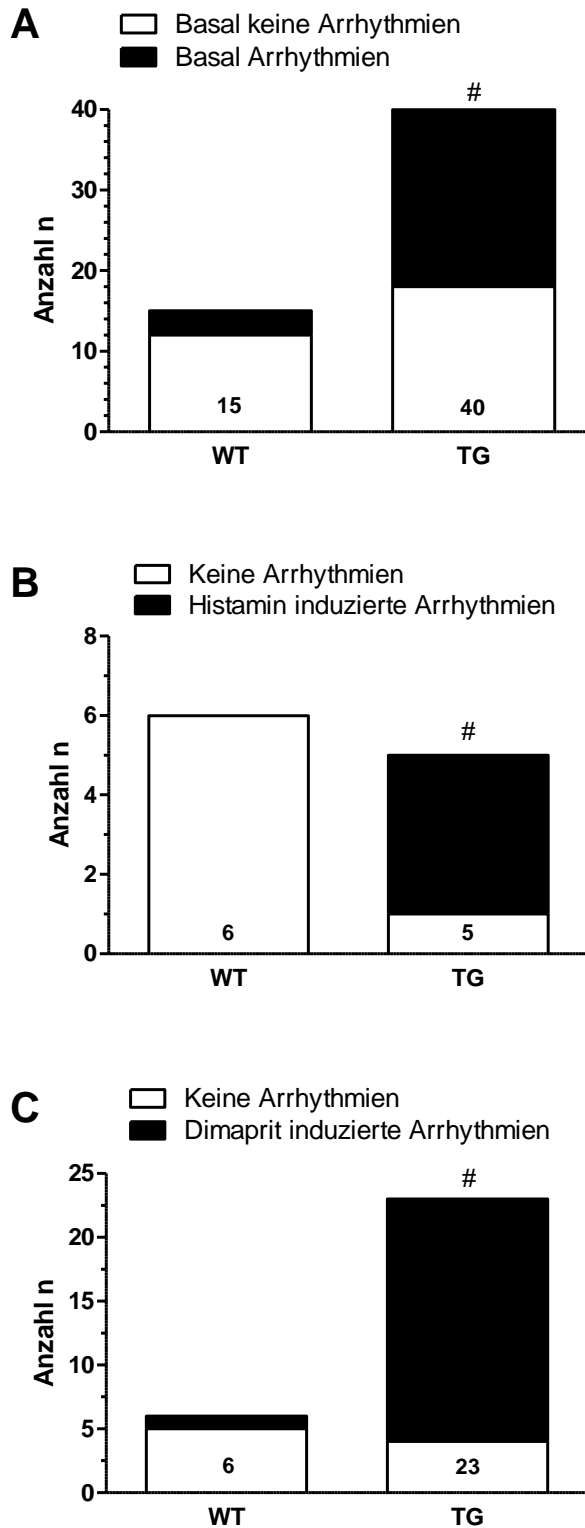


Abbildung 15: Basale und induzierte Arrhythmien

Häufigkeit von Arrhythmien bei spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten in WT und TG. Es werden das Vorkommen von basalen Arrhythmien [A], von Histamin induzierten [B] und Dimaprit induzierten Arrhythmien [C] dargestellt. #p < 0,05 TG vs. WT

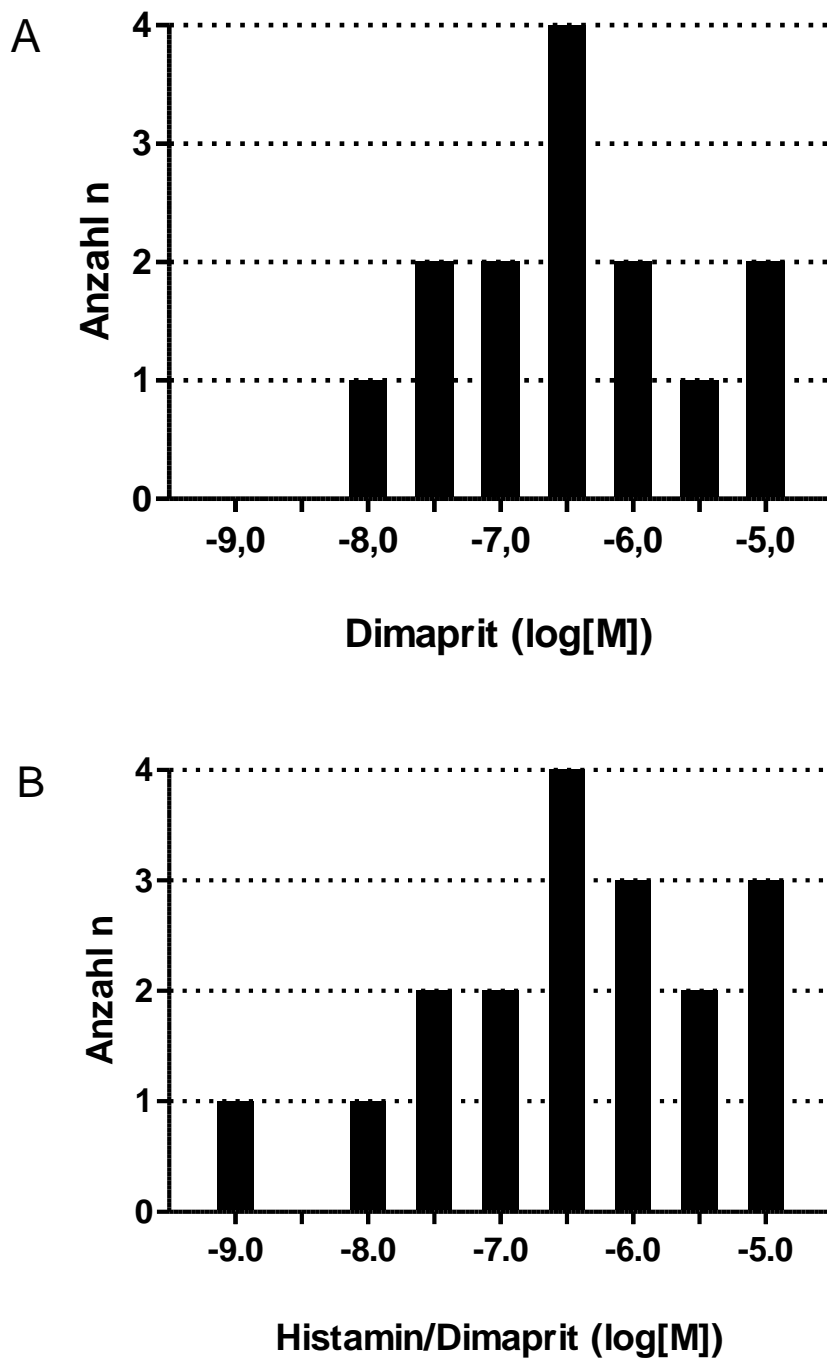
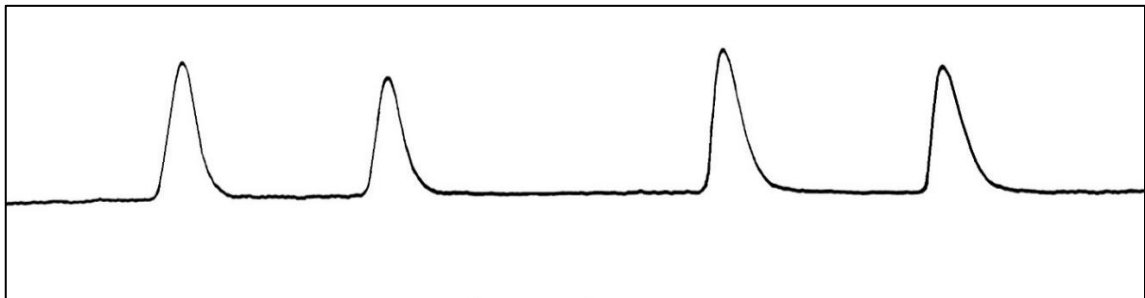


Abbildung 16: Induzierte Arrhythmien an transgenen rechten Vorhofpräparaten in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration im Organbad

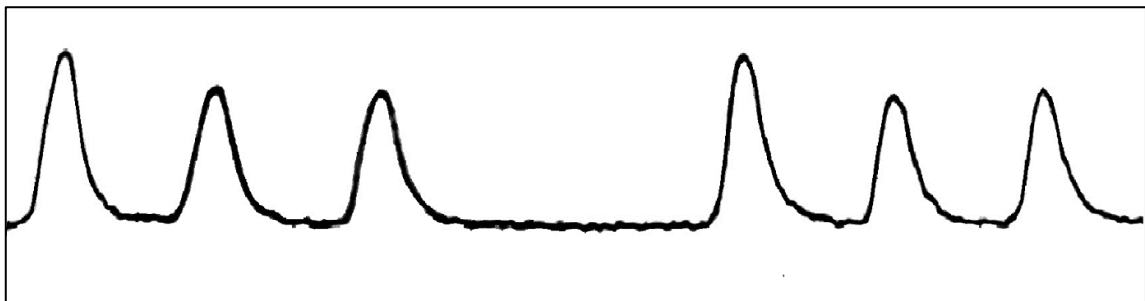
A: Dargestellt wird die Häufigkeit der induzierten Arrhythmien durch Dimaprit (n=14) in Abhängigkeit von der Dimaprit-Konzentration im Organbad an transgenen rechten Vorhofpräparaten.

B: Dargestellt wird die Häufigkeit der in Summe induzierten Arrhythmien durch Dimaprit und Histamin (n=18) in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration im Organbad an transgenen rechten Vorhofpräparaten.

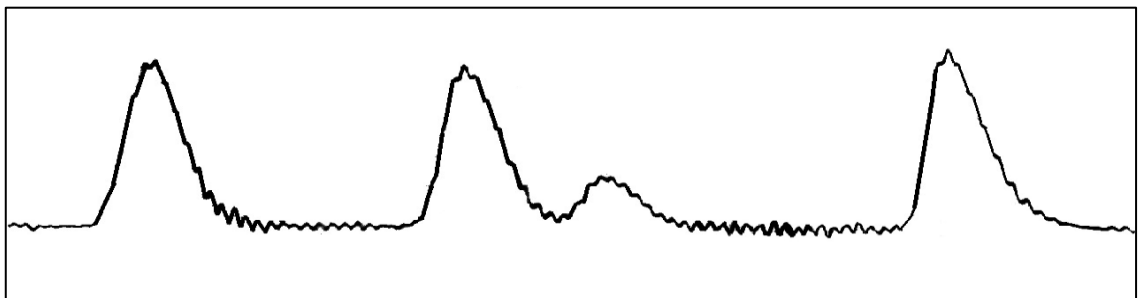
Sowohl die Arrhythmien unter basalen Bedingungen als auch die Histamin- bzw. Dimaprit-induzierten Arrhythmien wurden näher differenziert, wobei jedoch nicht alle Arrhythmien sicher zugeordnet werden konnten. Auffallend war, dass sich ein Großteil der basalen Arrhythmien wie auch der induzierten Arrhythmien als Bigeminus und Trigeminus manifestierten. Nach jeweils zwei bzw. drei aufeinanderfolgenden Schlägen folgte eine Pause mit einem fehlenden Schlag. Ein Bigeminus war dabei deutlich häufiger als ein Trigeminus. Darüber hinaus konnten sowohl „Frühe Nachdepolarisationen“ (EAD) als auch „Späte Nachdepolarisationen“ (DAD) unter den Arrhythmien differenziert werden, die hinsichtlich der Häufigkeit gleichermaßen auftraten (Abb. 17).



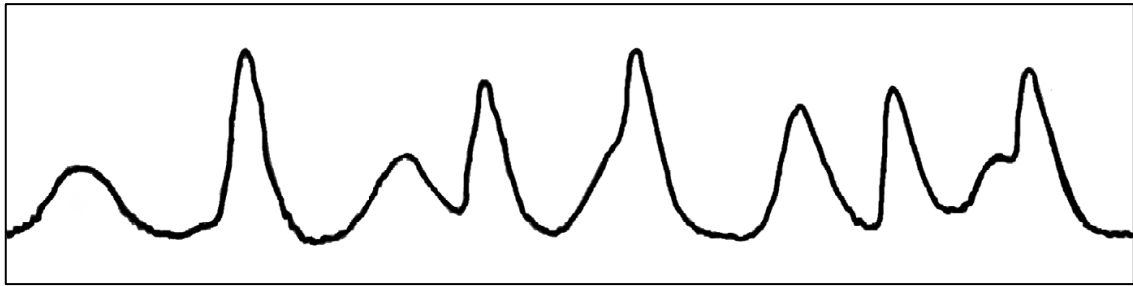
A: Bigeminus



B: Trigeminus



C: Frühe Nachdepolarisation



D: Späte Nachdepolarisation

Abbildung 17: Charakterisierung der Arrhythmien

4.4 Cimetidin

Für die Versuchsreihe mit dem kompetitiven H_2 -Rezeptor-Antagonist Cimetidin wurden die Präparate ausgewählt, die unter basalen Bedingungen oder durch steigende Konzentrationen von Dimaprit im Organbad Arrhythmien aufwiesen. Bei diesen Präparaten wurde im Anschluss an die Dimaprit-KWK jeweils an den rechten und linken Vorhofpräparaten von WT und TG den Organbädern Cimetidin in aufsteigender Konzentration (tlw. 10 μ M, 20 μ M und 100 μ M) hinzugegeben. Es reagierten alle sieben der rechten TG-Vorhofpräparate sensitiv auf die Zugabe von 10 μ M Cimetidin mit Sistieren der zuvor registrierten Arrhythmien. Dabei waren sowohl spontan auftretende Arrhythmien (n=3) unter basalen Bedingungen als auch Dimaprit-induzierte Arrhythmien (n=4) Cimetidin-sensitiv. Hinsichtlich der Kraft und der Frequenz fiel auf, dass es bei den rechten und linken TG-Vorhofpräparaten nach Zugabe von 100 μ M Cimetidin zu einem deutlichen negativ inotropen bzw. chronotropen Effekt kam. Mit Hilfe von Cimetidin konnte der Dimaprit induzierte positiv inotrope und chronotrope Effekt rückgängig gemacht werden, sodass bei den TG-Vorhofpräparaten nach Cimetidin-Gabe weitestgehend die Ausgangswerte an Kraft und Frequenz, die vor der Dimaprit-KWK gemessen wurden, erreicht werden konnten (Abb. 18).

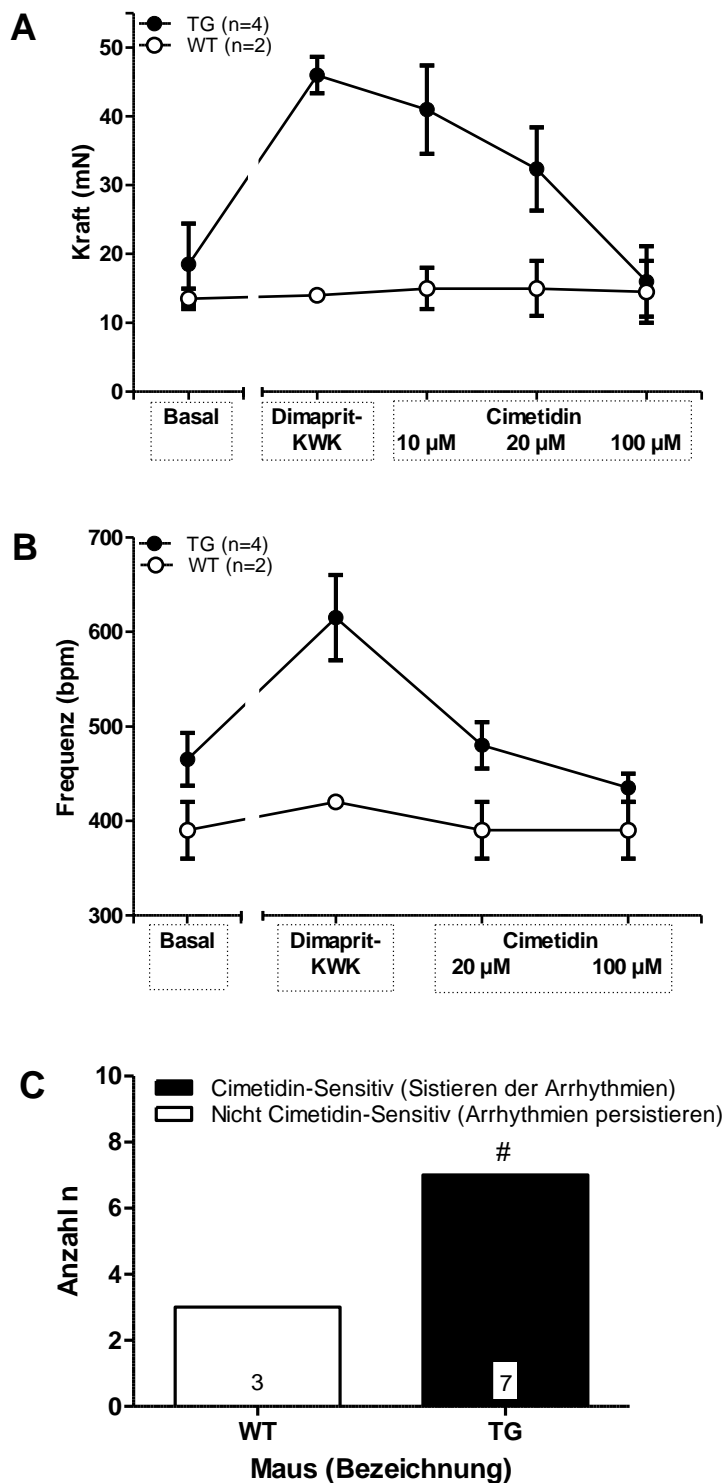
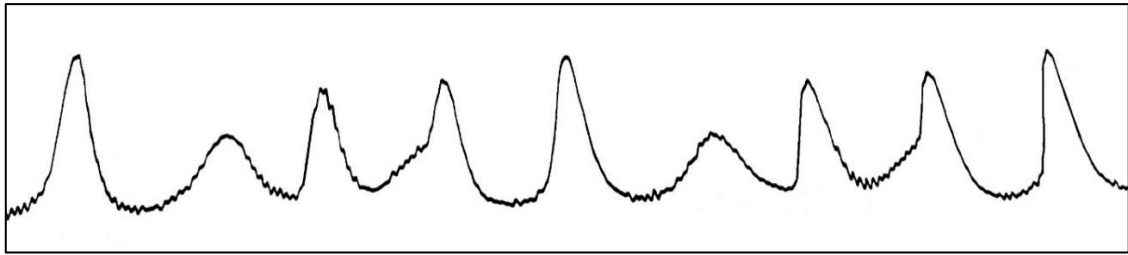
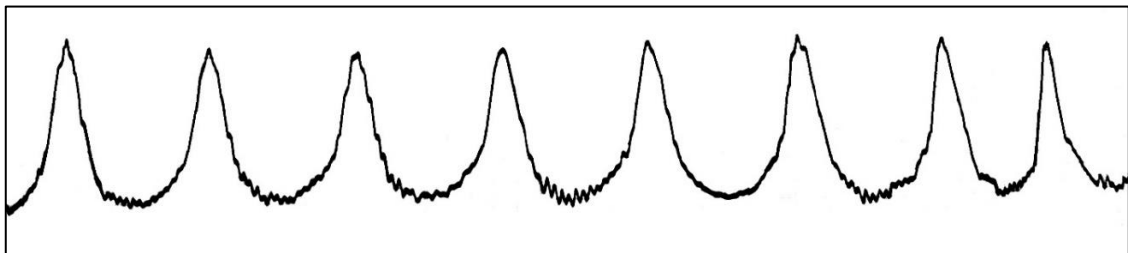


