

5.2 *Pharmakologie*

5.2.1 Bestimmung der Histamin-H₁-Rezeptoraktivität

Durch Nackenschlag getöteten und entbluteten Meerschweinchen (350 - 500 g) wurde der Dünndarm herauspräpariert und dieser von Mesenterialgewebe befreit. Ca. 1.5 cm lange Ileumsegmente wurden mit einem isotonischen Transducer (TF6V5iso, Fa. Fleck, Mainz) mit einer Vorlast von 5 mN verbunden und in eine mit Carbogen (O₂/CO₂ 95/5) begaste, auf 37 °C temperierte Tyrodelösung (Zusammensetzung in mM/l: NaCl 137, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 0.4, NaHCO₃ 11.9, Glucose 5.6) gebracht, die 10⁻⁷ M Atropin zur Blockierung muskarinerner Effekte enthielt. Die Kontraktionen des Ileums wurden mit einem Transducer Coupler 4711, der mit einem 4-Kanal-x/t-Schreiber (Kompensograph C1016, Siemens, Berlin) verbunden war, registriert. Nach dreimaliger Vorstimulierung mit 10⁻⁶ M Histamin erfolgte eine etwa fünfminütige gründliche Auswaschphase sowie eine Ruhephase von etwa 10 Minuten. Beginnend mit einer Konzentration von 10⁻⁸ M (Badkonzentration) wurde kumulativ eine Konzentrations-Wirkungskurve des Standardagonisten Histamin aufgenommen.²¹⁹ Nach 5 Minuten Inkubation mit dem zu bestimmenden Antagonisten wurde eine weitere Konzentrations-Wirkungskurve von Histamin aufgenommen.²¹⁴ Es wurden 2-12 Bestimmungen pro Verbindung durchgeführt. Aus den daraus ermittelten IC₅₀-Werten wurden die pA₂-Werte errechnet.

ω

5.2.2 Bestimmung der Histamin-H₂-Rezeptoraktivität

Durch Nackenschlag getöteten und entbluteten Meerschweinchen (350 - 500 g) wurde das Herz herauspräpariert und dieses sofort in eine auf 32.5 °C temperierte, mit Carbogen (O₂/CO₂ 95/5) begaste Krebs-Henseleitlösung (Zusammensetzung in mM/l: NaCl 118, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1.6, CaCl₂ 2.5, Glucose 5, Natriumpyruvat 2) gebracht. Das isolierte Herz wurde an einen isometrischen Transducer (Typ TF6V5, Fa. Fleck, Mainz) angeschlossen. Die Änderung der Herzfrequenz wurde nach Vorverstärkung (Hellige Recomed 23606202, Fa. Hellige, Freiburg/Brsg.) einem Herzfrequenzmesser (Hellige Recomed 2306201, Fa. Hellige, Freiburg/Brsg.) zugeleitet und über einen Direktschreiber aufgezeichnet. Nach 45 Minuten Spülen wurde der Vorhof auf 5 mN gespannt und nach einer 10 minütigen Ruhepause in Gegenwart von 10^{-6.5} M Propranolol eine Konzentrations-Wirkungskurve von Histamin (10⁻⁸ - 10^{-4.5} M) aufgenommen. Nach gründlicher Spülung und

Herstellung der ursprünglichen Schlagfrequenz wurde zunächst $10^{-6.5}$ M Propranolol (10 Minuten) vorgelegt und dann die zu untersuchende Substanz für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde erneut eine Konzentrations-Wirkungskurve mit steigenden Histaminkonzentrationen erstellt.²¹⁴ Jede Verbindung wurde mindestens zweimal getestet; aus den Konzentrations-Wirkungskurven wurden die pA_2 -Werte ermittelt.

5.2.3 Bestimmung der Histamin- H_3 -Rezeptoraktivität

5.2.3.1 Messung der *In-vitro*-Aktivität am humanen Histamin- H_3 -Rezeptor durch Verdrängung von [125 I]-Iodoproxyfan bzw. [3 H]- N^α -Methylhistamin

