

5.2 Pharmakologisch-experimenteller Teil

5.2.1 Bestimmung der H₁-Rezeptor-Aktivität am Meerschweinchen-Ileum

Gesunde Meerschweinchen beiderlei Geschlechts (350 - 500 g) wurden durch Nackenschlag getötet und entblutet. Der Dünndarm wurde entnommen und von anhaftendem Mesenterialgewebe befreit. Ganze, vorsichtig gespülte Segmente von 1.5 - 2 cm Länge wurden vertikal in einem auf 37 °C temperierten Organbad (20 ml) befestigt. Als Medium diente kontinuierlich von Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) durchströmte *Tyrode*-Lösung (Zusammensetzung (in mM: NaCl 137, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 0.4, NaHCO₃ 11.0, Glucose 5.6).^{259,260} Die Organe wurden mit einem isotonisch arbeitenden Transducer (Typ TF6V5iso, Fleck, Mainz) mit einer Vorlast von 5 mN verbunden. Die Registrierung und Aufzeichnung der Kontraktionen erfolgte mit Hilfe eines Verstärkers (Transducer Coupler 4711, TSE, Bad Homburg), der mit einem 4-Kanal-x/t-Schreiber (Kompensograph C 1016, Siemens) verbunden war. Nach einer Stabilisierungsphase von 20 min wurden die Organe zur Äquilibration drei- bis viermal mit Histamin (1 und 10 µM) vorstimuliert. Jeder Stimulation folgte eine 5-minütige Auswaschphase und eine etwa 10-minütige Ruhephase. Während jeder Ruhephase erfolgte eine Zugabe von 0.1 µM Atropin, um etwaige kontraktile Effekte durch Freisetzung von Acetylcholin auszuschalten. Für jedes Organ wurde eine kumulative Konzentrations-Wirkungskurve für Histamin (0.01 - 30 µM) aufgenommen.²⁶¹ Im Anschluß an die Auswasch- und Ruhephase wurden die Konzentrations-Wirkungskurven für die zu testenden Substanzen in An- oder Abwesenheit des Standardantagonisten Mepyramin (1 - 100 nM, Inkubationszeit 10 - 15 min) bestimmt.²⁴⁴

Tab. 5.2.1 Bestimmung der H₁-Rezeptoraktivität am isolierten MS-Ileum

Nr.	pEC ₅₀ ± SEM	E _{max} ± SEM [%]	n	pA ₂ ± SEM	c(A) [nM]	n
44	pA ₂ = 5.66 ± 0.05		12	-	-	-
45	7.13 ± 0.06	53 ± 2	14	8.83 ± 0.11	3	6
46	7.29 ± 0.07	50 ± 2	7	8.89 ± 0.14	3	4
47	6.63 ± 0.07	28 ± 2	8	8.71 ± 0.17	3	3
84	7.25 ± 0.07	53 ± 3	8	8.90 ± 0.11	3	4
85	7.07 ± 0.04	41 ± 3	8	8.97 ± 0.05	3	4
86	7.34 ± 0.11	43 ± 3	6	9.16 ± 0.09	3	4
87	7.22 ± 0.06	29 ± 4	6	8.62 ± 0.14 ^a	3	4
88	7.57 ± 0.10	61 ± 2	6	8.71 ± 0.11	3	4
89	6.90 ± 0.08	24 ± 2	6	8.95 ± 0.12 ^a	3	5
90	7.71 ± 0.08	52 ± 3	8	9.13 ± 0.07	3	4
91	7.27 ± 0.10	38 ± 4	6	9.35 ± 0.10 ^a	3	6
48	7.67 ± 0.05	92 ± 1	12	8.76 ± 0.06	3	6
92	pA ₂ < 6.0			-	-	-
93	7.67 ± 0.04	80 ± 2	6	8.78 ± 0.05	3	6
94	8.16 ± 0.06	89 ± 1	14	9.18 ± 0.16 ^a	3	19
95	7.81 ± 0.02	83 ± 1	10	8.74 ± 0.05	3	7
96	7.11 ± 0.03	64 ± 3	8	9.07 ± 0.11	3	4
97	6.93 ± 0.06	48 ± 4	8	8.74 ± 0.09	3	4
98	7.87 ± 0.04	88 ± 1	10	8.77 ± 0.05	3	8
99	7.58 ± 0.04	84 ± 2	9	8.83 ± 0.11	3	5
100	pA ₂ = 5.78 ± 0.09		4	-	-	-
101	6.94 ± 0.09	78 ± 3	6	8.83 ± 0.06	3	6
102	6.57 ± 0.05	48 ± 6	6	8.49 ± 0.09 ^a	3	4
103	7.62 ± 0.06	84 ± 1	10	8.95 ± 0.06	3	4
104	7.02 ± 0.05	57 ± 6	10	8.63 ± 0.10 ^a	3	4