Abbildung 18: Effekt von Cimetidin an rechten und linken Vorhofpräparaten

Effekt von Cimetidin auf die Kraft in mN an den linken Vorhofpräparaten [A] und auf die Frequenz in bpm an den rechten Vorhofpräparaten [B]. Dem Organbad wurden nach der erfolgten Dimaprit-KWK steigende Cimetidin-Konzentrationen von 10 µM bis 100 µM hinzugefügt. Abbildung [C] zeigt, wie viele der Dimaprit-induzierten Arrhythmien bei WT und TG sensitiv auf Cimetidin reagierten und es zu einem Sistieren der Arrhythmien kam. # $p < 0,05$ vs. WT



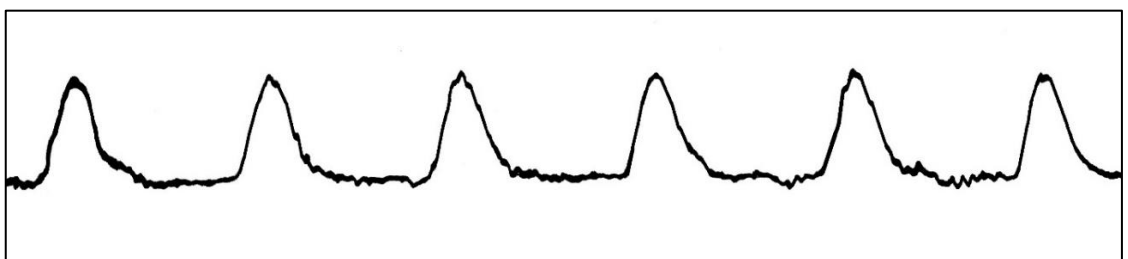
A1: Arrhythmien



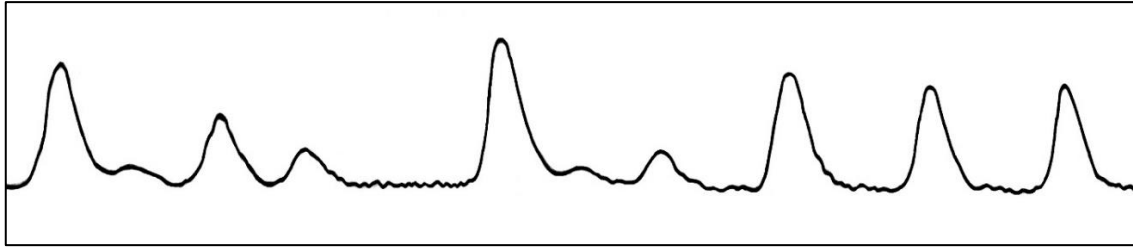
A2: Nach der Zugabe von Cimetidin



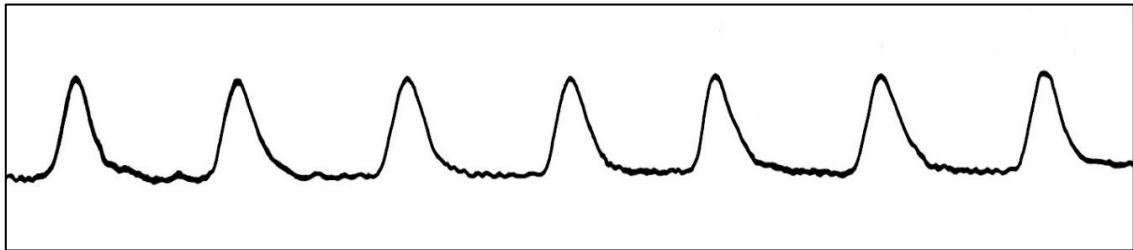
B1: Arrhythmien



B2: Nach der Zugabe von Cimetidin



C1: Arrhythmien



C2: Nach der Zugabe von Cimetidin

Abbildung 19: Cimetidin-sensitive Arrhythmien

Die Abbildungen A1, B1 und C1 zeigen Arrhythmien an rechten Vorhofpräparaten von TG (spontane sowie Histamin- oder Dimaprit induzierte), die nach Zugabe von Cimetidin in das Organbad sistierten und somit Cimetidin-sensitiv waren (A2, B2 und C2).

4.5 Effekte von H89, W7, SQ22536

In diesem Versuchsteil wurde der Einfluss von Hemmstoffen der Signaltransduktion auf die Kontraktilität bzw. Schlagfrequenz von isolierten Vorhofpräparaten untersucht. Auch der Einfluss auf spontane sowie Dimaprit-induzierte Arrhythmien wurde betrachtet. Dazu wurde im Anschluss an die Dimaprit-KWK dem Organbad mit den Vorhof-Präparaten von WT und TG, die bis zu dem Zeitpunkt keine basalen und keine Dimaprit-induzierten Arrhythmien zeigten, sowie den Präparaten, die unter Dimaprit Arrhythmien entwickelten, jeweils einer der folgenden Stoffe hinzugefügt und eine weitere Versuchsreihe (Abb. 7) durchgeführt.

In der ersten Versuchsreihe wurde der Effekt des Proteinkinase-A-Hemmers H89 an elektrisch gereizten linken und spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten von WT und TG im Anschluss einer Dimaprit-KWK untersucht. Dafür wurde dem Organbad am Ende der Dimaprit-KWK 50 μ M von H89 hinzugefügt und der Effekt sowohl auf die rechten als auch auf die linken Vorhofpräparate beobachtet. Der Proteinkinase-A-Hemmer H89 zeigte einen unterschiedlichen Effekt auf die Präparate von WT und TG, der statistisch signifikant war. Bei den Vorhofpräparaten von WT induzierte H89 einen positiv inotropen Effekt. Dieser konnte bei sechs von sieben linken Vorhofpräparaten von WT beobachtet werden. Dementgegen standen die linken Vorhofpräparate von TG, bei denen H89 an jedem der sieben Präparate eine negativ inotrope

Wirkung auslöste und der Effekt von H89 auf TG im Vergleich zu WT statistisch signifikant war (Abb. 20A).

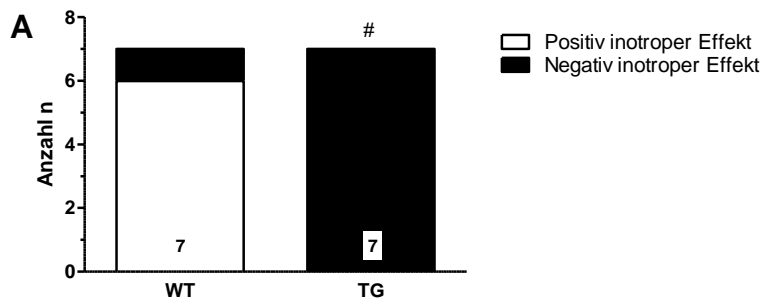
An den rechten Vorhofpräparaten von WT und TG induzierte H89 im Anschluss an die Dimaprit-KWK einen negativ chronotropen Effekt, der statistisch ohne Signifikanz blieb. Bei den rechten TG-Vorhofpräparaten zeigten fünf von sechs Präparate, bei den WT-Vorhofpräparaten zwei von drei Präparate eine negativ chronotrope Reaktion auf H89.

An zwei der rechten TG-Vorhofpräparaten sistierten die Dimaprit induzierten Arrhythmien unter Zugabe von 50 μ l H89. An weiteren zwei Präparaten ohne aufgetretenen Arrhythmien nach Dimaprit-KWK wurden durch H89 Arrhythmien ausgelöst. Eine signifikante antiarrhythmogene Wirkung durch H89 konnte nicht nachgewiesen werden.

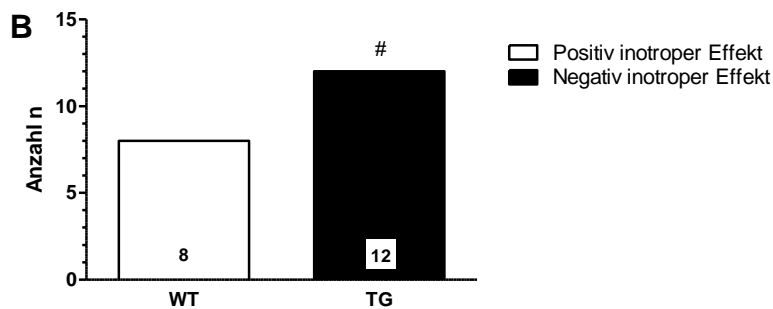
In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Effekt des CAM-Kinase-Hemmers W7 auf die rechten und linken Vorhofpräparate von WT und TG untersucht. Dabei wurde wiederum im Anschluss an die Dimaprit-KWK dem Organbad 50 μ M W7 hinzugefügt und die Wirkung auf die Vorhofpräparate beobachtet. Bei den linken Vorhofpräparaten von WT induzierte W7 bei allen acht Präparaten einen positiv inotropen Effekt. Im Gegensatz dazu konnte bei den gesamten sieben linken Vorhofpräparaten von TG nach Zugabe von W7 ein negativ inotroper Effekt beobachtet werden ($p < 0,05$ vs. WT, Abb. 20B).

Bei nur einem rechten transgenen Vorhof von insgesamt zwölf Präparaten sistierten die zuvor aufgezeichneten Arrhythmien unter Zugabe von W7. Bei dem Großteil der TG-Vorhofpräparate, zehn von zwölf Präparate, führte die Zugabe von W7 zu keiner Veränderung der Arrhythmien; weder bei den spontanen noch bei den Dimaprit induzierten Arrhythmien. Demgegenüber wurde bei je einem rechten Vorhof von WT und TG durch W7 neue Arrhythmien ausgelöst. Somit konnte hier kein Einfluss von W7 auf die Arrhythmogenese nachgewiesen werden.

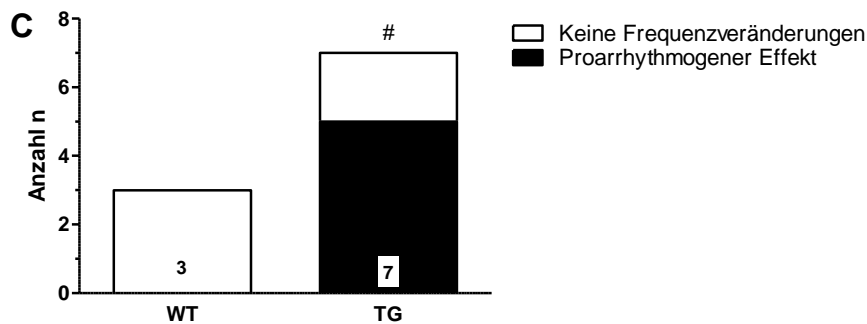
Die letzte Versuchsreihe wurde mit dem Adenylatcyclase-Hemmer SQ22536 durchgeführt. Dafür wurden dem jeweiligen Organbad 50 μ M SQ22536 im Anschluss an die Dimaprit-KWK hinzugefügt und der Effekt auf die linken und rechten Vorhofpräparate von WT und TG beobachtet. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Hemmstoffen zeigte SQ22536 keinen Effekt auf die linken Vorhofpräparate von TG und WT. Stattdessen wies SQ22536 einen proarrhythmischen Effekt auf die rechten Vorhofpräparate von TG auf, der im Vergleich zu WT statistisch signifikant war. Bei den rechten Vorhofpräparaten von TG löste SQ22536 bei fünf von sieben Präparaten Arrhythmien aus, bei den Vorhofpräparaten von WT konnte kein Effekt auf die Frequenz gezeigt werden (Abb. 20C).



Effekt von H89 an linken Vorhöfen von WT und TG



Effekt von W7 an linken Vorhöfen von WT und TG



Effekt von SQ22536 an rechten Vorhöfen von WT und TG

Abbildung 20: Effekte von H89, W7 und SQ22536 an WT und TG

Dargestellt sind die signifikanten Effekte nach Zugabe von jeweils 50 μ M H89, W7 und SQ22536 in das Organbad von WT und TG im Anschluss einer Dimaprit-KWK. Der Proteinkinase-A-Hemmer H89 sowie der CAM-Kinase-Hemmer W7 zeigen eine Kraftveränderung an den elektrisch gereizten linken Vorhofpräparaten [A,B]. SQ22536 als Adenylatcyclase-Hemmer induziert einen Effekt auf das Vorkommen von Arrhythmien an spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten [C]. # TG vs. WT; $p < 0,05$

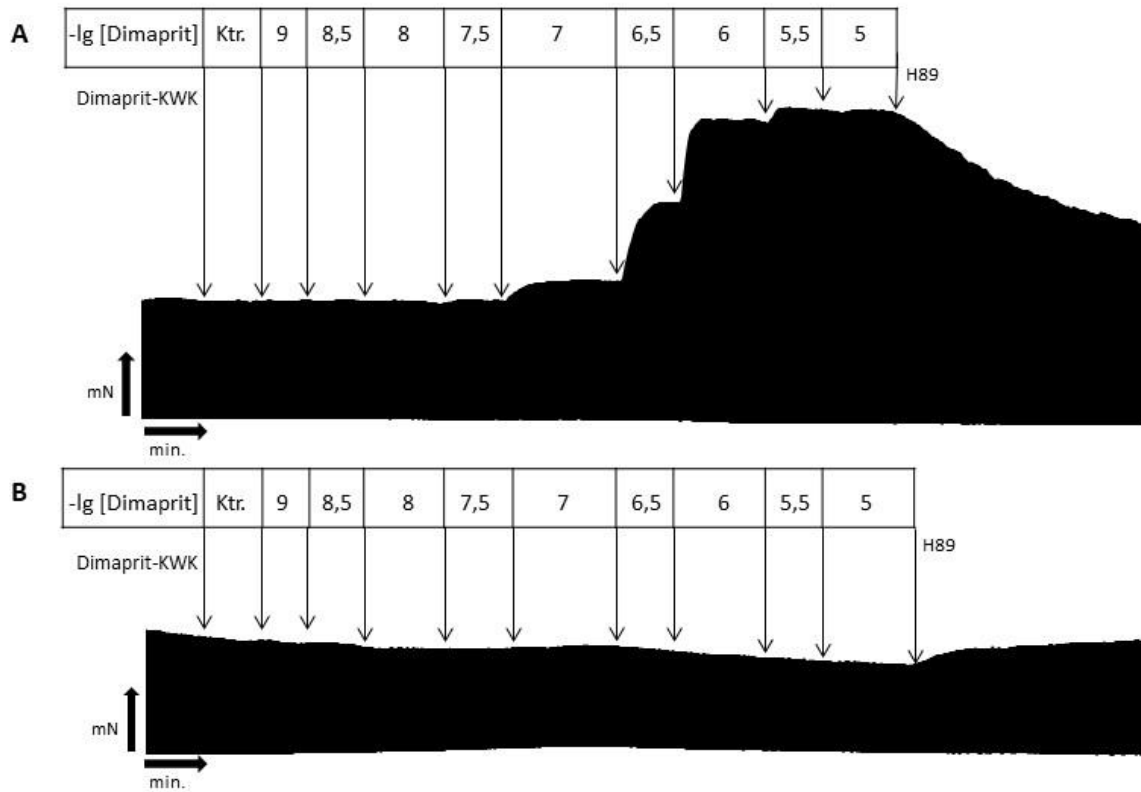


Abbildung 21: Mechanogramme mit dem Effekt von H89 an linken Vorhofpräparaten von WT und TG

Anhand von repräsentativen Originalaufzeichnungen werden die Effekte von H89 im Anschluss einer Dimaprit-KWK auf die linken Vorhofpräparate von WT und TG dargestellt. Erkennbar ist nach Zugabe von $50 \mu\text{M}$ H89 der negativ inotrope Effekt an TG [A] und der positiv inotrope Effekt an WT [B].

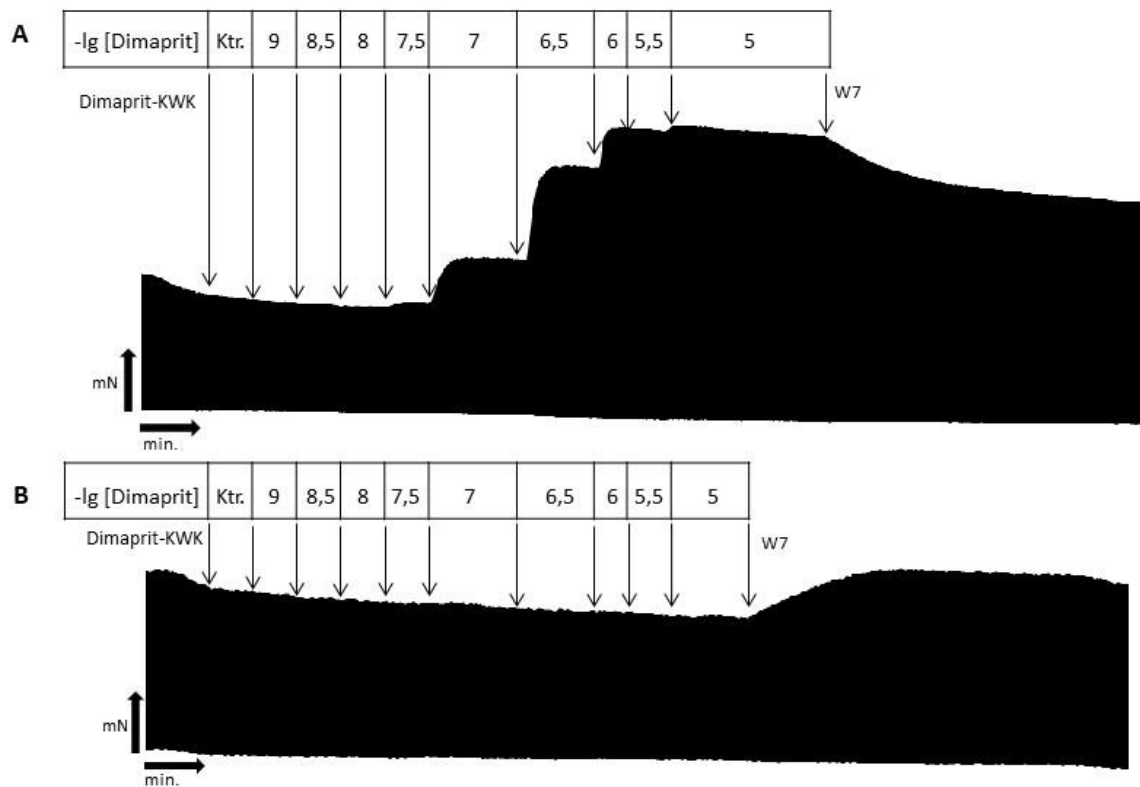


Abbildung 22: Mechanogramme mit dem Effekt von W7 an linken Vorhofpräparaten von WT und TG

Anhand von repräsentativen Originalaufzeichnungen werden die Effekte von W7 im Anschluss einer Dimaprit-KWK auf die linken Vorhofpräparate von WT und TG dargestellt. Nach Zugabe von 50 μM W7 ist der negativ inotrope Effekt an TG [A] und der positiv inotrope Effekt an WT [B] erkennbar.