Transfizierte CHO-K1-Zellen (für die Verdrängung von [125 I]-Iodoproxyfan) bzw. C6-Zellen (für die Verdrängung von [3 H]- N^α -Methylhistamin), die humane Histamin- H_3 -Rezeptoren exprimieren, wurden gewaschen und mit einem PBS-Medium geerntet.⁸² Nach Zentrifugation (140 x/min, 10 Minuten bei 4 °C) wurden sie mit einem Polytron in eiskaltem Puffer (bestehend aus 50 mM Na_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH = 7.5) homogenisiert. Anschließend wurde ein zweites Mal zentrifugiert (23000 x/min, 30 Minuten bei 4 °C), das erhaltene Präzipitat in dem obigen Puffer resuspendiert und die erhaltene Membranzubereitung für die Bindungsstudie verwendet. Gleichgroße Portionen der Membransuspension (0.2 - 0.3 mg/ml Protein) wurden für 60 Minuten mit [125 I]-Iodoproxyfan bzw. [3 H]- N^α -Methylhistamin allein und mit den Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen bei 25 °C für 60 Minuten inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe eiskalter Pufferlösungen gestoppt und die Suspension rasch durch Millipore-AAWP-Filter im Vakuum filtriert. Die auf dem Filter vorhandene Radioaktivität wurde durch Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie mit einer Wiederfindungsrate von 95 % gemessen. Eine nicht-spezifische Bindung wurde mit 1 μ M Imetit bestimmt. Aus der Kurve - Ligandkonzentration gegen Verdrängung von [125 I]-Iodoproxyfan bzw. [3 H]- N^α -Methylhistamin - wurden IC_{50} -Werte für jede Verbindung ermittelt, aus denen die K_i -Werte nach Cheng-Prusoff berechnet wurden.^{211,216-218}

5.2.3.2 Messung der *In-vitro*-Aktivität an Synaptosomen des zerebralen Rattenkortex

Dekapitierten männlichen Wistar-Ratten (170 - 200 g) wurde die Hirnrinde herauspräpariert, in 0.32 M Saccharoselösung suspendiert und homogenisiert. Nach 10 Minuten Zentrifugieren bei 4 °C mit 1000 x/min (Heraeus Minifuge RF) wurde die synaptosomale Fraktion isoliert. Die Synaptosomen wurden in eine auf 37 °C temperierte und mit Carbogen (O₂/CO₂ 95/5) konstant durchströmte modifizierte Krebs-Ringer-Lösung (Zusammensetzung in mM/l: Na⁺ 120, K⁺ 2, Ca²⁺ 2.6, Mg²⁺ 0.67, HCO₃⁻ 27.5, D-Glucose 10) suspendiert und 30 Minuten mit 0.25 µM [³H]-L-Histidin inkubiert. Durch mehrmaliges Zentrifugieren und wiederholter Aufnahme in modifizierter Krebs-Ringer-Lösung wurden die Synaptosomen von extrazellulärem [³H]-L-Histidin abgetrennt und in frischer Krebs-Ringer-Lösung aufgenommen. 250 µl dieser Suspension wurden gleichmäßig in auf 37 °C temperierte Reaktionsgefäße verteilt, die 10 µM einer Lösung des potentiellen Liganden - Antagonisten zusammen mit 10⁻⁶ M Histamin, Agonisten alleine - enthielten. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurden zur Stimulation je 250 µl modifizierte K⁺-haltige Krebs-Ringer-Lösung hinzugefügt, die 2 mM K⁺ (zur Bestimmung der basalen Histaminkonzentration) oder 30 mM K⁺ (zur Bestimmung der vollständigen Depolarisation mit maximaler Histaminfreisetzung) enthielt. Nach 2 Minuten Inkubation wurde die Depolarisation durch Ultrazentrifugation (3000 x/min Heraeus Minifuge RF) beendet. Die überstehende Lösung wurde über eine Amberlite CG50-Säule gereinigt und freigesetztes [³H]-Histamin mittels Szintillations-spektrometrie (Wallac 1410) bestimmt.^{10,88} Bei mindestens 3 verschiedenen separaten Experimenten pro Substanz wurden Konzentrations-Wirkungskurven für die Liganden im Bereich von 3 x 10⁻¹⁰ bis 2 x 10⁻⁴ M (bei 6 - 12 verschiedenen Konzentrationen) erstellt. Nach der Cheng-Prusoff-Gleichung wurden die K_i-Werte²¹⁸, nach *Parker* und *Waud*^{216,217} die EC₅₀-Werte berechnet.