^a nicht-kompetitiver Antagonismus (pD'₂-Wert)

Tab. 5.2.1 Bestimmung der H₁-Rezeptoraktivität am isolierten MS-Ileum (Fortsetzung)

Nr.	pEC ₅₀ ± SEM	E _{max} ± SEM [%]	n	pA ₂ ± SEM	c(A) [nM]	n
3168	8.26 ± 0.06	96 ± 1	22	8.83 ± 0.04	2 - 100	16
105	7.87 ± 0.05	95 ± 1	15	8.73 ± 0.08	3	6
106	6.91 ± 0.06	86 ± 4	8	8.77 ± 0.05	3	6
107	n.d.	19 ± 5	6	n.d.	-	-
108	5.50 ± 0.07	81 ± 3	8	9.11 ± 0.03 ^a	3	4
109	5.47 ± 0.09	87 ± 2	6	9.08 ± 0.07	3	4
110	5.39 ± 0.19	92 ± 4	4	8.91 ± 0.05 ^a	3	4
111	n.d.	6 ± 3	6	n.d.	-	-
112	pA ₂ = 6.17 ± 0.11		4	-	-	-
113	7.10 ± 0.07	47 ± 2	6	> 9.0	3	4
114	pA ₂ = 6.40 ± 0.03		6	-	-	-
115	6.84 ± 0.07	45 ± 3	8	> 9.0	3	6
116	pA ₂ = 5.94 ± 0.05		6	-	-	-
117	6.81 ± 0.04	43 ± 6	4	8.89 ± 0.03	3	2
118	6.74 ± 0.08	57 ± 2	4	> 9.0 ^a	3	4
119	7.59 ± 0.03	49 ± 2	6	8.85 ± 0.04	3	2

^a nicht-kompetitiver Antagonismus (pD'₂-Wert)

5.2.2 Bestimmung des pK_p -Wertes am Meerschweinchen-Ileum

Zur Ermittlung der pK_p -Werte wurde der unter 5.2.1 beschriebene Versuchsaufbau verwendet. Nachdem die Endkonzentration der Agonisten in kumulativer Technik (oder als einmalige Bolusinjektion) im Organbad erreicht war, ließ man den durch den Agonisten erzeugten Maximaleffekt bis auf ein Niveau von etwa 50 % abfallen. Anschließend wurde eine zweite Histaminkurve in kumulativer Technik aufgenommen.

Tab. 5.2.2 Bestimmung der pK_p -Werte am isolierten MS-Ileum

Nr.	$pK_p \pm SEM$	c(A) [μM]	n	Nr.	$pK_p \pm SEM$	c(A) [μM]	n
44	5.66 ± 0.05	1 - 3	12	97	6.18 ± 0.06	10	8
45	6.35 ± 0.08	3	6	98	6.88 ± 0.12	3	5
46	6.28 ± 0.11	3	5	99	6.61 ± 0.07	3 - 10	7
47	6.15 ± 0.09	3	8	101	6.02 ± 0.06	10	6
84	6.33 ± 0.08	3	6	102	5.69 ± 0.10	10	6
85	6.10 ± 0.09	3	5	103	6.56 ± 0.10	10	7
86	6.42 ± 0.12	3	4	104	5.90 ± 0.05	10	6
87	6.30 ± 0.12	3	4	3	7.67 ± 0.05	0.1 - 10	27
88	6.59 ± 0.13	3	5	105	7.14 ± 0.06	10	7
89	6.53 ± 0.09	3	6	106	6.17 ± 0.14	10	7
90	6.77 ± 0.08	3	5	107	4.93 ± 0.05	10	6
91	6.39 ± 0.07	3	6	108	5.71 ± 0.10	10	6
48	7.15 ± 0.06	10	8	109	4.60 ± 0.10	10	5
93	7.13 ± 0.14	3	5	111	5.84 ± 0.13	5	7
94	7.45 ± 0.07	3	10	113	> 9.0	10	4
95	6.74 ± 0.08	3	6	115	6.06 ± 0.10	10	7
96	6.52 ± 0.07	10	8				