4.6 Effekt von Compound 48/80

Mit dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob in den Vorhofpräparaten Histamin-Speicher existieren, aus denen Histamin freigesetzt werden kann. Nach der Äquilibration der Präparate wurden den Organbädern des ersten TG-Präparates 100 μl Cimetidin hinzugefügt. Um einen Kontrollwert zu generieren, erhielten die Organbäder mit den Vorhofpräparaten des zweiten TG-Präparates 100 μl Tyrode. Die WT-Präparate wurden analog behandelt. Zudem wurde zu allen Organbädern 10 μl Propranolol hinzugegeben, um eventuelle Katecholamin-Ausschüttungen und dessen β -adrenerge Wirkungen zu hemmen.

Daran anschließend erfolgte in zeitlicher Reihenfolge die Zugabe von jeweils 30 μM und 100 μM Compound 48/80. Es wurde die Wirkung von Compound 48/80 auf die Kraft der linken Vorhofpräparate von TG und WT im Vergleich untersucht. Zudem war der Effekt von Cimetidin, ein inverser H_2 -Rezeptor-Agonist, in Bezug auf Compound 48/80 von Interesse.

Zunächst wurde der Effekt von Compound 48/80 auf die linken Vorhofpräparate von Wildtyp- und transgenen Mäusen in Bezug auf die Kraft dargestellt (Abb. 23A). Bei vorheriger Zugabe von 100 μl Tyrode als Kontrolle war nach Zugabe von 30 μM Compound 48/80 bei den linken WT-Vorhofpräparaten ein geringer nicht signifikanter Kraftanstieg auf 121 ± 9 (n=5) % zu beobachten. Bei TG hingegen zeigte sich ein Kraftanstieg auf 150 ± 9 (n=8) % ($p < 0,05$ vs. Kontrolle und vs. WT, Abb. 23A).

Nach Zugabe von 100 μM Compound 48/80 konnte ein Kraftanstieg um 39 ± 9 (n=5) % bei den linken WT-Vorhofpräparaten und ein Anstieg um 65 ± 9 (n=8) % bei den TG-Vorhofpräparaten im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet werden ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, Abb. 23A). Der Vergleich zwischen WT und TG ergab einen statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 23A).

Parallel dazu wurde der Effekt von 30 μM und 100 μM Compound 48/80 auf die Kraft der linken Vorhofpräparate von WT und TG nach Vorinkubation mit 100 μM Cimetidin beobachtet. Die Kraft wurde nach Zugabe von Cimetidin als Kontrollwert mit 100 % gleichgesetzt. Bei den linken Vorhofpräparaten von WT konnte nach Zugabe von 30 μM Compound 48/80 kein Kraftanstieg gemessen werden. Die linken Vorhofpräparate von TG zeigten hingegen einen Kraftanstieg auf 124 ± 6 (n=10) % ($p < 0,05$, Abb. 23B). Wurden je Organbad 100 μM Compound 48/80 hinzugegeben, zeigten auch die linken Vorhofpräparate von WT eine positiv inotrope Reaktion auf die Substanz. Diese war mit einem Kraftanstieg um 46 ± 10 (n=4) % im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant (Abb. 23B). Ebenso zeigten die Präparate von TG einen weiteren Anstieg der Kraft um 45 ± 13 (n=10) % ($p < 0,05$ vs. Kontrolle). Die gemessene Kraft zwischen TG und WT war nach Zugabe von 100 μM Compound 48/80 nicht verschieden (Abb. 23B).

Die Differenz der Kraft bei WT unter Compound 48/80 nach vorheriger Gabe von Tyrode im Vergleich zu Cimetidin zeigte keinen Unterschied (Abb. 23C). Bei den Präparaten von TG hingegen reagierten die linken Vorhofpräparate unter 30 μM Compound 48/80 nach vorheriger Zugabe von Cimetidin mit einem geringeren Kraftanstieg als die Präparate, die zuvor Tyrode im Organbad erhielten (Abb. 23D). Diese Differenz des Kraftanstiegs bei den transgenen Präparaten betrug 26 %. Auch unter 100 μM Compound 48/80 konnte bei den linken TG-Vorhofpräparaten nach vorheriger Zugabe von Cimetidin im Vergleich zur Tyrode ein um 33 % geringerer Kraftanstieg beobachtet werden (Abb. 23D).

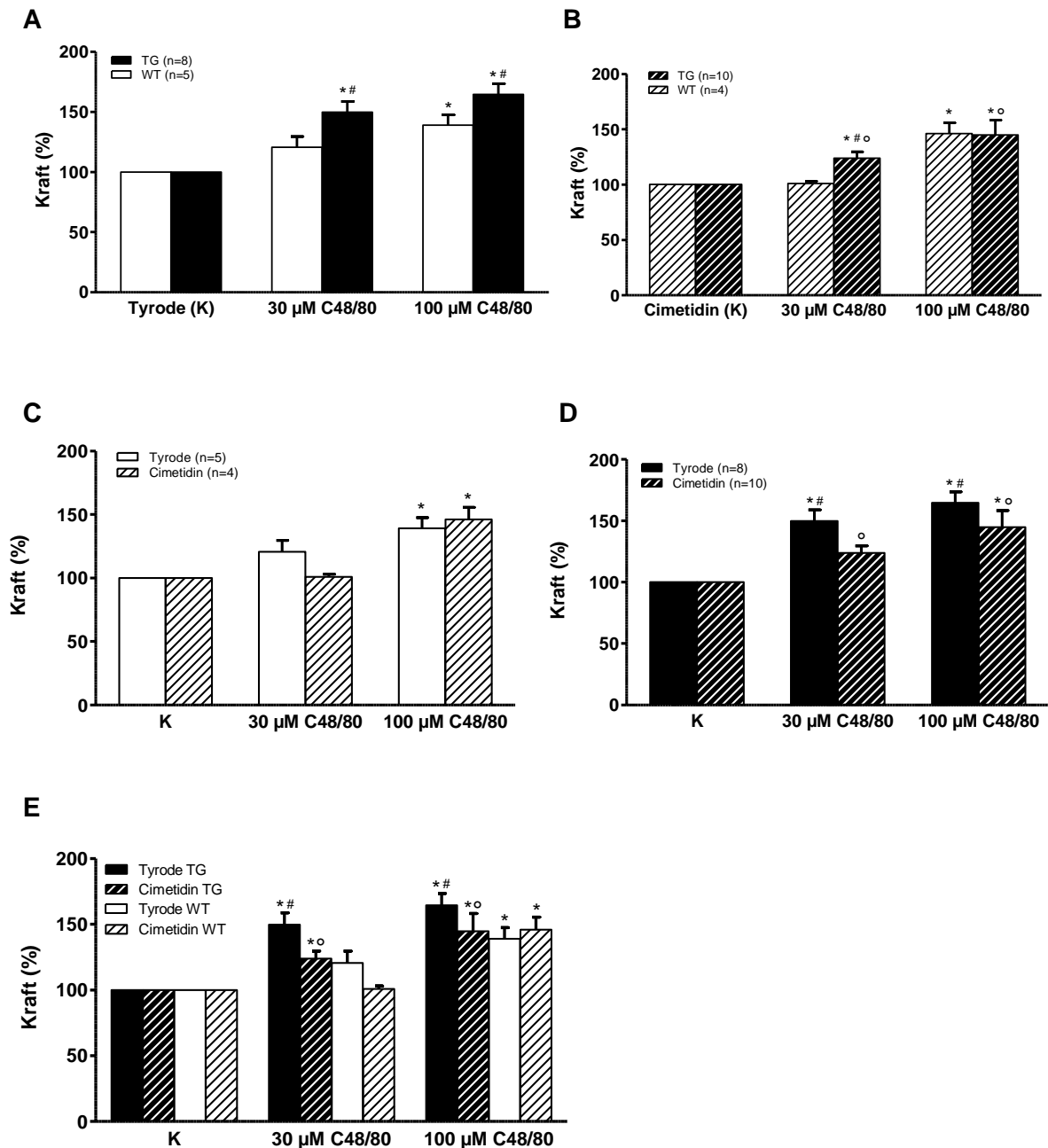


Abbildung 23: Effekte von Compound 48/80

A/B: Effekt von Compound 48/80

An elektrisch gereizten linken Vorhofpräparaten wird der Effekt von Compound 48/80 (C48/80) auf die Kraft in TG und WT dargestellt. Als Kontrolle (K) wurden zunächst 100 μ l Tyrode [A] bzw. 100 μ l Cimetidin [B] hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte in zeitlicher Reihenfolge die Zugabe von 30 μ M und 100 μ M Compound 48/80 (C48/80). * TG/WT vs. Kontrolle, $p < 0,05$; # TG vs. WT, $p < 0,05$; °Cimetidin vs. Tyrode, $p < 0,05$

C/D: Effekt von Cimetidin in Bezug auf Compound 48/80

Dargestellt wird der Effekt von 100 μ M Cimetidin auf die daran anschließende Wirkung von Compound 48/80 an elektrisch gereizten linken Vorhofpräparaten in WT [C] und TG [D]. * TG/WT vs. Kontrolle (K), $p < 0,05$; # TG vs. WT, $p < 0,05$; °Cimetidin vs. Tyrode, $p < 0,05$

E: Gesamtüberblick der Effekte von Cimetidin und Compound 48/80

Bisher wurden die Auswirkungen von Compound 48/80 nach vorheriger Zugabe von Tyrode oder Cimetidin auf die Kraftentwicklung der linken Vorhofpräparate von TG und WT betrachtet. An den rechten Vorhofpräparaten kam es nach Zugabe von hohen Konzentrationen von Compound 48/80, vorrangig nach Gabe von 100 µM Compound 48/80, zu ausgeprägten Arrhythmien, die sich in einer zunehmenden Bradyarrhythmie bis hin zu einer Asystolie manifestierten. Das Auftreten der Arrhythmien unter Compound 48/80 war unabhängig davon, ob dem Organbad zuvor Cimetidin oder Tyrode als Kontrolle hinzugefügt wurde. Ebenso waren die rechten Vorhofpräparate sowohl von WT als auch von TG von den Arrhythmien (Bradyarrhythmien und Asystolie) durch die Zugabe von Compound 48/80 gleichermaßen betroffen (Tab. 2).

Tabelle 2: Auftreten von Arrhythmien unter Compound 48/80

Das Auftreten von Arrhythmien (Arr.) an den rechten Vorhofpräparaten von TG und WT unter Compound 48/80 in unterschiedlich hoher Konzentration (30 µl und 100 µl) wird in Abhängigkeit zur vorherigen Gabe von Cimetidin bzw. Tyrode tabellarisch dargestellt.

TG

C48/80 30 µl	Arr.	∅ Arr.	Σ
Tyrode	2	2	4
Cimetidin	1	8	9
Σ	3	10	13

chi²-Test: p=0,1245

WT

C48/80 30 µl	Arr.	∅ Arr.	Σ
Tyrode	1	3	4
Cimetidin	0	4	4
Σ	1	7	8

chi²-Test: p=0,2850

TG

C48/80 100 µl	Arr.	∅ Arr.	Σ
Tyrode	2	2	4
Cimetidin	7	2	9
Σ	9	4	13

chi²-Test: p=0,3166

WT

C48/80 100 µl	Arr.	∅ Arr.	Σ
Tyrode	3	1	4
Cimetidin	1	3	4
Σ	4	4	8

chi²-Test: p=0,1573

Tabelle 3: Charakterisierung der aufgetretenen Arrhythmien unter Compound 48/80

Arrhythmien	n=17
Asystolie	n=10
Bradyarrhythmie	n=3
Arrhythmie undefiniert	n=4

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Transgenes Mausmodell

Im Institut für Pharmakologie und Toxikologie in Halle an der Saale wurde eine transgene Maus generiert, die den humanen H₂-Rezeptor im Herzen überexprimiert (Gergs et al., 2019; vgl. Neumann et al., 2021). Bisher standen für Untersuchungen des humanen H₂-Rezeptors nur explantiertes menschliches Gewebe vom Arbeitsmyokard des Vorhofes oder der Kammer zur Verfügung. An humanen Herzen bzw. an myokardialen Gewebe mit komplett erhaltenem Sinusknoten ließen sich Versuche zum weiteren Verständnis des humanen H₂-Rezeptors bisher nicht durchführen. Mit dem transgenen Mausmodell haben wir die Möglichkeit geschaffen, den Einfluss des H₂-Rezeptors sowohl auf die Herzfrequenz als auch auf die Schlagkraft des Herzens unter basalen Bedingungen als auch unter Einfluss verschiedener Pharmaka (Agonisten und Antagonisten) zu beurteilen. Als Kontrollgruppe dienen die Wildtyp-Geschwistertiere, da sie unter experimentellen Bedingungen keine Reaktion auf Histamin zeigen (Gergs et al., 2019). Im Vergleich zu menschlichem Gewebe steht das transgene Mausmodell einfacher und in größerem Ausmaß zur Verfügung. Menschliche Papillarmuskelpräparate besitzen keinen intakten Sinusknoten, sodass chronotrope Wirkungen nicht beurteilt werden können. Dies war jedoch für unsere Versuche hinsichtlich der Frequenzänderungen und dem Auftreten von Arrhythmien notwendig. Des Weiteren können die Versuche unter standardisierten Bedingungen ablaufen, da Einflussfaktoren auf das Myokard wie Vorerkrankungen und die Vormedikation ausgeschlossen werden können. Mithilfe des transgenen Mausmodells lassen sich die Eigenschaften des humanen H₂-Rezeptors nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* untersuchen. Ein weiterer Vorteil gegenüber anderen größeren Säugetieren besteht in der einfacheren Züchtung der Tiere, der Haltung und Handhabung der Instrumente. Neben den Vorteilen des transgenen Mausmodells gibt es jedoch auch Kritikpunkte, die im Folgenden aufgeführt werden. Die Physiologie des Mausherzen entspricht nur teilweise der des Menschen. Zudem ergaben weder Versuche mit Western Blots als auch Versuche an isolierten Membranen hinsichtlich der Rezeptordichte kein spezifisches Signal, sodass es bisher nicht möglich war, die Rezeptordichte eindeutig zu bestimmen (Gergs et al., 2019). Die Versuchsergebnisse können somit nicht zu 100 % auf den Menschen oder andere Spezies übertragen werden. Unter Basalbedingungen zeigen die Präparate des transgenen Mausmodells im Vergleich zu den Wildtyp-Präparaten eine erhöhte Grundfrequenz und erhöhte Kontraktionskraft. Diese erhöhte Basalaktivität der transgenen Mauspräparate kann möglicherweise mit einer geringen konstitutiven Aktivität des Histamin-Rezeptors erklärt werden, die es ermöglicht die Signalkaskade auch ohne Agonisten-Bindung zu

aktivieren (Gergs et al., 2010; Kaumann, 2013). Da in dem transgenen Mausmodell nur die H₂-Rezeptoren überexprimiert werden, ist eine Aussage über die weiteren Isoformen, die im Herzen vorkommen, und in vivo gegebenenfalls die Reaktionen bzw. Signalkaskaden mitbeeinflussen, nicht möglich. Dies kann je nach Fragestellung ein Vor- oder Nachteil sein. Zusammenfassend bietet das transgene Mausmodell die idealen Voraussetzungen für Versuche, um den humanen H₂-Rezeptor und dessen Eigenschaften näher differenzieren zu können.

5.1.2 Kontraktionsversuche an isolierten Vorhofpräparaten

Für die Kontraktionsversuche wurden isolierte linke und rechte Vorhofpräparate der Wildtyp- und transgenen Mäuse verwendet. Mit dieser Methode ließen sich jeweils die Chronotropie an den rechten Vorhofpräparaten und die Inotropie an den linken Vorhofpräparaten unabhängig voneinander untersuchen sowie Änderungen der Sinusknotenfrequenz bzw. der Kontraktionskraft durch pharmakologische Interventionen. Dies stellt einen Vorteil der „in vitro“-Versuche dar, da sich Schlagfrequenz und Kontraktionskraft in vivo gegenseitig beeinflussen. Dieser Vorteil bedingt gleichzeitig den Nachteil, dass komplexe Vorgänge eines intakten Organismus nicht dargestellt werden können.

Eine wichtige Fehlerquelle bei den Kontraktionsversuchen besteht in der vorherigen Präparation der Vorhöfe. Der Durchmesser eines Vorhofes misst nur wenige Millimeter, sodass selbst bei sorgfältiger Präparation mechanische Irritationen wie z.B. Überdehnungen auftreten. Diese mechanischen Irritationen können sowohl bei den spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten als auch bei den elektrisch stimulierten linken Vorhofpräparaten zu Bradykardien, Tachykardien und Arrhythmien führen, was sich zumeist schon in der Äquilibrierphase zeigt. An einigen rechten Vorhofpräparaten mit zuvor unauffälliger Äquilibrierphase fielen zudem im Versuchsverlauf fehlende Frequenzanstiege oder arrhythmische Kontraktionen auf. Die Ursachen hierfür sind am ehesten im Rahmen der großen mechanischen Belastung durch die vermehrten Badwechsel, der langen Versuchsdauer (unter anderem bis zu 5 Stunden) und der Verwendung hoher Konzentrationen von stark positiv chronotrop wirkenden Substanzen zu sehen. Die Auswertung der Versuchsreihen mit rechten Vorhofpräparaten wurde dadurch deutlich erschwert, insbesondere hinsichtlich des Auftretens von Arrhythmien an rechten Vorhofpräparaten.

5.1.3 Mausmodell in vivo (Echokardiografie)

In den Versuchen mit den isolierten Vorhofpräparaten konnten die chronotropen und inotropen Wirkungen der Histamin-Rezeptoren getrennt voneinander betrachtet werden. Um die komplexen Vorgänge des intakten Organismus darstellen zu können, wurden weitere Versuche

mittels Echokardiografie an lebenden Mäusen durchgeführt. Die chronotrope Wirkung wurde durch die abgeleitete Herzfrequenz mittels EKG und die inotrope Wirkung durch die ermittelte Ejektionsfraktion (EF) während der Echokardiografie beurteilt. Da bei diesem Versuchsmodell der komplette Organismus auf die injizierten Substanzen reagierte, konnten die beobachteten chronotropen und inotropen Wirkungen nicht ausschließlich den H_2 -Rezeptoren am Herzen zugeordnet werden. Die Maus besitzt, wie auch der menschliche Organismus, in vielen weiteren Organen (z.B. im Gefäßsystem) Histamin-Rezeptoren, die die Herzfrequenz und das Schlagvolumen beeinflussen können (Tippens et al., 2004 a/b). Des Weiteren muss auch die Freisetzung von Katecholaminen durch Histamin betrachtet werden, die sich auf die Herzfrequenz und das Schlagvolumen auswirken (Tung et al., 1986). Für weitere Versuche sollte in Betracht gezogen werden, Versuchsreihen in vivo mittels Echokardiografie unter Blockierung der Katecholaminwirkung, zum Beispiel durch vorherige Injektion von Reserpin, durchzuführen. Darüber hinaus könnten Versuchsreihen in vivo ergänzt werden, in denen die Reaktion selektiver Histamin-Rezeptorantagonisten beurteilt werden, um z.B. H_1 -Rezeptoren zu blockieren.

5.2 Effekte der Histaminrezeptor-Agonisten

5.2.1 Wirkung von Histamin

Die Zugabe von Histamin in das Organbad bewirkte ab einer bestimmten Konzentration an den TG-Vorhofpräparaten einen positiv inotropen und chronotropen Effekt.