5.2.3.3 Messung der *In-vitro*-Aktivität am isolierten Meerschweinchen-Ileum

Durch Nackenschlag getöteten und entbluteten weiblichen Meerschweinchen (350 - 500 g) wurde der etwa 20 - 50 cm von der Ileocaecalklappe entfernt liegende Teil des Dünndarms herauspräpariert und von Mesenterialgewebe befreit.²³⁹ Ca. 2 cm lange longitudinale Muskelschichten inklusive Plexus myentericus wurden zwischen zwei Platinelektroden

(4 mm) befestigt und in eine mit Carbogen (O₂/CO₂ 95/5) begaste, auf 37 °C temperierte Krebs-Pufferlösung (Zusammensetzung in mM/l: NaCl 118, KCl 5.6, MgSO₄ 1.18, CaCl₂ 2.5, NaH₂PO₄ 1.28, NaHCO₃ 25, Glucose 5.5) gebracht, die 10⁻⁶ M Cholin enthielt. Die Kontraktionen des Ileums wurden mit einem isometrischen Transducer (TF6V5, Fa. Fleck, Mainz), der mit einem Penrecorder (Kompensograph C1016, Siemens, Berlin) verbunden war, registriert. Nach 45 Minuten Äquilibration mit wechselnden Spül- und Ruhephasen wurde für 30 Minuten kontinuierlich elektrisch (15 V, 0.5 ms, 0.1 Hz) stimuliert (Stimulator I, Typ 215/I, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten). In Gegenwart von 1 µM Mepyramin zur Blockade der Histamin-H₁-Rezeptoren wurde eine kumulative Konzentrations-Wirkungskurve mit (*R*)-α-Methylhistamin aufgenommen (Minimalkonzentration 10⁻⁹ M). Nach einer weiteren Spül- und Ruhephase wurde der Ligand zugesetzt und nach 20 Minuten Inkubation eine Konzentrations-Wirkungskurve aufgezeichnet. Es wurden mindestens 4 Experimente an 2 Tieren durchgeführt und die pA₂-Werte aus der graphischen Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt.^{212,213}

5.2.3.4 Bestimmung der *In-vivo*-Aktivität an Mäusen durch Messung der N^ε-Methylhistaminbildung

Swiss-Mäusen wurde peroral eine Methylcellulose-Suspension mit verschiedenen Konzentrationen des zu testenden Liganden verabreicht. Nach 90 Minuten wurden die Tiere getötet, der Zerebralkortex herauspräpariert und dieser in gekühlter 0.4N Perchlorsäure homogenisiert. Mittels eines Radioimmunoassays wurde die Konzentration von N^ε-Methylhistamin ermittelt.²¹⁵ Zur Bestimmung der maximalen Bildung von N^ε-Methylhistamin wurden *parallel* Kontrollgruppen mit Ciproxifan (3 mg/kg) oder Thioperamid (10 mg/kg) bzw. Imetit (10 mg/kg) behandelt, außerdem diente eine Gruppe von Tieren der Bestimmung des basalen N^ε-Methylhistaminspiegels. Die ED₅₀-Werte wurden durch Korrelation der erhaltenen Messwerte zu den Maximalwerten mit den Referenzliganden ermittelt.⁸⁸

5.2.4 Bestimmung der Muskarin-M₃-Rezeptoraktivität

Durch Nackenschlag getöteten und entbluteten männlichen Meerschweinchen (350 - 500 g) wurde der Dünndarms herauspräpariert und dieser von Mesenterialgewebe befreit. Ca. 1.5 cm lange Ileumsegmente wurden mit einem isotonischen Transducer (TF6V5iso, Fa. Fleck, Mainz) mit einer Vorlast von 5 mN verbunden und in eine mit Carbogen (O₂/CO₂ 95/5)

begaste, auf 37 °C temperierte Tyrodelösung (Zusammensetzung in mM/l: NaCl 137, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 0.4, NaHCO₃ 11.9, Glucose 5.6) gebracht. Die Kontraktionen des Ileums wurden mit einem Transducer Coupler 4711, der mit einem 4-Kanal-x/t-Schreiber (Kompensograph C1016, Siemens, Berlin) verbunden war, registriert. Nach dreimaliger Vorstimulation mit 10^{-6.5} M Carbachol wurde eine kumulative Konzentrations-Wirkungskurve mit Carbachol (Minimalkonzentration 10^{-8.5} M) aufgenommen²¹⁹. Nach einer weiteren Spül- und Ruhephase wurde der Ligand zugesetzt und nach 5 Minuten Inkubation eine zweite Konzentrations-Wirkungskurve mit steigenden Carbachol-Konzentrationen bis zur maximalen Kontraktion aufgezeichnet. Aus den Konzentrations-Wirkungskurven wurden die pK-Werte ermittelt.²¹⁴