5.2.3 Bestimmung der H₁-Rezeptoraktivität an der isolierten

Meerschweinchen-Aorta

Die Meerschweinchen wurden, wie unter 5.2.1 beschrieben, getötet und die Aorta direkt nach der Entnahme von anhaftendem Gewebe befreit. Das Präparat wurde in Segmente von 2 – 4 mm Länge geschnitten und vom Endothel befreit. Die Organe wurden mit zwei L-förmigen Haken in einem mit modifizierter *Krebs-Henseleit*-Lösung (Konzentration in mM: NaCl 118.0, KCl 4.7, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 1.2, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, Glucose 10.0)^{260,262} durchspülen, Carbogen-begasten Organbad befestigt. Der Geräteaufbau wurde wie unter 5.2.1 beibehalten, jedoch wurden die Organe isometrisch mit dem Transducer verbunden und mit einer Vorspannung von 10 mN belegt. Nach einer Stabilisierungsphase von 100 min, in denen die Organe in regelmäßigen Abständen (alle 30 min) nachgespannt und gespült wurden, wurden die Organe zweimal für eine Dauer von 20 bzw. 45 min mit PGF_{2α} (10 μM) inkubiert; anschließend wurde PGF_{2α} vollständig ausgewaschen. Vor Aufnahme einer Konzentrations-Wirkungskurve für Histamin bzw. den jeweiligen Agonisten in Ab- oder Anwesenheit von Mepyramin (10 – 100 nM) wurden die Organe mit einer Schwellenkonzentration PGF_{2α} (0.4 - 1.5 μM) vorkontrahiert. Diese Konzentration entsprach 10 - 20 % der Kontraktion, die bei der zweiten Vorstimulation mit PGF_{2α} (10 μM) induziert wurde. Die erste Kurve diente der Aufnahme einer Konzentrations-Wirkungskurve für Histamin (0.1 - 300 μM), während die zweite Kurve entweder der Bestimmung der Aktivität der neuen Agonisten in An- oder Abwesenheit von Mepyramin (1 – 1000 nM, 30 min Inkubationszeit) oder der Kontrolle der pEC₅₀-Werte für Histamin diente. Ergaben sich hierbei Unterschiede zwischen der ersten und zweiten Histaminkurve, so wurden auch die entsprechenden pEC₅₀-Werte der Agonisten korrigiert.

Die Aufnahme aller Konzentrations-Wirkungskurven erfolgte in Anwesenheit von Cimetidin (30 μM), Corticosteron (30 μM), Cocain (30 μM), Prazosin (0.3 μM), Yohimbin (0.3 μM) und Propranolol (0.1 μM).

Tab. 5.2.3 Bestimmung der H₁-Rezeptoraktivität an der isolierten Meerschweinchen-Aorta

Nr.	pEC ₅₀ ± SEM	Rel. Pot. [%]	E _{max} ± SEM [%]	n	pA ₂ ± SEM	c(A) [nM]	n
Histamin	6.79 ± 0.05	100	100	10	9.00 ± 0.06	10	8
3	8.01 ± 0.03	1660	93 ± 3	12	8.49 ± 0.10	10	10
48	7.06 ± 0.04	200	88 ± 1	8	8.36 ± 0.09	10	6
94	7.85 ± 0.10	1175	89 ± 4	6	8.79 ± 0.15	10	4
96	7.03 ± 0.05	195	85 ± 4	4	8.49 ± 0.11	10	4

5.2.4 Bestimmung der H₁-Rezeptoraktivität an der Ratten-Aorta mit intaktem Endothel

Männliche Wistar-Ratten (250 – 350 g) wurden enthauptet und entblutet. Die thorakale Aorta wurde sofort entnommen und von anhaftendem Gewebe befreit. Organsegmente der Länge 2 – 4 mm wurden ohne das Endothel zu zerstören mit Hilfe von zwei L-förmigen Haken unter isometrischen Bedingungen (Vorspannung 10 mN) im Organbad befestigt. Als Badflüssigkeit diente modifizierte *Krebs-Henseleit*-Lösung (1.25 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄),^{260,262} die auf 37 °C temperiert wurde (Geräteaufbau siehe 5.2.1). Nach einer Äquilibrierungsphase von 120 min wurden die Organe mit einer submaximalen Konzentration (15.8 nM) des Thromboxan-A₂-Rezeptor-Agonisten *U46,619* in Gegenwart von Prazosin (100 nM) inkubiert. Nachdem der Maximaleffekt erreicht war (gewöhnlich nach 45 min), wurde eine kumulative Konzentrations-Wirkungskurve mit Histamin (0.1 – 1000 µM) oder den Agonisten in An- oder Abwesenheit von Mepyramin (100 nM, Inkubationszeit etwa 75 min) bestimmt. Nachdem die maximale Relaxation durch die Agonisten erreicht worden war, wurde die vollständige Relaxation durch Zugabe von Carbachol (300 – 1000 µM) induziert.²⁴⁴

Tab. 5.2.4 Bestimmung der H₁-Rezeptoraktivität an der isolierten, vorkontrahierten Ratten-Aorta