In dieser Arbeit konnten bei den linken TG-Vorhofpräparaten ein pEC_{50} -Wert von $-6,91 \pm 0,13$ und an den rechten TG-Vorhofpräparaten ein pEC_{50} -Wert von $-6,81 \pm 0,78$ ermittelt werden. Bei den linken TG-Vorhofpräparaten kam es zu einem signifikanten Kraftanstieg ab einer Histamin-Konzentration von etwa 30 nM. Für einen signifikanten Frequenzanstieg der rechten TG-Vorhofpräparate war eine etwas niedrigere Histamin-Konzentration von etwa 25 nM ausreichend.

Hierfür können verschiedene Erklärungen in Betracht gezogen werden. In dem untersuchten Mausmodell wird letztendlich ein fremdes Protein im Mauserz exprimiert. Die genetisch veränderte Maus überexprimiert einen menschlichen H_2 -Rezeptor im Herzen. Hierfür wurde die zufällige Integration einer Expressionskassette in das Mausgenom genutzt, sodass die genaue chromosomale Lokalisation und die Anzahl der Genkopien nicht vorhersehbar waren. Dementsprechend kann es durch nicht vorhersehbare Regulationsprozesse der Transkription zu einer unterschiedlichen Verteilung der Histamin-Rezeptoren im linken und rechten Vorhof kommen. Auf Ebene des Wirkmechanismus kann letztendlich nicht sicher gesagt werden, ob die überexprimierten menschlichen H_2 -Rezeptoren in der Maus in ihrer Funktion mit den komplexen

Signalwegen der H₂-Rezeptoren im Menschen übereinstimmen. Zudem ist bekannt, dass im Sinusknoten eine Erhöhung des cAMP direkt, ohne Beteiligung von Protein-Phosphorylierungen, durch Bindung von cAMP an HCN-Kanäle zu einer beschleunigten spontanen Depolarisation führt und so zu einem positiv chronotropen Effekt beiträgt (Leroy et al., 2018). Auch die Lokalisation des Rezeptors innerhalb der Zelle ist von Bedeutung, da es unterschiedliche cAMP-Kompartimente in einer Herzmuskelzelle gibt, die unterschiedlich an Inotropie und Chronotropie gekoppelt sein könnten (Leroy et al., 2018). Darüber hinaus könnten auch unterschiedliche G-Proteine in den Signalwegen der rechten und linken Vorhöfe involviert sein, z.B. G₁-Proteine, die im Vergleich zu den G_s-Proteinen zu einer Hemmung der Adenylatcyclase führen (Mousli et al., 1990).

Ferner könnte das intrazelluläre Histamin ein intrazellulärer Botenstoff (second messenger) sein (Brandes et al., 1990 und 2002). Zumindest gibt es Effekte von Histamin auf G-Proteine, die Rezeptor-unabhängig erfolgen und zellspezifisch zu sein scheinen (Hegelücken et al., 1995).

Neben den oben genannten Versuchen wurden die Effekte von Histamin am Herzen auch an anderen Tiermodellen untersucht, unter anderen an den Vorhöfen von Meerschweinchen und Kaninchen (Hattori et al., 1991; Agata et al., 2010). Histamin bewirkte bei beiden Tiermodellen an den linken Vorhöfen einen positiv inotropen und an den rechten Vorhöfen einen positiv chronotropen Effekt. An Kaninchen-Vorhöfen konnte der Effekt durch Histamin den H₂-Rezeptoren zugeordnet werden.

Um die Auswirkungen auf den kompletten Organismus beurteilen zu können, wurde der Histamin-Effekt mithilfe der Echokardiografie an Isofluran-narkotisierten Wildtyp- und transgenen Mäusen dargestellt. Vergleichend zur Kraft- und Frequenzänderung der linken bzw. rechten Vorhofpräparate in den isolierten „in vitro“-Versuchen werden in der Echokardiografie die Veränderungen der Ejektionsfraktion und Herzfrequenz nach Zugabe von Histamin betrachtet.

Sowohl die Wildtyp- als auch die transgenen Mäuse reagierten auf Histamin mit einem Anstieg der Ejektionsfraktion und Herzfrequenz. Die positiv inotropen und chronotropen Effekte von Histamin waren bei TG deutlich stärker ausgeprägt als bei WT. Bei den „in vivo“-Versuchen wirkte sich Histamin auf den gesamten Organismus aus, sodass es durch Histamin zu einem Blutdruckabfall und kompensatorisch zu einer steigenden Herzfrequenz und Ejektionsfraktion sowohl der transgenen als auch der Wildtyp-Mäuse kam (Owen, 1975). Bei den Wildtyp-Mäusen sind für den Effekt durch Histamin die endogenen Rezeptoren im Gefäßsystem verantwortlich. Die transgenen Mäuse hingegen besitzen zusätzlich die kardial überexprimierten H₂-Histamin-

Rezeptoren, sodass hierdurch ein größerer Effekt durch Histamin erklärt werden kann. Um die endogenen Effekte über H₁-Histamin-Rezeptoren auszublenden, könnte in weiterführenden „in vivo“-Versuchen zu Beginn ein H₁-Rezeptor-Antagonist hinzugegeben werden.

Histamin und Dimaprit bedingen einen zellulären cAMP-Anstieg, der wiederum zu einer erhöhten intrazellulären Calcium-Konzentration führt. Durch Einströmen des Calciums durch L-Typ-Calcium-Kanäle wird die Depolarisationsgeschwindigkeit erhöht, sodass Arrhythmien entstehen können. Für die Repolarisation des Membranpotenzials spielen spannungsgesteuerte Kalium-Kanäle eine wichtige Rolle. An einem Tiermodell mit Meerschweinchen führte eine erhöhte Kalium-Konzentration zur Senkung der Depolarisations-Frequenz des Sinusknotens. Histamin konnte diesen Effekt abschwächen, sodass Histamin möglicherweise auch die Funktionsweise von Kanälen mit Kalium als Ladungsträger beeinflusst (Levi und Pappano, 1978). Veränderungen des Kalium-Spiegels führen bekannterweise zu Arrhythmien, sodass Histamin neben der Beeinflussung des Calcium-Spiegels auch hierüber zu der Entstehung von Arrhythmien beitragen kann (Hoppe et al., 2018; Ozen et al., 2019).

5.2.2 Compound 48/80

Um nicht nur die exogene, sondern auch eine eventuell endogene Histaminfreisetzung näher betrachten zu können, führten wir an den isolierten Vorhofpräparaten Versuchsreihen mit Compound 48/80 durch.

Compound 48/80 entsteht als Produkt bei der Kondensation von N-methyl-p-methoxyphenethylamin mit Formaldehyd und setzt sich aus Polymeren mit einem niedrigen molekularen Gewicht zusammen (Lagunoff et al., 1983). Es sorgt für eine Freisetzung von Histamin, hauptsächlich aus den Mastzellen (Abramo et al., 2016). Zudem werden durch Compound 48/80 im Organismus Katecholamine freigesetzt (Muldoon et al., 1987; Lovenberg et al., 1988). Auf Rezeptorebene weist Compound 48/80 ein breites Funktionsspektrum auf; es dient als potenter Phospholipase C-Hemmer, Calmodulin-Hemmer und aktiviert G-Proteine (Bronner et al., 1987; Byrne et al., 2007).

Um die endogene Histaminfreisetzung durch Compound 48/80 näher betrachten zu können, führten wir eine Versuchsreihe an unserem Mausmodell unter Zugabe von aufsteigenden Compound-Konzentrationen durch. Die Zugabe von Propranolol zu Beginn der Versuche sollte den Effekten einer Katecholaminfreisetzung entgegenwirken. Für den direkten Vergleich zwischen endogener und exogener Histaminwirkung wurde einem Teil der Präparate zur Hemmung der Histaminwirkung Cimetidin in das Organbad vor der Compound-Gabe hinzugefügt.

Durch Zugabe von Compound 48/80 kam es bei den linken TG- und WT-Vorhofpräparaten zu einem konzentrationsabhängigen positiv inotropen Effekt. Dieser war bei den TG-Vorhofpräparaten deutlich stärker ausgeprägt und sowohl zur Kontrolle als auch im Vergleich zu den WT-Präparaten signifikant. Auch unter vorheriger Zugabe des Histamin-Antagonist Cimetidin wurde eine positiv inotrope Reaktion durch Compound 48/80 bei den TG-Vorhofpräparaten registriert, die im Vergleich zu dem Versuch ohne Cimetidin signifikant niedriger ausfiel. Entgegen den Erwartungen zeigten auch die WT-Präparate bei sehr hoher Compound-Konzentration unter Cimetidin einen positiv inotropen Effekt. Dies ist am ehesten durch die Compound-induzierte Katecholaminfreisetzung zu erklären. Die zu Versuchsbeginn hinzugefügte Konzentration von 10 μ M Propranolol scheint zur Hemmung der Katecholaminfreisetzung nicht ausreichend gewesen zu sein. Um diese Therapie zu bestärken wäre eine Wiederholung der Versuchsreihe mit einer höheren Propranolol-Konzentration notwendig. Die Differenz der erhaltenen positiv inotropen Effekte transgener Vorhofpräparate mit und ohne Zugabe von Cimetidin entspricht der exogenen Histaminwirkung und dementsprechend der H₂-Rezeptor vermittelten Reaktion. Dass Compound 48/80 eine große Rolle in der endogenen Histaminfreisetzung einnimmt, wird an der Differenz des Kraftanstieges durch die Zugabe von Compound 48/80 unter Cimetidin im Vergleich zur Kontrolle deutlich.

Histamin wird meist sekretorisch, zum Beispiel Energie- oder Calcium-abhängig, aus den Mastzellen freigesetzt. Kleine Bläschen verschmelzen mit der Membran, setzen Histamin frei und bilden sich durch Endozytose wieder neu. Bei einem weiteren Mechanismus verschmelzen mehrere Bläschen zu einem langen Schlauch mit Einschnürungen, der sich im Verlauf wieder zurückbildet (Cabeza et al., 2013).

Aus den Granula der Mastzellen kann Histamin in großer Menge zusammen mit anderen Mediatoren, z.B. Proteasen, in kürzester Zeit ausgeschüttet werden (Mackins et al., 2006; Reid et al., 2011).

In Versuchen konnte Histamin aus isoliert perfundierten Rattenherzen durch Compound 48/80 oder Neurotensin über direkte Wirkungen auf G_i-Proteine freigesetzt werden (Rioux et al., 1984; Mousli et al., 1990). Erhielten die Ratten bereits drei Tage vor dem Versuch Compound 48/80 konnte keine Histaminfreisetzung nachgewiesen werden - die Histamin-Speicher wurden demnach vorab entleert (Rioux et al., 1984).

Nach Explantation menschlicher Ventrikel enthalten diese eine relativ große Menge an Histamin, welches zum Teil aus den Mastzellen des humanen Herzens stammt und durch Compound 48/80 freigesetzt werden kann (Patella et al., 1995). Neben der Freisetzung aus den Mastzellen stammt

Histamin auch aus den Herzmuskelzellen; hierfür erfolgten bereits früh Versuche an Mastzelldefizienten Mäusen (Yamatodani et al., 1982). In aktuellen Versuchen konnte Histamin in Kardiomyozyten in Mausherzen nachgewiesen werden. Darüber hinaus waren Histamin-metabolisierende Enzyme nicht nur in Mausherzen sondern auch in menschlichen Vorhofpräparaten vorhanden (Neumann et al., 2021).

Histamin kommt zudem in den kardialen sympathischen Nerven vor (Mensch: Singh et al., 1999; Maus: He et al., 2012). Die Freisetzung dieses Histamins aus den kardialen Ganglien ist jedoch von der Noradrenalin-Konzentration abhängig, die für eine Freisetzung im Normalbereich liegen muss.

Aufgrund des breiten Funktionsspektrums ist zudem anzunehmen, dass Compound 48/80 auch bei anderen Prozessen als Phospholipase C-Hemmer oder Calmodulin-Hemmer Einfluss nimmt, die möglicherweise ebenfalls eine Veränderung der Inotropie bewirken.

Die oben genannten Versuche wurden auch an den rechten Vorhofpräparaten von TG und WT durchgeführt. Insbesondere sollten basale oder im Verlauf aufgetretene Arrhythmien näher betrachtet werden. Unter der Zugabe von hohen Konzentrationen an Compound 48/80 kam es bei einem Großteil der rechten Vorhofpräparate, vorwiegend der transgenen Präparate, zu einer kardiotoxischen Wirkung, die zu ausgeprägten Bradyarrhythmien bis hin zu Asystolien führte. Wie bereits oben erwähnt führt Compound 48/80 in hohen Konzentrationen unter anderem aufgrund der verstärkten Histaminfreisetzung und weiterer Mechanismen zu einer kardiotoxischen Wirkung (Niemegeers et al., 1978; Dai, 1991; Viaro et al., 2008).

5.2.3 Wirkung von Dimaprit

Genauso wie Histamin bewirkte auch der selektive Histamin-H₂-Rezeptor-Agonist Dimaprit an den Herzvorhofpräparaten transgener Mäuse im Organbad einen positiv chronotropen und inotropen Effekt.

Für die linken und rechten TG-Vorhofpräparate konnten pEC₅₀-Werte ermittelt werden (linke Vorhofpräparate $-6,77 \pm 0,22$, rechte Vorhofpräparate $-6,47 \pm 0,06$), die sich den vorliegenden pEC₅₀-Werten aus anderen Arbeiten annähern (linke Vorhofpräparate $-6,39 \pm 0,17$, rechte Vorhofpräparate $-6,92 \pm 0,47$) (Meister et al., 2014).

In unserem Modell führte an den linken TG-Vorhofpräparaten die Zugabe von Dimaprit ab einer Konzentration von 0,1 µM zu einem signifikanten Anstieg der Kontraktionskraft. Ebenso konnte bei den rechten TG-Vorhofpräparaten ein signifikanter Anstieg der Schlagfrequenz ab einer Dimaprit-Konzentration von 0,1 µM beobachtet werden. Die rechten und linken TG-

Vorhofpräparate scheinen demnach mit annähernd gleicher Sensibilität auf Dimaprit zu reagieren.

Im Vergleich zu den transgenen Mäusen wurde bei den Wildtyp-Mäusen unter Zugabe von Dimaprit kein Effekt auf die Kontraktionskraft und Schlagfrequenz der Vorhofpräparate erwartet. Wie bereits unter hohen Histamin-Konzentrationen kam es auch bei Dimaprit ab einer Konzentration von 3 μM zu einem leicht positiv chronotropen Effekt der WT-Vorhofpräparate ohne statistische Signifikanz. Bei den linken WT-Vorhofpräparaten erzeugten hohe Dimaprit-Konzentrationen im Organbad keinen Effekt.

Die Erklärungsansätze hierfür mit Dimaprit als Histamin-Analogon entsprechen weitestgehend den Versuchen mit Histamin.

In der Literatur sind weitere Arbeiten beschrieben, in denen die Effekte von Dimaprit auf das Herz an verschiedenen Tiermodellen untersucht worden sind. In einer der Arbeiten wurde die Wirkung von Dimaprit mithilfe eines Tiermodells an Papillarmuskeln von Meerschweinchen untersucht. Hierbei bewirkte Dimaprit sowohl einen positiv inotropen als auch positiv chronotropen Effekt (Poli et al., 1993). Auf Zellebene sind ebenfalls Publikationen zu finden. In Versuchen an T-Zellen sowie an der promyelozytischen Zelllinie HL-60 und der promonozytären Zelllinie U937 kam es unter Dimaprit zu einem Anstieg an cAMP (Schreurs et al., 1984; Kalinyak et al., 1985; Shayo et al., 1997).

Damit die Effekte von Dimaprit auf den gesamten Organismus übertragen werden können, sind weitere Versuche notwendig.

Dimaprit induzierte konzentrationsabhängig Arrhythmien an den rechten TG-Vorhofpräparaten. Dies wurde bereits zusammen mit den Histamin-induzierten Arrhythmien diskutiert.

5.3 Histamin-Antagonisten

5.3.1 Signaltransduktion der Hemmstoffe

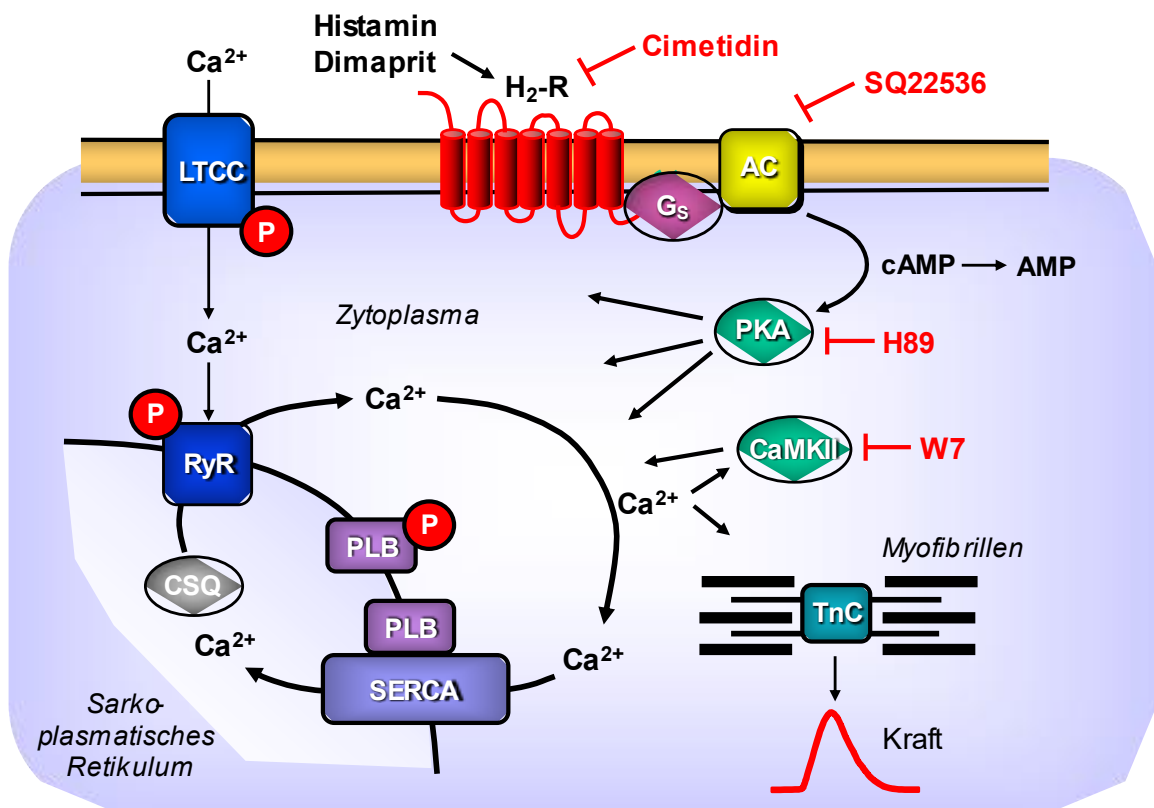


Abbildung 24: Hemmstoffe in der Signaltransduktion des H₂-Rezeptors

Dargestellt ist die Signaltransduktion des H₂-Rezeptors, die durch die Hemmstoffe Cimetidin, H89, W7 und SQ22536 über verschiedene Mechanismen beeinflusst wird.

5.3.2 Cimetidin

Cimetidin ist zum einen ein reversibler und kompetitiver H₂-Rezeptor-Antagonist und zum anderen ein potenter Imidazoline (I₁) bindender Ligand im Sinne eines I₁-Agonisten. Es wurde 1971 durch James White Black entdeckt und kam erstmals 1977 zum kommerziellen Einsatz. Im klinischen Alltag dient Cimetidin als H₂-Antagonist der Belegzellen der Magenschleimhaut, was eine Hemmung der Magensäuresekretion und Reduktion der Pepsin-Sekretion zur Folge hat.