5.2.5 Bestimmung der Inhibierung der Histamin-N^f-Methyltransferase

Nach Dekapitation männlicher Wistar-Ratten (200 - 300 g) wurde die Niere entfernt, zerkleinert und diese in einer 0.25M Saccharoselösung homogenisiert. Im folgenden wurden Reinigungsschritte bei 4 °C in einer Lösung durchgeführt, die 0.2 mM EDTA und 1 mM Dithiothreitol (DTT) enthielt. Zunächst wurde die Zubereitung 15 Minuten lang (40000 x/min) zentrifugiert, anschließend ein zweites Mal für 60 Minuten (220000 x/min). Durch Zugabe von 2M Essigsäure wurde die Suspension auf pH = 5.0 eingestellt und anschließend ein weiteres Mal für 10 Minuten (40000 x/min) zentrifugiert. Nach Titration mit 1M Ammoniumhydroxidlösung zu einem pH-Wert von 7.0 wurde die Zubereitung jeweils nach Addition von 2M bzw. 3.2M Ammoniumsulfatlösung für 30 Minuten zentrifugiert (40000 x/min). Das letzte Präzipitat wurde in einem 0.01M Phosphatpuffer (mit 10 % Glycerol und pH = 7.5) resuspendiert und in einer Dialyse zweimal für 12 h gegen 4 Liter des Puffers gereinigt. Nach Reinigung des Proteins über eine DEAE-Sephacel-Säule (mit dem obigen Phosphatpuffer) erhielt man ausreichende Mengen an gereinigter Histamin-N^f-Methyltransferase, die bei -20 °C gelagert wurden.^{240,241}

Die gewonnene Histamin-N^f-Methyltransferase wurde in einem Phosphatpuffer bei pH = 8.0 mit 10⁻⁶ M Histamin und 10⁻³ M S-Adenosyl-L-methionin versetzt und anschließend mit vier verschiedenen Konzentrationen (1, 10, 30, 100 µM) der zu untersuchenden Verbindungen bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 0.4N Perchlorsäure nach 20 Minuten wurde die enzymatische Reaktion beendet. Mit Hilfe eines Enzymimmunoassays wurde die gebildete Menge an N^f-Methylhistamin bestimmt und aus der Kurve - Inhibitorkonzentration gegen N^f-Methylhistaminkonzentration - die IC₅₀-Werte ermittelt.²⁰²

5.2.6 log *P*-Werte

Die log *P*-Werte wurden mit Hilfe des Chemieprogramms Chemoffice[®] ermittelt. Die Genauigkeit der Berechnung liegt bei der gewählten Methode bei 0.5 log *P*-Einheiten. Das Programm ermittelt den Parameter mit Hilfe von experimentell ermittelten Werten der molaren Refraktivitäten und Polarisierbarkeiten von einzelnen Atomgruppen, die in Inkrementtabellen zusammengefaßt sind.

| Nr. | Log <i>P</i> | Nr. | Log <i>P</i> | Nr. | Log <i>P</i> |
|-----|--------------|-----|--------------|-----|--------------|
| 5 | 3.21 | 35 | 5.03 | 59 | 3.51 |
| 6 | 3.63 | 36 | 5.13 | 60 | 4.99 |
| 7 | 4.04 | 37 | 4.93 | 61 | 5.54 |
| 8 | 3.53 | 38 | 4.78 | 62 | 4.57 |
| 9 | 3.61 | 39 | 5.67 | 63 | 5.18 |
| 10 | 4.15 | 40 | 5.24 | 64 | 4.31 |
| 11 | 3.95 | 41 | 4.31 | 65 | 4.52 |
| 12 | 4.03 | 42 | 4.73 | 66 | 4.31 |
| 13 | 3.96 | 43 | 4.31 | 67 | 4.52 |
| 14 | 4.42 | 44 | 4.77 | 68 | 4.31 |
| 15 | 4.42 | 45 | 5.22 | 69 | 4.52 |
| 16 | 3.57 | 46 | 4.83 | 70 | 5.37 |
| 17 | 4.21 | 47 | 4.97 | 71 | 5.44 |
| 18 | 4.02 | 48 | 5.68 | 72 | 4.43 |
| 19 | 4.28 | 49 | 5.29 | 73 | 4.50 |
| 22 | 3.93 | 50 | 6.14 | 74 | 4.75 |
| 23 | 4.35 | 51 | 5.53 | 75 | 4.82 |
| 24 | 4.68 | 52 | 5.79 | 76 | 4.42 |
| 25 | 4.29 | 53 | 6.24 | 77 | 4.49 |
| 28 | 3.86 | 54 | 6.51 | 78 | 3.75 |
| 29 | 4.11 | 55 | 4.03 | 79 | 3.89 |
| 32 | 3.90 | 56 | 5.01 | 80 | 4.37 |
| 33 | 4.03 | 57 | 5.85 | 81 | 5.06 |
| 34 | 4.52 | 58 | 5.92 | 82 | 4.57 |