Wie bereits oben beschrieben, konnten wir an den rechten Vorhofpräparaten durch die beiden Histaminrezeptor-Agonisten Histamin und Dimaprit Arrhythmien induzieren. Nach dem Auftreten von Dimaprit-induzierten Arrhythmien wurde den Organbädern Cimetidin in aufsteigender Konzentration hinzugefügt. Die Arrhythmien sistierten und die basale

Grundfrequenz vor Zugabe von Dimaprit wurde erreicht. Der durch Dimaprit induzierte positiv inotrope Effekt auf die linken TG-Vorhofpräparate konnte zudem durch Cimetidin rückgängig gemacht werden. Die H₂-Rezeptoren waren Cimetidin-sensitiv.

In der Literatur finden sich weitere Tiermodelle, die ähnliche Ergebnisse erzielten. In einer Versuchsreihe mit Vorhöfen von Kaninchen bewirkte Histamin an den linken Vorhöfen einen positiv inotropen Effekt, der durch Cimetidin blockierbar war (Li et al., 2009). An den rechten Vorhöfen der Kaninchen wurde durch Histamin ein positiv chronotroper Effekt beobachtet, der wiederum durch Cimetidin aufgehoben werden konnte (Li et al., 2009). An isolierten Trabekel aus dem menschlichen rechten Vorhof war der positiv chronotrope Effekt Cimetidin-sensitiv. Zudem waren in diesem Modell aufgetretene Arrhythmien sowohl Verapamil- als auch Cimetidin-sensitiv (Levi et al., 1981). Für unser Mausmodell wäre interessant zu wissen, ob die Dimaprit-induzierten Arrhythmien ebenfalls sensitiv auf Verapamil, ein Calciumantagonist bzw. Calciumkanalblocker, reagieren.

Cimetidin zeigte nur an den TG-Vorhofpräparaten einen Effekt. Durch die kompetitive Hemmung des H₂-Rezeptors wird der cAMP-Anstieg gehemmt und demzufolge auch die Aktivität der Proteinkinase A (PKA); die durch Dimaprit und Histamin induzierten positiv chronotropen und inotropen Effekte sowie die proarrhythmogene Wirkung wird blockiert. Die zeit- und konzentrationsabhängige Wirkung von Cimetidin entspricht der eines kompetitiven Antagonisten.

5.3.3 H89

H89 wurde von H8 abgeleitet (Hidaka et al, 1984). Es hemmt Proteinkinasen. Dies wird durch die kompetitive Hemmung von Adenosintriphosphat (ATP) durch Bindung an der Katalysatoreinheit erreicht (Murray, 2008). Der größte Effekt wird an der Proteinkinase A entfaltet (Marunaka und Niisato, 2003). Im Vergleich zu H8 ist die Hemmung der Proteinkinase A durch H89 30-mal potenter; dagegen ist die Hemmung der Proteinkinase G zehnmal weniger potent (Chijiwa et al., 1990). Die Proteinkinase A nimmt in ihrer Funktion nicht nur am Herzen in den Kardiomyozyten eine wichtige Rolle ein, sondern auch in diversen weiteren Systemen und Zellebenen, unter anderem in Osteoblasten, Hepatozyten, Muskelzellen, Epithelzellen und im Nervengewebe (Lochner et al., 2006). Neben der Proteinkinase A und G können noch weitere Proteinkinasen wie die S6K1, MSK1, ROCKII, PKB α und MAPKAP-K1b durch H89 gehemmt werden (Lochner und Moolman, 2006).

In einer Versuchsreihe mit ventrikulären Mausmyozyten erhöhte Urocortin 2 die Kontraktilität durch Aktivierung von CRF-, sub₂-Rezeptoren in einer cAMP/PKA- und Ca²⁺-/Calmodulin-Kinase

II (CaMKII)-abhängigen Reaktion. Dieser Effekt konnte durch H89 und KN93, ein Inhibitor der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII), unterdrückt werden. Zudem traten Ca^{2+} -abhängige arrhythmogene Effekte durch Urocortin 2 auf, die durch PKA und CaMKII vermittelt wurden (Yang et al., 2011).

In einer Studie an Rattenherzen induzierte die Aktivierung von Proteinkinase A einen positiv inotropen Effekt und bewirkte zudem einen kardioprotektiven Effekt gegenüber Ischämien. Durch Hemmung der Proteinkinase A konnten diese Effekte unterdrückt werden (Khaliulin et al., 2017).

Eine signifikante antiarrhythmogene Wirkung durch H89 konnte in unserer Versuchsreihe nicht nachgewiesen werden. An den durch Dimaprit stimulierten linken TG-Vorhofpräparaten führte H89 zu einem negativ inotropen Effekt. Im Vergleich dazu kam es bei WT zu einem positiv inotropen Effekt durch H89. Ein negativ chronotroper Effekt durch H89 wurde sowohl an den rechten Vorhofpräparaten der transgenen als auch der Wildtyp-Mäuse beobachtet.

Da H89 kein selektiver Proteinkinase-Hemmer ist, der nur spezifisch die Proteinkinase A in der Signalkaskade des H_2 -Rezeptors hemmt, ist unklar, welche weiteren Kinasen durch H89 in den Kardiomyozyten gehemmt werden und somit eine Reaktion indizieren. Die negativ inotrope Wirkung durch H89 an den TG-Vorhofpräparaten ist durch die potente kompetitive Hemmung der Proteinkinase A in der Signalkaskade des H_2 -Rezeptors zu erklären. Bei den WT-Vorhofpräparaten bleibt die hohe Dimaprit-Konzentration bei fehlenden überexprimierten H_2 -Rezeptoren ohne relevanten Effekt. Unter Zugabe von H89 kann dementsprechend kein zuvor positiv inotroper Effekt antagonisiert werden. Als Erklärungsansatz ist anzunehmen, dass H89 verschiedene Proteinkinasen in den Kardiomyozyten hemmt, was in der Konsequenz zu einem positiv inotropen Effekt führt. Dieser Effekt wird bei den transgenen Vorhofpräparaten durch die potente Hemmung der Proteinkinase A mit folgend negativ inotropen Effekt überdeckt.

5.3.4 W7

W7 wurde 1978 erstmalig synthetisiert und ist eine organisch-chemische Verbindung, abgeleitet vom Naphthalin.

Es dient als Calmodulin-Antagonist und hemmt dementsprechend Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängige Phosphodiesterasen (IC 50 = 28 μM) sowie Myosin-Leichtkettenkinasen (IC 50 = 51 μM) (Asano et al., 1989). Für die Erforschung der Biochemie von Zellen war es von großer Bedeutung. Innerhalb der Zellen von Eukaryoten bindet W7 Calcium und transportiert es aus den Zellen. Demzufolge wird die Bildung des Calcium-Calmodulin (CaM)-Komplexes verhindert, der im

Metabolismus zur Aktivierung vieler Enzyme benötigt wird (Frederick et al., 1990). Bei höheren Konzentrationen kann W7 als Calmodulin-Antagonist somit die Zellteilung verhindern (Hidaka et al., 1981).

In der Literatur finden sich vergleichbar mit unseren Versuchen weitere Tiermodelle, in denen Effekte durch W7 untersucht wurden. Ein inotroper Effekt durch steigende Phosphorylierung von Myosinleichtketten (MLC-II) durch Myosinleichtkettenkinasen (MLCK) wurde an linken Ventrikel von Ratten beobachtet. Durch Hemmung der Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängigen Myosinleichtkettenkinasen mit W7 konnte der inotrope Effekt um ca. 35 % reduziert werden (Riiese et al., 2008).

An isolierten Kaninchenherzen wurden die Auswirkungen der Hemmung des Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII)-Signalwegs auf die ventrikuläre Leitung untersucht. Zunächst wurde KN 93 verwendet, ein selektiver Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängiger Proteinkinase-II-Inhibitor, der in die Regulierung der glatten Muskelkontraktilität involviert ist (Li et al., 2013). Hierunter kam es zu einer deutlichen und ungleichmäßigen Verlangsamung der ventrikulären Leitung, insbesondere rechtsventrikulär. Demnach deprimiert die CaMKII-Blockade die ventrikuläre Erregbarkeit und ist potenziell proarrhythmisch. Die Versuchsreihe an den isolierten Kaninchenherzen wurde mit dem Calmodulin-Blocker W7 wiederholt. Unter der Zugabe von W7 kam es, wie bereits bei KN93, zu einer deutlichen Verlangsamung der ventrikulären Leitung, die am rechten Ventrikel ausgeprägter war als am linken Ventrikel. Die Übereinstimmung zwischen den Effekten von W7 und KN93 deuten stark darauf hin, dass beide Effekte auf die Blockierung des Calmodulin/CaMKII-Weges zurückzuführen sind. (Warren und Zaitsev, 2017).

Inwieweit W7 Auswirkungen auf arrhythmogene Effekte hat, wurde in einem Kaninchen-Tiermodell untersucht. In diesem speziellen Tiermodell zeigten alle Kaninchen Arrhythmien – AV Block I, long-QT-Episoden und Episoden mit ventrikulären Tachykardien bzw. Fibrillationen. Diese Kaninchen wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine auffällige Hyperphosphorylierung durch die Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, eine ausgeprägte Phospholamban-Dephosphorylierung und eine erhöhte Konzentration der Proteinphosphatasen 1 und 2A auf. Durch Infusion des Calmodulin-Antagonisten W7 wurde die Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II und damit die Hyperphosphorylierung gehemmt, wodurch die ventrikulären Tachykardien bzw. Fibrillationen unterdrückt und die linksventrikuläre Dysfunktion verbessert werden konnte (Tsuli et al., 2011).

In unseren Versuchen wurde dem Organbad nach erfolgter Dimaprit-KWK 50 μM von dem Calmodulin-Antagonisten W7 hinzugefügt. An den linken TG-Vorhofpräparaten ließ sich ein

negativ inotroper Effekt beobachten. Bei den Wildtyp-Mäusen kam es, wie zuvor bei den Präparaten nach Zugabe von H89, zu einer positiv inotropen Reaktion unter W7. Die Zugabe von W7 führte an den rechten TG- und WT-Vorhofpräparaten zu einem negativ chronotropen Effekt. Eine Beeinflussung der Arrhythmien konnte hier nicht nachgewiesen werden.

Für die beobachteten Effekte können verschiedene Erklärungsansätze herangezogen werden. An den linken TG-Vorhofpräparaten kam es durch die erhöhte Konzentration des Histamin-Analogons Dimaprit zunächst zu einer positiv inotropen Reaktion.

Phospholamban (PLB) ist ein kleines integrales Membranprotein des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) des Herzmuskels, das mit der SR Ca^{2+} -Pumpe (SERCA) interagiert und die Ca^{2+} -Pumpenaktivität hemmt, während es in der dephosphorylierten Form vorliegt. Es wurden drei Stellen der Ser/Thr-Phosphorylierung in der primären Sequenz von Phospholamban identifiziert, und zwar bei Ser-10, Ser-16 und Thr-17. In-vitro-Untersuchungen weisen darauf hin, dass diese durch PKC (Ser-10), PKA, PKG oder PKC (Ser-16) und CaM-Kinase II (Thr-17) phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung von Ser-16 (oder Thr-17) erhöht die Affinität der SR Ca^{2+} -Pumpe für Ca^{2+} und geht damit mit einer Zunahme der Ca^{2+} -Pumpaktivität einher (Coyle, 1998).

PLB ist daher ein kritischer Regulator der SR-Funktion, der myokardialen Relaxation und der myokardialen Kontraktilität. An in „Langendorff“ perfundierten Herzen von Wistar-Ratten verringerte die spezifische Hemmung von CaMKII durch KN93 die Thr(17)-Phosphorylierung signifikant. Diese Abnahme war mit einer Beeinträchtigung der myokardialen Relaxation verbunden (Mattiuzzi et al., 2004).

Die Hemmung der Calmodulin-abhängigen Kinase durch W7 führt demnach zu einer geringeren Phosphorylierung von Thr17, sodass die Calciumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum verringert wird und weniger Calcium-Ionen für weitere Kontraktionen zur Verfügung stehen.

Die Hemmung der Phosphorylierung von Ser-16, Ser-10 und Thr-17 könnte ebenso ursächlich für den negativ chronotropen Effekt an den transgenen rechten Vorhofpräparaten unter Zugabe von W7 nach erfolgter Dimaprit-KWK sein. Eventuell hat W7 als Hemmer von Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängigen Adenylatcyclasen Einfluss auf den cAMP-Gehalt und führt somit zu einer erniedrigten cAMP-Konzentration (Gao und Raj, 2001; Yaniv et al., 2013).

W7 führte an den rechten Vorhofpräparaten von TG und WT zu keiner Veränderung der bestehenden Arrhythmien. Die Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängigen Prozesse scheinen demnach keinen relevanten Einfluss auf bestehende Arrhythmien zu haben. Gegebenenfalls ist die cAMP-Konzentration aufgrund der vorhergehenden Stimulation durch Dimaprit in den Transgenen so

stark erhöht, dass die Zugabe von W7 als Calmodulin-Antagonist als Einflussfaktor zu gering ist, um eine Rückbildung der Arrhythmien zu bewirken.

In Versuchen an L-MAT-Zellen hemmte W7 als Antagonist des calciumabhängigen Calmodulins die Induktion der Apoptose durch TCDD und unterdrückte zudem die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c in das Zytosol (Kobayashi et al., 2009; Liu et al., 2014).

In einer weiteren Studie, durchgeführt an PC12-Zelle, wurde der Einfluss von intrazellulärem Ca^{2+} und Calmodulin auf die Neurotoxizität von Oxysterin-7-Ketocholesterin im Zusammenhang mit dem durch Mitochondrien vermittelten Zelltodprozess und oxidativem Stress untersucht. Auch hier verhinderte W7 die 7-Ketocholesterin-induzierte mitochondriale Schädigung, die zur Caspase-3-Aktivierung und letztlich zum Zelltod führte (Lee et al., 2007).

Intrazelluläres Calcium wie auch Calmodulin, sowie W7 als dessen Antagonist, sind demnach an dem Pathomechanismus der Toxizität von Zellen beteiligt. Dies sollte als Einflussfaktor hinsichtlich der Ergebnisse berücksichtigt werden und erschwert unter Umständen die Interpretation der Ergebnisse.

5.3.5 SQ22536

SQ22536 hemmt nicht-kompetitiv die Adenylatcyclase ($\text{IC}_{50} = 1,4 \mu\text{M}$), sodass nachfolgend die Katecholamin-stimulierte cAMP-Produktion reduziert wird.

Zu dem Spektrum der Adenylatcyclasen des Menschen zählen insgesamt zehn verschiedene Isoenzyme, die als AC_1 bis AC_{10} (oder auch AC I bis AC X) bezeichnet werden. Davon sind der Großteil, AC_1 bis AC_9 , membranständige Proteine; nur das Isoenzym AC_{10} ist ein cytosolisches Protein (Zippin et al., 2003). Die Adenylatcyclasen $\text{AC}_{5,6,7,9}$ kommen beim Menschen im Herzen vor (Tang und Hurley, 1998).

Einer der ersten entwickelten Membran-permeablen AC-Inhibitoren ist SQ22536. Anhand der IC_{50} -Werte ist bei SQ22536 eine AC_5 -Selektivität anzunehmen. Die Adenylatcyclasen AC_5 und AC_6 weisen eine enge strukturelle Ähnlichkeit auf, die IC_{50} -Werte von AC_6 unterscheiden sich jedoch deutlich von AC_5 . Aufgrund der geringen Potenz von SQ22536 ist es schwierig, für alle membranösen AC-Isoformen vollständig gesättigte Inhibitionskurven zu erhalten. (Seifert et al., 2011).

In der Literatur finden sich nur wenige Publikationen, die mit dem Wirkstoff SQ22536 in Bezug auf Veränderungen der Inotropie, Chronotropie und Arrhythmien gearbeitet haben. In

Versuchen an Blutplättchen konnte gezeigt werden, dass durch SQ22536 der PGE1-stimulierte Anstieg der cAMP-Konzentration gehemmt wurde (Harris et al., 1979).

An isolierten Lungenvenen neugeborener Lämmer wurden die Effekte der Adenylatcyclase-Hemmung auf die Isoproterenol-induzierte Relaxation untersucht. Dabei wurde die Isoproterenol-induzierte cAMP-Erhöhung in Venen, die durch Endothelin-1 oder U46619 verengt waren, durch SQ22536 inhibiert. Die Isoproterenol-induzierte Relaxation wurde durch SQ22536 hingegen nicht aufgehoben (Gao und Ray, 2002). Im Gegensatz dazu ließ sich jedoch die Isoprenalin-induzierte Relaxation in Aortenringen von drei und neun Wochen alten Ratten durch SQ22536 verhindern (López-Canales et al., 2018).

Vor Beginn unserer Versuchsreihe wurde die These aufgestellt, dass die induzierten Arrhythmien durch Zugabe des Adenylatcyclase-Hemmers SQ22536 sistieren. Nach Zugabe von SQ22536 in das Organbad der rechten TG-Vorhofpräparate blieben jedoch sowohl die basal aufgetretenen als auch die induzierten Arrhythmien unter Dimaprit bestehen. Teilweise konnte an den transgenen rechten Vorhofpräparaten eine deutliche Progredienz der Arrhythmien durch SQ22536 beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Antagonisten W7 und H89 führte SQ22536 zu keiner Frequenzveränderung an den rechten Vorhofpräparaten von TG und WT. An den linken Vorhofpräparaten der transgenen und Wildtyp-Mäuse wurde unter SQ22536 ein negativ inotroper Effekt beobachtet.

Durch Hemmung der Adenylatcyclase sinkt die zuvor durch Dimaprit erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentration in den linken TG-Vorhofpräparaten, die zur Aktivierung der Proteinkinase A und letztendlich für die Kontraktilität notwendig ist, sodass es zu einem negativ inotropen Effekt kommt. In den linken WT-Vorhofpräparaten könnte dieser Mechanismus auch ohne überexprimierten H₂-Rezeptor eine Rolle spielen und durch Hemmung der Adenylatcyclase zu einem sinkenden cAMP-Spiegel mit negativ inotropen Effekt führen.

Für die progredienten Arrhythmien unter der Gabe von SQ22536 können unterschiedliche Erklärungsansätze in Betracht gezogen werden. Durch die erniedrigte cAMP-Konzentration fehlt den HCN-Kanälen cAMP als Ligand, sodass die Depolarisation unterdrückt wird und in Folge dessen Bradyarrhythmien auftreten können. Zudem wäre es möglich, dass SQ22536 Einfluss auf weitere Kanäle, wie z.B. Calcium- oder Kalium-Kanäle nimmt.

In der Literatur finden sich bereits Publikationen, in denen SQ22536 zu Effekten an verschiedenen Kanälen, u.a. Calcium- und Kalium-Kanäle, führt. In Versuchen mit spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanäle (VGCCs) menschlicher Herzfibroblasten (HCFs) und

Myofibroblasten (HCMFs) wurden die Auswirkungen von Stickstoffmonoxid (NO) auf die Apoptose und die beteiligten Calcium-Kanäle (vor allem CaV 1,2 (L-Typ) und CaV 3,3 (T-Typ)) untersucht. S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP, ein NO-Donor) hemmte die L-Typ-Ca²⁺-Kanäle und induzierte apoptotische Veränderungen. Die Vorbehandlung der Zellen mit SQ22536 blockierte hingegen die SNAP-induzierte Hemmung der L-Typ-Ca²⁺-Kanäle (Bae et al., 2020).

HCN-Kanäle sind Herzschrittmacherkanäle, die die Herzfrequenz und den neuronalen Rhythmus in spontan aktiven Herz- und Nervenzellen regulieren. Die Cajal-Zellen des Gastrointestinaltraktes sind ebenfalls spontan aktive Schrittmacherzellen, an denen die Existenz des HCN-Kanals und seine Rolle bei der Schrittmacheraktivität untersucht wurde. SQ22536 verminderte dabei spontane Ca²⁺-Oszillationen und verringerte die Häufigkeit von Schrittmacherpotentialen. Letztendlich werden die HCN-Kanäle durch die basale cAMP-Produktion tonisch aktiviert und sind an der Regulation der Schrittmacheraktivität beteiligt (Shahi et al., 2014).

Des Weiteren wurde der Mechanismus der Adenosin-induzierten Vasodilatation in Koronararteriolen von Patienten mit Herzerkrankungen untersucht. Eine Hemmung der Adenylatcyclase mit SQ22536 führte dabei zu einer signifikanten Abschwächung der Vasodilatation der Koronararteriolen. Es ließ sich zeigen, dass das Adenosin-Endothel die Koronararteriolen von Patienten mit Herzerkrankungen durch einen rezeptorvermittelten Mechanismus dilatiert, der die Aktivierung von K(Ca)-Kanälen mit mittlerer Leitfähigkeit über einen AC-Signalweg beinhaltet (Sato et al., 2005).

An den Koronararterien von Kaninchen (<100 µm) wurde zudem die Wirkung von Adenosin auf die Ba²⁺-sensitiven K_(IR)-Kanäle in den glatten Muskelzellen untersucht. Die K_(IR)-Ströme wurden durch Adenosin konzentrationsabhängig erhöht. SQ22536 als Inhibitor der Adenylatcyclase führte in den Versuchen zu einer Hemmung der Adenosin-induzierten Stimulation des K_(IR)-Stroms; Inhibitoren der zyklischen AMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) erbrachten den gleichen Effekt. Demnach ist anzunehmen, dass Adenosin den K_(IR)-Strom durch Aktivierung der PKA in den kleinen Koronararterien von Kaninchen erhöht (Son et al., 2005).

Proteinkinasen, insbesondere die Proteinkinase A, werden durch cAMP aktiviert und bedingen durch Phosphorylierung von zellulären Proteinen verschiedene Mechanismen. Die Phosphorylierung von Ca²⁺-Kanälen führt zu deren Öffnung.

Die Calcium-Kanäle vom L-Typ im Herzen bestehen aus vier verschiedenen Polypeptid-Untereinheiten. In kardialen Myozyten gelangt Calcium aus dem extrazellulären Raum

hauptsächlich durch Calcium-Kanäle vom L-Typ in das Zellzytoplasma. Die Calcium-Kanäle des L-Typs sind für die Aktivierung der Kanäle des sarkoplasmatischen Retikulums (RyR2) und die Erzeugung der Muskelkontraktionskraft im Herzen verantwortlich. Um die Aktivität des Calcium-Kanals vom L-Typ zu verändern, spielt die Phosphorylierung von kanalbildenden Untereinheiten durch verschiedene Kinasen eine wichtige Rolle. Darüber hinaus hängt die Aktivität der L-Typ Calcium-Kanäle von der Calcium-Konzentration im Zytoplasma ab. Begünstigt wird dies durch den Einstrom von Calcium in die Myozyten, welcher durch die Phosphorylierung der Calcium-Kanäle vom L-Typ und die intrazelluläre Calcium-Konzentration reguliert wird (Treinys und Jrevicius, 2008).

Die funktionellen Auswirkungen der Phosphorylierung des kardialen Ryanodin-Rezeptors durch Proteinkinase A werden in Studien kontrovers diskutiert. In ventrikulären Myozyten des Kaninchens wurde der funktionelle Zusammenhang zwischen dem PKA-vermittelten RyR2-Phosphorylierungsgrad und der Ca^{2+} -Freisetzung des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die RyR2-Phosphorylierung durch PKA einen komplexen Effekt auf die Ca^{2+} -Freisetzung des SR in ventrikulären Myozyten ausübt. Bei einem mittleren Grad der RyR2-Phosphorylierung war die Ca^{2+} -Freisetzung minimal, wohingegen eine vollständige Dephosphorylierung und maximale Phosphorylierung von RyR2 die Ca^{2+} -Freisetzung des sarkoplasmatischen Retikulums deutlich erhöhte (Bovo et al., 2017).

Eine abnorme Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum kann zu einer kontraktile Dysfunktion und bei der Arrhythmogenese im Rahmen einer Herzinsuffizienz beitragen. An einem weiteren Kaninchen-Modell konnte mithilfe der Myozyten von Tieren mit Herzinsuffizienz gezeigt werden, dass die CaMKII-abhängige Phosphorylierung von RyR2 an einer erhöhten diastolischen Calcium-Freisetzung des SR und einer verringerten Calcium-Belastung des SR bei einer Herzinsuffizienz beteiligt ist. Dies kann somit zu Arrhythmien und einer kontraktile Dysfunktion im Rahmen einer Herzinsuffizienz führen (Ai et al., 2005).

5.4 Fazit

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit mit dem verwendeten Mausmodell gezeigt werden, dass Histamin und sein Analogon Dimaprit über H_2 -Rezeptoren einen positiv inotropen und chronotropen Effekt an den linken bzw. rechten Vorhofpräparaten der transgenen Mäuse bewirkte. Demgegenüber konnten an den linken und rechten Vorhofpräparaten der Wildtyp-Mäuse keine Veränderung der Schlagfrequenz und -kraft gemessen werden. Dieses Mausmodell, in dem die transgenen Mäuse menschliche H_2 -Rezeptoren im Herzen überexprimieren, kann demnach für zukünftige Experimente verwendet werden, um die Signalwege und Wirkungen des H_2 -Rezeptors und die zugrunde liegenden Mechanismen analysieren zu können.

Der positiv inotrope und chronotrope Effekt durch Histamin an isolierten transgenen Maus-Vorhofpräparaten „in vitro“ konnte zudem im „in vivo“-Modell mittels Echokardiografie nachgewiesen werden.

Histamin und Dimaprit führten an den transgenen rechten Vorhofpräparaten zu einem verstärkten Auftreten von Arrhythmien. Die Arrhythmien manifestierten sich hauptsächlich als Bi- und Trigemini und konnten sowohl in frühe als auch in späte Nachdepolarisationen differenziert werden. Cimetidin als H_2 -Rezeptor-Antagonist hemmte den Kraft- und Frequenzanstieg der Präparate durch Dimaprit und führte zum Sistieren der induzierten Arrhythmien.

Ein antiarrhythmogener Effekt durch die Stoffe H89, W7 und SQ22356 konnte in unseren Versuchen nicht nachgewiesen werden. Hier sind zum näheren Verständnis weitere Versuche mit eventuell anderen spezifischeren Hemmstoffen notwendig.

Compound 48/80 führte an den linken Vorhofpräparaten von transgenen und Wildtyp-Mäusen bei ausreichend hoher Konzentration im Organbad zu einem positiv inotropen Effekt. Dieser positiv inotrope Effekt durch Compound 48/80 wurde bei den transgenen linken Vorhofpräparaten durch vorherige Zugabe von Cimetidin deutlich abgeschwächt. An den rechten Vorhofpräparaten von transgenen und Wildtyp-Mäusen führte Compound 48/80 zu einer kardiotoxischen Reaktion.

5.5 Ausblick der Ergebnisse

Histamin-Rezeptoren und im Speziellen der H₂-Rezeptor finden in der Erforschung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, hinsichtlich derer Ursachen, Vorbeugung und Therapien, große Beachtung. Neben den kardialen Erkrankungen stehen auch psychiatrische Erkrankungen, wie Depressionen, oder die oftmals fulminant verlaufende Sepsis im Fokus der aktuellen Forschungen hinsichtlich des Zusammenhangs mit Histamin und den Histamin-Rezeptoren.

Besonders bei Patienten mit Arrhythmien sind die H₂-Rezeptoren von besonderem Interesse. Ätiologisch liegen dem Auftreten von Arrhythmien verschiedene Pathomechanismen zu Grunde. Die Höhe des Histamin-Plasmaspiegels scheint jedoch mit dem Auftreten von Arrhythmien zu korrelieren (Rei et al., 1976). Mit Hilfe unseres Mausmodells konnte gezeigt werden, dass Histamin und sein Analogon Dimaprit über den H₂-Rezeptor Arrhythmien induzieren. Die durch Histamin bzw. Dimaprit induzierten Arrhythmien sowie basal aufgetretene Arrhythmien waren durch den H₂-Rezeptor-Antagonist Cimetidin hemmbar. Die Blockade von H₂-Rezeptoren könnte dementsprechend eine wichtige Rolle in der Therapie von Arrhythmien einnehmen, wenn Standard-Antiarrhythmika wirkungslos bleiben.

Da Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Erkrankungen weltweit gehören, ist das Verständnis und die genaue Funktionsweise des kardialen H₂-Rezeptors in Bezug auf erwünschte, unerwünschte und Wechselwirkungen von Medikamenten unabdinglich.

Dass Histamin sowohl spezies- als auch konzentrationsabhängig kardiale und vaskuläre Veränderungen bedingt, ist bereits seit vielen Jahren bekannt. Um die Mechanismen wie Histamin am Herzen wirkt besser beurteilen zu können, müssen die unterschiedlichen Histamin-Rezeptoren differenziert voneinander betrachtet werden. Kenntnisse über die Histamin-Rezeptorfunktionen am Herzen können letztendlich dafür genutzt werden, deren Einfluss auf Krankheiten, deren Entstehung und Behandlungsoptionen, sinnvoll zu nutzen. Das verwendete Mausmodell in dieser Arbeit bietet die Möglichkeit, die Signalwege des menschlichen H₂-Rezeptors am Herzen genauer zu erforschen. Bei der Analyse der hier durchgeführten Experimente haben sich weitere Fragen ergeben, die in zukünftigen Arbeiten untersucht werden sollten:

- Kann die Lokalisation der überexprimierten H₂-Rezeptoren in der Maus genau bestimmt werden?
- In welcher Menge exprimiert die transgene Maus den H₂-Rezeptor?
- Ist der Signalweg der überexprimierten humanen H₂-Rezeptoren in den Mäusen identisch zu dem Signalweg im menschlichen Herzen? Sind ggf. weitere Signalwege bei der Maus mit von Bedeutung?
- Sind in den Vorhöfen und im Ventrikel die gleichen Signalwege von Bedeutung?
- Was passiert bei den transgenen Mäusen unter Belastung, wenn z.B. eine Herzinsuffizienz, Ischämie oder Arteriosklerose induziert wird? Können die transgenen Mäuse diese Veränderungen besser kompensieren oder neigen sie eher zu kardialen Komplikationen?

Weitere Versuche sind bereits in Kooperation mit einer Arbeitsgruppe in Hamburg geplant. Transgene und Wildtyp-Mäuse sollen dabei mit einem EKG-Telemetrie-Transmitter ausgestattet werden, um spontane Arrhythmien unter normalen Haltungsbedingungen aufzeichnen und analysieren zu können.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die kardialen Effekte des menschlichen H₂-Rezeptors am Herzen zu charakterisieren, insbesondere hinsichtlich des Auftretens von Arrhythmien. Hierfür war ein Tiermodell notwendig, mit dem der humane H₂-Rezeptor am Herzen isoliert untersucht werden konnte. Ein transgenes Mausmodell wurde entwickelt, welches den humanen H₂-Rezeptor herzspezifisch überexprimiert in transgenen Mäusen (TG). Als Vergleich dienten Wildtyp-Mäuse (WT), die keinen funktionell nachweisbaren H₂-Rezeptor am Herzen besitzen.

In vitro wurden stimulierte linke und spontan kontrahierende rechte Vorhofpräparate von TG und WT unter isometrischen Bedingungen isoliert im Organbad untersucht. In vivo erfolgte an narkotisierten TG und WT eine transthorakale Echokardiografie zusammen mit einer EKG-Ableitung.

Unter basalen Bedingungen in vitro zeigten die Vorhofpräparate von TG im Vergleich zu WT eine erhöhte Kontraktionskraft und Schlagfrequenz. Histamin und Dimaprit führten als Agonisten am H₂-Rezeptor bei TG konzentrationsabhängig zu einem positiv inotropen und chronotropen Effekt. Zudem ließen sich bei den rechten TG-Vorhofpräparaten spontane und konzentrationsabhängig induzierte Arrhythmien durch Histamin und Dimaprit nachweisen. Der H₂-Rezeptor-Antagonist Cimetidin konnte die spontanen und induzierten Arrhythmien supprimieren; die Arrhythmien waren demnach H₂-Rezeptor-vermittelt. Zudem inhibierte Cimetidin den positiv inotropen und chronotropen Effekt von Dimaprit und Histamin an TG. Die Hemmung der Adenylatcyclase sorgte wiederum für einen proarrhythmogenen Effekt an den rechten TG-Vorhofpräparaten. Mit Hilfe von Compound 48/80 konnte gezeigt werden, dass in den TG-Vorhofpräparaten Histamin-Speicher funktionell existieren. An den rechten Vorhofpräparaten von TG und WT führte Compound 48/80 zudem zu einem proarrhythmischen Effekt, der zumeist in einer Bradyarrhythmie bzw. Asystolie endete. In vivo zeigten sich wie schon in vitro bei TG unter basalen Bedingungen erhöhte Ausgangswerte der Ejektionsfraktion (EF) und Herzfrequenz (HF) im Vergleich zu WT. Histamin bedingte bei TG einen relevanten Anstieg der EF und HF, sodass hier funktionelle H₂-Rezeptoren in vivo nachweisbar waren.

Zusammenfassend konnte der humane kardiale H₂-Rezeptor, insbesondere seine Rolle bei der Genese von Arrhythmien, näher charakterisiert werden. Dennoch bleiben Fragen hinsichtlich des Pathomechanismus bzw. der Rezeptor-Signalwege offen, sodass weitere Experimente notwendig sind, um H₂-Rezeptor-Antagonisten letztendlich als möglichen Therapieansatz in Erwägung zu ziehen.

7 Literaturverzeichnis

Abramo F, Pirone A, Lenzi C, Valle MF, Vidali S, Vannozzi L, Miragliotta V. Development of a short-term canine full-thickness skin organ culture method under serum-free conditions. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 2016; 11(2), 61-69.

Ackermann D. Über den bakteriellen Abbau des Histidins. *Zeitschrift für physiol. Chemie*. 1910; 65: 504-510.

Agata N, Kato Y, Namekata I, Takahara A, Tanaka H, Chino D, Koike K, Tanaka Y. H₂-receptor-mediated positive inotropic effect of histamine in neonatal guinea-pig left atria. *Biol Pharm Bull*. 2010; 33(12):2033-5.

Ahnefeld FW, Barth J. Akuttherapie anaphylaktoider Reaktionen. *Der Anaesthesist* volume 43. 1994; 211–222.

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. *Circ Res*. 2005 Dec; 97(12):1314-22.

Almeida DO, Ferreira HS, Pereira LB, Fregoneze JB. Hypertensive response to stress: The role of histaminergic H₁ and H₂ receptors in the medial amygdala. 2015. *Physiol Behav* 144:95–102.

Appl H, Holzammer T, Dove S, Haen E, Strasser A, Seifert R. Interactions of recombinant human histamine H₁R, H₂R, H₃R, and H₄R receptors with 34 antidepressants and antipsychotics. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2012 Feb; 385(2):145-70.

Asano M. Divergent pharmacological effects of three calmodulin antagonists, N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7), chlorpromazine and calmidazolium, on isometric tension development and myosin light chain phosphorylation in intact bovine tracheal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989 Nov; 251(2):764-73.

Asanuma H, Minamino T, Ogai A, Kim J, Asakura M, Komamura K, Sanada S, Fujita M, Hirata A, Wakeno M, Tsukamoto O, Shinozaki Y, Myoishi M, Takashima S, Tomoike H, Kitakaze M. Blockade of histamine H₂ receptors protects the heart against ischemia and reperfusion injury in dogs. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 May; 40(5):666-74.

Athavale A, Athavale T, Roberts DM. Antiemetic drugs: what to prescribe and when. *Aust Prescr*. 2020. Apr;43(2):49-56.

Bae H, Kim T, Lim I. Effects of nitric oxide on apoptosis and voltage-gated calcium channels in human cardiac myofibroblasts. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2020 Jan; 47(1):16-26.

Baller D, Huchzermeyer H. Histamine effects on the heart with special reference to cardiac side effects of H₂ receptor antagonists. *Klin Wochenschr*. 1989 Aug 1; 67(15):743-55.

Baumann G, Schrader J, Gerlach E. Inhibitory action of adenosine on histamine- and dopamine-stimulated cardiac contractility and adenylate cyclase in guinea pigs. *Circ Res*. 1981a Feb; 48(2):259-66.

Baumann G, Felix SB, Schrader J, Heidecke CD, Riess G, Erhardt WD, Ludwig L, Loher U, Sebening F, Blömer H. Cardiac contractile and metabolic effects mediated via the myocardial H₂-receptor adenylate cyclase system. Characterization of two new specific H₂-receptor agonists, impromidine and dimaprit, in the guinea pig and human myocardium. *Res Exp Med (Berl)*. 1981b; 179(1):81-98.

- Baumann G, Felix SB, Riess G, Loher U, Ludwig L, Blömer H. Effective stimulation of cardiac contractility and myocardial metabolism by impromidine and dimaprit--two new H₂-agonistic compounds-in the surviving, catecholamine-insensitive myocardium after coronary occlusion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1982 Jul-Aug; 4(4):542-53.
- Baumann G, Mercader D, Busch U, Felix SB, Loher U, Ludwig L, Sebening H, Heidecke CD, Hagl S, Sebening F, Blömer H. Effects of the H₂-receptor agonist impromidine in human myocardium from patients with heart failure due to mitral and aortic valve disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1983 Jul-Aug; 5(4):618-25.
- Baumann G, Felix SB, Heidecke CD, Riess G, Loher U, Ludwig L, Blömer H. Apparent superiority of H₂-receptor stimulation and simultaneous beta-blockade over conventional treatment with beta-sympathomimetic drugs in post-acute myocardial infarction: cardiac effects of impromidine - a new specific H₂-receptor agonist-in the surviving catecholamine-insensitive myocardium. *Agents Actions.* 1984 Oct; 15(3-4):216-28.
- Bers DM. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol.* 2008; 70:23-49.
- Best CH, Dale HH, Dudley HW, Thorpe WV. The nature of the vaso-dilator constituents of certain tissue extracts. *J Physiol.* 1927 Mar 15; 62(4):397-417.
- Black JW, Duncan WAM, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons ME. Definition and antagonism of histamine H₂ receptors. In: *Nature.* Band 236, 1972, S. 385–390 Akdis CA, Simons FE. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *Eur J Pharmacol.* 2006 Mar 8; 533(1-3):69-76.
- Bovo E, Huke S, Blatter LA, Zima AV. The effect of PKA-mediated phosphorylation of ryanodine receptor on SR Ca²⁺ leak in ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2017 Mar; 104:9-16.
- Boyce MJ, Owen DAA, Wareham K. Modification of cardiovascular effects of histamine infusions in man by chlorpheniramine and cimetidine. *Proceeding of the B.P.S.* 9th-11th April 1980. 110P.
- Brabet P, Dumuis A, Sebben M, Pantaloni C, Bockaert J, Homburger V. Immunocytochemical localization of the guanine nucleotide-binding protein G_o in primary cultures of neuronal and glial cells. *The Journal of Neuroscience.* 1988 Feb; 8(2):701-8.
- Brandes LJ, LaBella FS, Glavin GB, Paraskevas F, Saxena SP, McNicol A, Gerrard JM. Histamine as an intracellular messenger. *Biochem Pharmacol.* 1990 Oct 15; 40(8):1677-81. Review.
- Brandes LJ, Queen GM, LaBella FS. Displacement of histamine from liver cells and cell components by ligands for cytochromes P450. *J Cell Biochem.* 2002; 85(4):820-4.
- Brattelid T, Qvigstad E, Lynham JA, Molenaar P, Aass H, Geiran O, Skomedal T, Osnes JB, Levy FO, Kaumann AJ. Functional serotonin 5-HT₄ receptors in porcine and human ventricular myocardium with increased 5-HT₄ mRNA in heart failure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004 Sep; 370(3):157-66.
- Bristow MR, Minobe WA, Billingham ME, Marmor JB, Johnson GA, Ishimoto BM, Sageman WS, Daniels JR. Anthracycline-associated cardiac and renal damage in rabbits. Evidence for mediation by vasoactive substances. *Lab Invest.* 1981 Aug; 45(2):157-68.
- Bronner C, Wiggins C, Monté D, Märki F, Capron A, Landry Y, Franson RC. Compound 48/80 is a potent inhibitor of phospholipase C and a dual modulator of phospholipase A₂ from human platelet. *Biochim Biophys Acta.* 1987 Aug 15; 920(3):301-5.

Byrne RD, Rosivatz E, Parsons M, Larijani B, Parker PJ, Ng T, Woscholski R. Differential activation of the PI 3-kinase effectors AKT/PKB and p70 S6 kinase by compound 48/80 is mediated by PKC α . *Cell Signal*. 2007 Feb; 19(2): 321-9. Epub 2006 Aug 30.

Cabeza JM, Acosta J, Alés E. Mechanisms of Granule Membrane Recapture following Exocytosis in Intact Mast Cells. *J Biol Chem*. 2013 Jul 12;288(28):20293-305.

Capurro N, Levi R. Anaphylaxis in the guinea-pig isolated heart: selective inhibition by burimamide of the positive inotropic and chronotropic effects of released histamine. *Br J Pharmacol*. 1973 Aug; 48(4):620-8.

Chan NY, Robador PA, Levi R. Natriuretic peptide-induced catecholamine release from cardiac sympathetic neurons: inhibition by histamine H₃ and H₄ receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 Dec; 343(3):568-77.

Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H. Inhibition of Forskolin-Induced Neurite Outgrowth and Protein Phosphorylation by a Newly Synthesized Selective Inhibitor of Cyclic AMP-dependent Protein Kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D Pheochromocytoma Cells. *J Biol Chem*. 1990 Mar 25; 265(9):5267-72.

Coyler J. Phosphorylation states of phospholamban. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 Sep 16;853:79-91.

Coruzzi G. Role of histamine H₄ receptors in the gastrointestinal tract. 2012. *Frontiers in Bioscience S4*:226–239.

Dai S. A study of the actions of histamine on the isolated rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1976 Jul-Aug; 3(4):359-67.

Dai S. Circulatory depression and ventricular arrhythmias induced by compound 48/80 in anaesthetized rats. *Agents Actions*. 1991 Nov; 34(3-4):316-23.

Dale HH, Laidlaw PP. The physiological action of beta-iminazolyethylamine. *J Physiol*. 1910 Dec 31;41(5):318-44.

Dumuis A, Sebben M, Bockaert J. Pharmacology of 5-hydroxytryptamine-1A receptors which inhibit cAMP production in hippocampal and cortical neurons in primary culture. *Molecular Pharmacology*. 1988 Feb; 33(2):178-86.

Fabbri E, Brighenti L, Ottolenghi C. Inhibition of adenylate cyclase of catfish and rat hepatocyte membranes by 9-(tetrahydro-2-furyl)adenine (SQ22536). *J Enzyme Inhib*. 1991; 5(2):87-98.

Fabiato A, Fabiato F. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol*. 1975 Aug; 249(3):469-95.

Felix SB, Baumann G, Hashemi T, Niemczyk M, Ahmad Z, Berdel WE. Characterization of cardiovascular events mediated by platelet activating factor during systemic anaphylaxis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990 Jun; 15(6):987-97.

Felix SB, Buschauer A, Baumann G. Therapeutic value of H₂-receptor stimulation in congestive heart failure. Hemodynamic effects of BU-E-76, BU-E-75 and arpromidine (BU-E-50) in comparison to impromidine. *Agents Actions Suppl*. 1991; 33:257-69.

Felix SB, Buschauer A, Baumann G. Haemodynamic profile of new H₂-receptor agonists in congestive heart failure. *Eur J Clin Invest*. 1995 Mar; 25 Suppl 1:42-6.

Flacke W, Atanacković D, Gillis RA, Alper MH. The actions of histamine on the mammalian heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 1967 Feb; 155(2):271-8.

Francis HL, Demorrow S, Franchitto A, Venter JK, Mancinelli RA, White MA, Meng F, Ueno Y, Carpino G, Renzi A, Baker KK, Shine HE, Francis TC, Gaudio E, Alpini GD, Onori P. Histamine stimulates the proliferation of small and large cholangiocytes by activation of both IP3/Ca²⁺ and cAMP-dependent signaling mechanisms. *Lab Invest.* 2012 Feb;92(2):282-94.

Frederick L. Crane, D. James Morre: Oxidoreduction at the Plasma Membrane: Relation to Growth and Transport, 1990; CRC Press.

Fühner H. Das Pituitrin und seine wirksamen Bestandteile. *Münchener Medizinische Wochenschrift* no 16. 1912; 852-3.

Gao Y, Raj JU. SQ22536 and W7 inhibit forskolin-induced cAMP elevation but not relaxation in newborn ovine pulmonary veins. *Eur J Pharmacol.* 2001 Apr 20; 418(1-2):111-6.

Gao Y, Raj JU. Effects of SQ22536, an adenylyl cyclase inhibitor, on isoproterenol-induced cyclic AMP elevation and relaxation in newborn ovine pulmonary veins. *Eur J Pharmacol.* 2002 Feb 2; 436(3):227-33.

Ganellin R. 1980 Award in Medicinal Chemistry: Medicinal chemistry and dynamic structure-activity analysis in the discovery of drugs acting at histamine H₂ receptors. *J Med Chem.* 1981 Aug; 24(8):913-20.

Genovese A, Gross SS, Sakuma I, Levi R. Adenosine promotes histamine H₁-mediated negative chronotropic and inotropic effects on human atrial myocardium. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988 Dec; 247(3):844-9.

Gergs U, Bernhardt G, Buchwalow IB, Edler H, Fröba J, Keller M, Kirchhefer U, Köhler F, Mißlinger N, Wache H, Neumann J. Initial Characterization of Transgenic Mice Overexpressing Human Histamine H₂ Receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* April 2019; 369:129–141.

Gergs U, Weisgut J, Griethe K, Mißlinger N, Kirchhefer U, Neumann J. Human histamine H₂ receptors can initiate cardiac arrhythmias in a transgenic mouse. 2021. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 394(9): 1963-1973.

Ginsburg R, Bristow MR, Stinson EB, Harrison DC. Histamine receptors in the human heart. *Life Sci.* 1980 Jun 30; 26(26):2245-9.

Ginsburg R, Bristow MR, Kantrowitz N, Baim DS, Harrison DC. Histamine provocation of clinical coronary artery spasm: implications concerning pathogenesis of variant angina pectoris. *Am Heart J.* 1981 Nov; 102(5):819-22.

Ginsburg R, Bristow MR, Davis K. Receptor mechanisms in the human epicardial coronary artery. Heterogeneous pharmacological response to histamine and carbachol. *Circ Res.* 1984a Sep; 55(3): 416-21.

Ginsburg R, Bristow MR, Davis K, Dibiase A, Billingham ME. Quantitative pharmacologic responses of normal and atherosclerotic isolated human epicardial coronary arteries. *Circulation.* 1984b Feb; 69(2):430-40.

Goodman and Gilman's - The pharmacological basis of therapeutics. 2018, 13th edition, chapter 39, page 711-725. Skidgel RA. Histamine, Bradykinin, and their antagonistst.

- Goren N, Perez Leiros C, Sterin-Borda L, Borda E. Effect of histamine in autoimmune myocarditis mice. *Int J Immunopharmacol.* 1994 Sep; 16(9):737-45.
- Goren N, Sterin-Borda L, Leiros CP, Borda ES. Increases in cyclic AMP levels couple to H₁ receptors in atria from autoimmune myocarditis mice. *Cell Signal.* 1995 Nov; 7(8):759-64.
- Graefe KH. *Pharmakologie und Toxikologie – Gewebshormone.* 2011. 112-121.
- Guy C. Issues in the clinical use of benzodiazepines: potency, withdrawal, and rebound. *J Clin Psychiatry.* 2004; 65 Suppl 5:7-12.
- Gyawali CP, Fass R. Management of Gastroesophageal Reflux Disease. *Gastroenterology.* 2018 Jan;154(2):302-318.
- Hagelüken A, Grünbaum L, Klinker JF, Nürnberg B, Harhammer R, Schultz G, Leschke C, Schunack W, Seifert R. Histamine receptor-dependent and/or -independent activation of guanine nucleotide-binding proteins by histamine and 2-substituted histamine derivatives in human leukemia (HL-60) and human erythroleukemia (HEL) cells. *Biochem Pharmacol.* 1995 Mar 30; 49(7):901-914.
- Harris DN, Asaad MM, Phillips MB, Goldenberg HJ, Antonaccio MJ. Inhibition of adenylate cyclase in human blood platelets by 9-substituted adenine derivatives. *J Cyclic Nucleotide Res.* 1979; 5(2):125-34.
- Hattori Y, Sakuma I, Kanno M. Differential effects of histamine mediated by histamine H₁- and H₂-receptors on contractility, spontaneous rate and cyclic nucleotides in the rabbit heart. *Eur J Pharmacol.* 1988 Aug 24; 153(2-3):221-9.
- Hattori Y, Endou M, Gando S, Kanno M. Identification and characterization of histamine H₁- and H₂-receptors in guinea-pig left atrial membranes by [3H]-mepyramine and [3H]-tiotidine binding. *Br J Pharmacol.* 1991a Jun; 103(2):1573-9.
- Hattori Y, Gando S, Endou M, Kanno M. Characterization of histamine receptors modulating inotropic and biochemical activities in rabbit left atria. *Eur J Pharmacol.* 1991b Apr 10; 196(1):29-36.
- He G, Hu J, Li T, Ma X, Meng J, Jia M, Lu J, Ohtsu H, Chen Z, Luo X. Arrhythmogenic effect of sympathetic histamine in mouse hearts subjected to acute ischemia. *Mol Med.* 2012 Feb 10;18:1-9. doi: 10.2119/molmed.2011.00225.
- Hidaka H, Sasaki Y, Tanaka T, Endo T, Ohno S, Fujii Y, Nagata T. N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calmodulin antagonist, inhibits cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Jul; 78(7):4354-7.
- Hidaka H, Asano M, Tanaka T. Activity-structure relationship of calmodulin antagonists, Naphthalenesulfonamide derivatives. *Mol Pharmacol.* 1981 Nov; 20(3):571-8.
- Hidaka H, Inagaki M, Kawamoto S, Sasaki Y. Isoquinolinesulfonamides, Novel and Potent Inhibitors of Cyclic Nucleotide Dependent Protein Kinase and Protein Kinase C. *Biochemistry.* 1984 Oct 9; 23(21):5036-41.
- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev.* 1997 Sep; 49(3):253-78.

- Hoppe LK, Muhlack DC, Koenig W, Carr PR, Brenner H, Schöttker B. Association of Abnormal Serum Potassium Levels with Arrhythmias and Cardiovascular Mortality: a Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2018 Apr; 32(2):197-212. doi: 10.1007/s10557-018-6783-0.
- Huang M, Pang X, Letourneau R, Boucher W, Theoharides TC. Acute stress induces cardiac mast cell activation and histamine release, effects that are increased in Apolipoprotein E knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2002 Jul; 55(1):150-60.
- Hunfeld NGM, Geus WP, Kuipers EJ. Systematic review: Rebound acid hypersecretion after therapy with proton pump inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Jan 1; 25(1):39-46.
- Jäger F, Versuche zur Verwendung des β -Imidazolyläthylamins in der Geburtshilfe. *Zentralblatt für Gynäkologie* 1913; 8: 265-269.
- Jeziorska M, McCollum C, Woolley DE. Mast cell distribution, activation, and phenotype in atherosclerotic lesions of human carotid arteries. *J Pathol.* 1997 May; 182(1):115-22.
- Jutel M, Akdis M, Akdis CA. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy.* 2009 Dec; 39(12):1786-800.
- Jørgensen EA, Knigge U, Warberg J, Kjaer A. Histamine and the regulation of body weight. *Neuroendocrinology.* 2007; 86(3):210-4.
- Kalinyak KA, Sawutz DG, Lampkin BC, Johnson CL, Whitsett JA. Effects of dimaprit on growth and differentiation of human promyelocytic cell line, HL-60. *Life Sci.* 1985 May 20; 36(20):1909-16.
- Kaumann AJ. Surprises from a cardiac 5-HT₄ TG mouse: spontaneous atrial arrhythmias by endogenous 5-HT of atrial origin? Different mechanism of arrhythmias through 5-HT₄ receptors and β -adrenoceptors? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 2013 Jan; Volume 386, pages 353–356.
- Kennedy S, Wu J, Wadsworth RM, Lawrence CE, Maffia P. Mast cells and vascular diseases. *Pharmacol Ther.* 2013 Apr; 138(1):53-65.
- Khaliulin I, Bond M, James AF, Dyar Z, Amini R, Johnson JL, Suleiman MS. Functional and cardioprotective effects of simultaneous and individual activation of protein kinase A and Epac. *Br J Pharmacol.* 2017; 174(6): 438-453.
- Kim J, Washio T, Yamagishi M, Yasumura Y, Nakatani S, Hashimura K, Hanatani A, Komamura K, Miyatake K, Kitamura S, Tomoike H, Kitakaze M. A novel data mining approach to the identification of effective drugs or combinations for targeted endpoints-application to chronic heart failure as a new form of evidence-based medicine. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2004 Nov; 18(6):483-9.
- Klein I, Levey GS. Activation of myocardial adenyl cyclase by histamine in guinea pig, cat, and human heart. *J Clin Invest.* 1971 May; 50(5):1012-5.
- Klock UW, Alfter K, Homann J, von Kügelen I, Molderings GJ. Cardiac mast cells: Implications for heart failure. *JACC.* 2007;49:1107.
- Kobayashi T, Inoue I, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Watanabe T. Cloning, RNA expression, and chromosomal location of a mouse histamine H₂ receptor gene. *Genomics.* 1996 Nov 1; 37(3):390-4.

- Kobayashi D, Ahmed S, Ishida M, Kasai S, Kikuchi H. Calcium/calmodulin signaling elicits release of cytochrome c during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced apoptosis in the human lymphoblastic T-cell line, L-MAT. *Toxicology*. 2009 Apr 5; 258(1):25-32.
- Kraus J, Schuler J, Hoppe UC, Hawranek T, Altenberger J. Der allergische Myokardinfarkt - Kounis-Syndrom. *Journal für Kardiologie - Austrian Journal of Cardiology*. 2012; 19 (5-6), 118-122.
- Kühn B, Schmid A, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. G proteins of the Gq family couple the H₂ histamine receptor to phospholipase C. *Mol Endocrinol*. 1996 Dec; 10(12):1697-707.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Bd. 227, 1970, S. 680–685.
- Lagunoff D, Martin TW, Read G. Agents that release histamine from mast cells. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1983; 23:331-51.
- Laher I, McNeill JH. Effects of histamine on rat isolated atria. *Can J Physiol Pharmacol*. 1980a Sep; 58(9):1114-6.
- Laine P, Kaartinen M, Penttilä A, Panula P, Paavonen T, Kovanen PT. Association between myocardial infarction and the mast cells in the adventitia of the infarct-related coronary artery. *Circulation*. 1999 Jan 26; 99(3):361-9.
- Leary PJ, Tedford RJ, Bluemke DA, Bristow MR, Heckbert SR, Kawut SM, Krieger EV, Lima JA, Masri CS, Ralph DD, Shea S, Weiss NS, Kronmal RA. Histamine H₂ Receptor Antagonists, Left Ventricular Morphology, and Heart Failure Risk: The MESA Study. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Apr 5; 67(13):1544-1552. doi: 10.1016/j.jacc.2016.01.045.
- Lee CS, Park WJ, Han ES, Bang H. Differential modulation of 7-ketocholesterol toxicity against PC12 cells by calmodulin antagonists and Ca²⁺ channel blockers. *Neurochem Res*. 2007 Jan; 32(1):87-98.
- Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R. Cyclic AMP signaling in cardiac myocytes. *Curr Opin Physiol*. 2018, 01:161–171.
- Leurs R, Traffort E, Arrang JM, Tardivel-Lacombe J, Ruat M, Schwartz JC. Guinea pig histamine H₁ receptor. II. Stable expression in Chinese hamster ovary cells reveals the interaction with three major signal transduction pathways. *J Neurochem*. 1994 Feb; 62(2):519-27.
- Levi R, Pappano AJ. Modification of the effects of histamine and norepinephrine on the sinoatrial node pacemaker by potassium and calcium. *J Pharmacol Exp Ther*. 1978 Mar; 204(3):625-33.
- Levi R, Kuye JO. Pharmacological characterization of cardiac histamine receptors: sensitivity to H₁-receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*. 1974 Aug; 27(3):330-8.
- Levi R, Malm JR, Bowman FO, Rosen MR. The arrhythmogenic actions of histamine on human atrial fibers. *Circ Res*. 1981 Aug; 49(2):545-50.
- Li B et al. Wntless-type mammary tumor virus integration site family, member 5A (Wnt5a) regulates human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope glycoprotein 120 (gp120)-induced expression of pro-inflammatory cytokines via the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathways. *Test* 288(19), 13610-13619, 2013.

Li D, Wen JF, Jin JY, Quan HX, Cho KW. Cardiac mast cells regulate myocyte ANP release via histamine H₂ receptor in beating rabbit atria. *Regul Pept.* 2009 Jun 5; 155(1-3):33-8.

Libby P, Bonow RO, Mann DL, Tomaselli GF, Bhatt D, Solomon SD, Braunwald E. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine.* 2-Volume Set. 12th edition. 2021.

Liu X, Callaerts-Vegh Z, Evans KL, Bond RA. 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. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002 Sep; 40(3):448-55.

Liu Y, Zhong X, Ding Y, Ren L, Bai T, Liu M, Liu Z, Guo Y, Guo Q, Zhang Y, Yang J, Zhang Y. Inhibition of voltage-dependent potassium channels mediates cAMP-potentiated insulin secretion in rat pancreatic β cells. *Islets.* 2017 Mar 4; 9(2):11-18.

Liu W, Zhao H, Wang Y, Jiang C, Xia P, Gu J, Liu X, Bian J, Yuan Y, Liu Z. Calcium-calmodulin signaling elicits mitochondrial dysfunction and the release of cytochrome c during cadmium-induced apoptosis in primary osteoblasts. *Toxicol Lett.* 2014 Jan 3; 224(1):1-6.

Lochner A, Molman Ja. The many faces of H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev.* 2006. 23(3-4):261-74.

López-Canales O, Castillo-Hernández MDC, Vargas-Robles H, Rios A, López-Canales J, Escalante B. Androgens Mediate β -adrenergic Vasorelaxation Impairment Using Adenylyl Cyclase. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2018 Mar; 71(3):147-154.

Lovenberg TW, Cubeddu LX. Monoamine release by compound 48/80 from nonmast cell compartments in mouse brain slices. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988 Nov; 247(2):562-8.

Mackins CJ, Kano S, Seyedi N, Schäfer U, Reid AC, Machida T, Silver RB, Levi R. Cardiac mast cell-derived renin promotes local angiotensin formation, norepinephrine release, and arrhythmias in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest.* 2006 Apr; 116(4):1063-70.

MacLeod KM, McNeill JH. The influence of altered thyroid hormone levels on guinea pig cardiac adrenoceptors and histamine receptors. *Can J Physiol Pharmacol.* 1981 Oct; 59(10):1039-49.

Magalhaes AC, Dunn H, Ferguson SS. Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins. *Br J Pharmacol.* 2012; 165(6):1717-1736.

Maintz L, Bieber T, Novak N. *Medizin - Die verschiedenen Gesichter der Histaminintoleranz.* 2006. *Deutsches Ärzteblatt* 103:3027–3033.

Mannaioni PF, Di Bello MG, Masini E. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res.* 1997 Jan; 46(1):4-18.

Marshall I. Characterization and distribution of histamine H₁- and H₂-receptors in precapillary vessels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 6 Suppl 4, 1984, S. S587–S597, PMID 6083401.

Marunaka Y, Niisato N. H89, an Inhibitor of Protein Kinase A (PKA), Stimulates Na⁺ Transport by Translocating an Epithelial Na⁺ Channel (ENaC) in Fetal Rat Alveolar Type II Epithelium. *Biochem Pharmacol.* 2003 Sep 15; 66(6):1083-9.

Matsuda N, Hattori Y, Sakuraya F, Kobayashi M, Zhang XH, Kemmotsu O, Gando S. Hemodynamic significance of histamine synthesis and histamine H₁- and H₂-receptor gene expression during endotoxemia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2002 Dec; 366(6):513-21.

- Matsuda N, Jesmin S, Takahashi Y, Hatta E, Kobayashi M, Matsuyama K, Kawakami N, Sakuma I, Gando S, Fukui H, Hattori Y, Levi R. Histamine H1 and H2 receptor gene and protein levels are differentially expressed in the hearts of rodents and humans. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 May; 309(2):786-95.
- Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Said M. Phosphorylation of phospholamban in ischemia-reperfusion injury: Functional role of Thr(17) residue. *Mol Cell Biochem*. 2004 Aug; 263(1):131-6.
- Meister J, Gergs U, Neumann J. Effects of dimaprit in H₂ receptor overexpressing mice (Abstract). 2014. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 397 (Suppl 1):S67.
- Meister J, Weisgut J, Gergs U, Neumann J. Human H₂ receptors in a mouse model and the endogenous cardiac histamine content (Abstract). 2015. *Acta Physiologica* 215:S705.
- Moss J, Rosow CE. Histamine release by narcotics and muscle relaxants in humans. *Anesthesiology*. 1983 Oct; 59(4):330-9.
- Mousli M, Bueb JL, Bronner C, Rouot B, Landry Y. G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *Trends Pharmacol Sci*. 1990 Sep; 11(9):358-62.
- Muldoon SM, Freas W, Mahla ME, Donlon MA. Plasma histamine and catecholamine levels during hypotension induced by morphine and compound 48/80. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1987 May; 9(5):578-83.
- Murray AJ. Pharmacological PKA Inhibition: All May Not Be What It Seems. *Sci Signal*. 2008 Jun 3; 1(22):re4.
- Neumann J, Meister J, Weisgut J, Künstler B, Gergs U (2015) Further characterization of H₂ overexpressing mice. *Inflamm Res* 64 (Suppl 1): S48.
- Neumann J, Grobe JM, Weisgut J, Schwelberger HG, Fogel WA, Marušáková M, Wache H, Bähre H, Buchwalow IB, Dhein S, Hofmann B, Kirchhefer U, Gergs U. Histamine can be Formed and Degraded in the Human and Mouse Heart. *Frontiers in Pharmacology*, 2021 May, 12:582916.
- Neumann J, Kirchhefer U, Dhein S, Hofmann B, Gergs U. The Roles of Cardiovascular H₂-Histamine Receptors Under Normal and Pathophysiological Conditions. *Frontiers in Pharmacology*, 2021 December 20; 12:732842.
- Niemegeers CJ, Awouters F, van Nueten, de Nollin S, Janssen PA. Protection of rats from compound 48/80-induced lethality. A simple test for inhibitors of mast cell-mediated shock. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1978 Jul; 234(1):164-76.
- Orr EL, Quay WB. The effects of castration on histamine levels and 24-hour rhythm in the male rat hypothalamus. *Endocrinology*. 1975 Aug; 97(2):481-4.
- Owen DA. The effects of histamine and some histamine-like agonists on blood pressure in the cat. *Br J Pharmacol*. 1975 Oct; 55(2):173-9.
- Ozen Y, Ozbay MB, Ertem AG, Yayla Ç. Serum Electrolyte Levels and Ventricular Arrhythmia. *Angiology*. 2019 Jan;70(1): 87-88. doi: 10.1177/0003319718794573. Epub 2018 Aug 16.

Panula P, Chazot PL, Cowart M, Gutzmer R, Leurs R, Liu WLS, Stark H, Thurmond RL, Haas HL. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. *Pharmacol Rev.* 2015 Jul;67(3):601-55.

Parsons ME, Ganellin CR. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147 Suppl 1:S127-35.

Patella V, Marinò I, Lampärter B, Arbustini E, Adt M, Marone G. Human heart mast cells. Isolation, purification, ultrastructure, and immunologic characterization. *J Immunol.* 1995 Mar 15; 154(6):2855-65.

Pertz HH, Elz S, Schunack W. Structure-activity relationship of histamine H₁-receptor agonists. *Mini-Rev Med Chem.* 4, 2004 Nov; 4(9):935-40.

Pflipsen MC, Vega Colon KM. Anaphylaxis: Recognition and Management. *Am Fam Physician.* 2020 Sep 15;102(6):355-362.

Pierpaoli S, Marzocca C, Bello MG, Schunack W, Mannaioni PF, Masini E. Histaminergic receptors modulate the coronary vascular response in isolated guinea pig hearts. Role of nitric oxide. *Inflamm Res.* 2003 Sep; 52(9):390-6.

Poli E, Pozzoli C, Coruzzi G, Bertaccini G, Timmerman H. In vitro cardiac pharmacology of the new histamine H₂-receptor agonist amthamine: comparisons with histamine and dimaprit. *Agents Actions.* 1993 Sep; 40(1-2):44-9.

Preuss H, Ghorai P, Kraus A, Dove S, Buschauer A, Seifert R. Mutations of Cys-17 and Ala-271 in the human histamine H₂ receptor determine the species selectivity of guanidine-type agonists and increase constitutive activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Jun; 321(3):975-82.

Rai V, Bhatt PS, Singh RH, Vaish SK, Udupa KN. Histamine and histaminase changes in arterial hypertension and myocardial infarction. *Indian Heart J.* 1976 Apr; 28(2):115-7.

Reid AC, Brazin JA, Morrey C, Silver RB, Levi R. Targeting cardiac mast cells: pharmacological modulation of the local renin-angiotensin system. *Curr Pharm Des.* 2011 Nov; 17(34):3744-52.

Reinhardt D, Schmidt U, Brodde OE, Schümann HJ. H₁ - and H₂-receptor mediated responses to histamine on contractility and cyclic AMP of atrial and papillary muscles from guinea-pig hearts. *Agents Actions.* 1977 Mar; 7(1):1-12.

Riise J, Nguyen CH, Qvigstad E, Sandnes DL, Osnes JB, Skomedal T, Levy FO, Krobert KA. Prostanoid F receptors elicit an inotropic effect in rat left ventricle by enhancing myosin light chain phosphorylation. *Cardiovasc Res.* 2008 Dec 1; 80(3):407-15.

Rioux F, Kérouac R, St-Pierre S. Neurotensin stimulates histamine release from the isolated, spontaneously beating heart of rats. *Life Sci.* 1984 Jul 23; 35(4):423-31.

Rothschild AM. Mechanisms of histamine release by compound 48-80. *Br J Pharmacol.* 1970 Jan; 38(1):253-62.

Sambrook J, Fritschi EF and Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanders L, Lynham JA, Kaumann AJ. Chronic beta 1-adrenoceptor blockade sensitises the H₁ and H₂ receptor systems in human atrium: rôle of cyclic nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1996 May; 353(6):661-70.

- Sato A, Terata K, Miura H, Toyama K, Loberiza JFR, Hatoum OA, Saito T, Sakuma I, Gutterman DD. Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Apr; 288(4):H1633-40.
- Schreurs J, Dailey MO, Schulman H. Pharmacological characterization of histamine H₂ receptors on clonal cytolytic T lymphocytes. Evidence for histamine-induced desensitization. *Biochem Pharmacol*. 1984 Nov 1; 33(21):3375-82.
- Seifert R, Strasser A, Schneider EH, Neumann D, Dove S, Buschauer A. Molecular and cellular analysis of human histamine receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci*. 2013 Jan;34(1):33-58.
- Seifert R, Lushington GH, Mou TC, Gille A, Sprang SR. Inhibitors of Membranous Adenylyl Cyclases. Published online 2011 Nov 17. doi: 10.1016/j.tips.2011.10.006.
- Shahi PK, Choi S, Zuo DC, Kim MY, Park CG, Kim YD, Lee J, Park KJ, So I, Jun JY. The possible roles of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide channels in regulating pacemaker activity in colonic interstitial cells of Cajal. *J Gastroenterol*. 2014 Jun; 49(6):1001-10.
- Shayo C, Davio C, Brodsky A, Mladovan AG, Legnazzi BL, Rivera E, Baldi A. Histamine modulates the expression of c-fos through cyclic AMP production via the H₂ receptor in the human promonocytic cell line U937. *Mol Pharmacol*. 1997 Jun; 51(6):983-90.
- Singh S, Johnson PI, Javed A, Gray TS, Lonchyna VA, Wurster RD. Monoamine- and histamine-synthesizing enzymes and neurotransmitters within neurons of adult human cardiac ganglia. 1999. *Circulation* 99:411–419.
- Skopp G, Schwenker G. Synthese des Calmodulinantagonisten N-(6-Aminohexyl)-5-chlor-1-naphthalinsulfonamid (W-7). *Archiv der Pharmazie*. 1984; Bd. 317, S. 649–650.
- Smit MJ, Leurs R, Shukrula SR, Bast A, Timmerman H. Rapid desensitization of the histamine H₂ receptor on the human monocytic cell line U937. *Eur J Pharmacol*. 1994 Dec 15; 288(1):17-25.
- Son YK, Park WS, Ko J, Han J, Kim N, Earm YE. Protein kinase A-dependent activation of inward rectifier potassium channels by adenosine in rabbit coronary smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec 2; 337(4):1145-52.
- Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*. 1976 May 15; 17(5):565-77.
- Suzuki H, Mobarakeh JI, Nunoki K, Sukegawa J, Watanabe H, Kuramasu A, Watanabe T, Yanai K, Yanagisawa T. Effects of activation of central nervous histamine receptors in cardiovascular regulation; studies in H₁ and H₂ receptor gene knockout mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2005 Feb; 371(2):99-106.
- Takahashi HK, Iwagaki H, Mori S, Yoshino T, Tanaka N, Nishibori M. Histamine inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin (IL)-18 production in human monocytes. *Clin Immunol*. 2004 Jul; 112(1):30-4.
- Tang WJ, Hurley JH: Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases. *Mol. Pharmacol.* 54, Nr. 2, August 1998, S. 231–40.
- Treinyš R, Jurevicius J. L-type Ca²⁺ channels in the heart: structure and regulation. *Medicina (Kaunas)*. 2008; 44(7):491-9.

- Tung LH, Rand MJ, Louis WJ. Positive chronotropic responses to cardiac alpha 1-adrenoreceptor activation in the pithed rat. *J Auton Pharmacol*. 1986 Dec; 6(4):285-90.
- Tippens AS, Davis SV, Hmayes JR, Bryda EC, Green TL, Gruetter CA. Detection of histidine decarboxylase in rat aorta and cultured rat aortic smooth muscle cells. *Inflamm Res*. 2004a Aug; 53(8):390-5.
- Tippens AS, Gruetter CA. Detection of histidine decarboxylase mRNA in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Inflamm Res*. 2004b Jun; 53(6):215-6.
- Tsuji Y, Hojo M, Voigt N, El-Armouche A, Inden Y, Murohara T, Dobrev D, Nattel S, Kodama I, Kamiya K. Ca²⁺-related signaling and protein phosphorylation abnormalities play central roles in a new experimental model of electrical storm. *Circulation*. 2011 May 24; 123(20):2192-203.
- Ugurel E, Connes P, Yavas G, Eglenen B, Turkay M, Aksu AC, Renoux C, Joly P, Gauthier A, Hot A, Bertrand Y, Cannas G, Yalcin O. Differential effects of adenylyl cyclase-protein kinase A cascade on shear-induced changes of sickle cell deformability. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2019; 73(4):531-543.
- Verma SC, McNeill JH. Cardiac histamine receptors: differences between left and right atria and right ventricle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1977 Feb; 200(2):352-62.
- Viaro F, Celotto AC, Capellini VK, Baldo CF, Rodrigues AJ, Vicente WV, Evora PR. Compound 48/80 induces endothelium-dependent and histamine release-independent relaxation in rabbit aorta. *Nitric Oxide*. 2008 Mar; 18(2):87-92. Epub 2007 Nov 28.
- Vigorito C, Russo P, Picotti GB, Chiariello M, Poto S, Marone G. Cardiovascular effects of histamine infusion in man. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1983 Jul-Aug; 5(4):531-7.
- Warren M et Zaitsev AV. CaMKII blockade, cardiac conduction, and arrhythmia. *Cardiovasc Res*. 2017 Dec; 113(14): 1798–1799.
- Weisgut J, Gergs U, Neumann J. On histamine receptor-induced arrhythmias in the mammalian heart (Abstract). 2015. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 388 (Suppl 1): S9.
- Weisgut J, Gergs U, Neumann J. On the mechanism of histamine induced cardiac arrhythmias (Abstract). 2015. *Venice Arrhythmias* (16.-18.10.2015).
- Weiss S, Robb GP, Ellics LB. The systemic effect of histamine in man with special reference to the responses to the cardiovascular system. *Arch Intern Med (Chic)*. 1932;49(3):360-396.
- Wellner-Kienitz MC, Bender K, Meyer T, Pott L. Coupling to Gs and G(q/11) of histamine H₂ receptors heterologously expressed in adult rat atrial myocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Sep 23; 1642(1-2):67-77.
- Went S, Varga E, Szücs E, Feher O. Über eine „sympathomimetische“ Wirkung des Histamins. [A sympathomimetic effect of histamine]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*. 1952; 215(1-2):129-32.
- Windaus A, Vogt W. Synthese des Imidazolyläthylamins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1907; 40: 3691-95.
- Wolff AA, Levi R. Histamine and cardiac arrhythmias. *Circ Res*. 1986 Jan; 58(1):1-16. Review.

- Yamatodani A, Maeyama K, Watanabe T, Wada H, Kitamura Y. Tissue distribution of histamine in a mutant mouse deficient in mast cells: clear evidence for the presence of non-mast-cell histamine. *Biochem Pharmacol.* 1982 Feb 1; 31(3):305-9.
- Yang LP, Perry CM. Histamine dihydrochloride: in the management of acute myeloid leukaemia. *Drugs.* 2011 Jan 1; 71(1):109-22.
- Yang LZ et al. cAMP- and Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinases mediate inotropic, lusitropic and arrhythmogenic effects of urocortin 2 in mouse ventricular myocytes. *Br J Pharmacol.* 2011 Jan; 162(2):544-56.
- Yaniv Y, Spurgeon HA, Ziman BD, Lakatta EG. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) activity and sinoatrial nodal pacemaker cell energetics. *PLoS One.* 2013; 8(2):e57079.
- Yilmaz R, Yuksekbas O, Erkol Z, Bulut ER, Arslan MN. Postmortem findings after anaphylactic reactions to drugs in Turkey. *Am J Forensic Med Pathol.* 2009 Dec; 30(4):346-9.
- Yokoyama A, Mori S, Takahashi HK, Kanke T, Wake H, Nishibori M. Effect of amodiaquine, a histamine N-methyltransferase inhibitor, on, *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide-induced hepatitis in mice. *Eur J Pharmacol.* 2007 Mar 8; 558(1-3):179-84.
- Zhang J, Cai WK, Zhang Z, Wang P, Lin XQ, Feng J, Fu SC, He GH. Cardioprotective effect of histamine H₂ antagonists in congestive heart failure: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2018 Apr; 97(15):e0409.
- Zecharia AY, Yu X, Götz T, Ye Z, Carr DR, Wulff P, Bettler B, Vyssotski AL, Brickley SG, Franks NP, Wisden W. GABAergic inhibition of histaminergic neurons regulates active waking but not the sleep-wake switch or propofol-induced loss of consciousness. *J Neurosci.* 2012 Sep 19; 32(38):13062-75.
- Zima AV, Picht E, Bers DM, Blatter LA. Termination of cardiac Ca²⁺ sparks: role of intra-SR [Ca²⁺], release flux, and intra-SR Ca²⁺ diffusion. *Circ Res.* 2008 Oct 10; 103(8):e105-15.
- Zippin JH, Chen Y, Nahirney P, et al.: Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *FASEB J.* 17, Nr. 1, Januar 2003, S. 82–4.

8 Thesen

1. Histamin und der H₂-Rezeptor-Agonist Dimaprit wirken an linken und rechten Vorhofpräparaten von TG positiv inotrop und chronotrop
2. Histamin wirkt in vivo an WT und TG positiv inotrop und chronotrop
3. Isolierte Vorhofpräparate von TG zeigen gegenüber WT unter basalen Bedingungen vermehrt Spontanarrhythmien
4. Histamin und Dimaprit induzieren an den rechten isolierten Vorhofpräparaten von TG konzentrationsabhängig Arrhythmien
5. Cimetidin wirkt als H₂-Rezeptor-Antagonist an den linken und rechten Vorhofpräparaten von TG
6. Spontane und Dimaprit-induzierte Arrhythmien sind Cimetidin-sensitiv
7. Spontanarrhythmien sind in TG H₂-Rezeptor-vermittelt
8. PKA und CaMKII scheinen keinen Einfluss auf die Pathogenese der spontanen und induzierten Arrhythmien von TG zu nehmen
9. Der Adenylatcyclase-Hemmer SQ22536 wirkt an TG proarrhythmogen

Anhang

Erklärungen

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

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

(3) 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.

Erfurt, den 16.09.2023

Jacqueline Weisgut