Nr.	pEC ₅₀ ± SEM	Rel. Pot. [%]	E _{max} ± SEM [%]	n	pA ₂ ± SEM	c(A) [nM]	n
Histamin	5.35 ± 0.04	100	100	> 25	8.00 ± 0.07	100	8
3	6.53 ± 0.07	1514	56 ± 4	10	8.02 ± 0.08	50	8
48	6.28 ± 0.07	843	59 ± 3	11	7.98 ± 0.14	50	7
94	6.62 ± 0.04	1866	65 ± 6	11	8.21 ± 0.14	50	6

^a [%] der Histamin-Wirkung

5.2.5 Bestimmung der H₂-Rezeptoraktivität am spontan schlagenden

Meerschweinchen-Atrium

Gesunde Meerschweinchen wurden, wie unter 5.2.1 beschrieben, getötet. Nach Öffnung des Thorax wurde das Herz entnommen und der spontan schlagende rechte Vorhof in eine mit Carbogen begaste und auf 32.5 °C temperierte *Krebs-Henseleit*-Lösung^{260,262} eingebracht. Das isolierte Organ wurde anschließend im Organbad an einen isometrischen Transducer (Typ TF6V5, Fa. Fleck, Mainz) angeschlossen und stufenweise vorsichtig vorgespannt (Vorspannung 5 mN). Die Änderung der Herzfrequenz wurde nach Verstärkung des Signals (Hellige Recomed Vorverstärker 236006202, Fa. Hellige, Freiburg/Brsg.) einem Herzfrequenzmesser (Hellige Recomed 236006201, Fa. Hellige, Freiburg/Brsg.) zugeleitet und über einen Direktschreiber aufgezeichnet. Die Aufnahme der kumulativen Konzentrations-Wirkungskurven von Histamin in An- und Abwesenheit der zu untersuchenden Verbindungen erfolgte nach *Pertz* und *Elz*^{244,263} in Gegenwart von Propranolol (0.3 µM) und Mepyramin (1 µM) (Inkubationszeit des zu untersuchenden Stoffes: 30 min).

Tab. 5.2.5 Bestimmung der H₂-Rezeptoraktivitäten

Nr.	pD' ₂ ± R/2 ^a	n	Nr.	pD' ₂ ± R/2 ^a	n	Nr.	pD' ₂ ± R/2 ^a	n
48	4.37 ± 0.03	2	97	4.05 ± 0.01	2	103	4.59 ± 0.03	2
93	4.96 ± 0.03	2	98	4.77 ± 0.18	4	104	4.12 ± 0.02	2
94	4.78 ± 0.11	2	99	5.25 ± 0.07	2	3	pEC ₅₀ = 5.0	6
95	5.02 ± 0.18	3	101	4.37 ± 0.08	4	105	3.92 ± 0.15	2
96	4.62 ± 0.08	2	102	4.36 ± 0.09	3	106	4.12 ± 0.02	2

^a R/2 = halbe Spannweite

5.2.6 Bestimmung der H₃-Rezeptoraktivität am elektrisch stimulierten

Meerschweinchen-Ileum

Die Präparation sowie der Geräteaufbau entsprachen weitgehend dem unter 5.2.1 beschriebenen. Als Versuchstiere wurden jedoch ausschließlich weibliche Meerschweinchen verwendet. Diesen wurde der etwa 20 – 50 cm von der Ileocaecalklappe entfernt liegende Teil des Dünndarms herauspräpariert und von anhaftendem Mesenterialgewebe befreit.²⁶⁴ Ca. 2 cm lange, longitudinale Muskelschichten inklusive Plexus myentericus wurden isometrisch zwischen zwei Platin-Elektroden befestigt und in ein Organbad eingebracht (Vorspannung 7.5 mN). Als Badmedium diente mit Carbogen begaste, auf 37 °C temperierte, modifizierte *Krebs-Henseleit*-Lösung (Zusammensetzung in mM: NaCl 117.9, KCl 5.6, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaH₂PO₄ 25.0, Glucose 5.5, Cholinchlorid 0.001). Die Kontraktionen des Ileums wurden über einen isometrischen Transducer (Typ TF6V5, Fa. Fleck, Mainz), der mit einem Penrecorder (Kompensograph C1016, Fa. Siemens, Berlin) verbunden war, registriert. Nach einer Äquilibrationsphase von 1 h mit wechselnden Spül- und Ruhephasen wurde das Organ über 30 min durch elektrische Ströme (Rechteckimpulse von 15 V und 0.5 ms, Frequenz 0.1 Hz, Stimulator I, Typ 215/I, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) zu kontinuierlichen Kontraktionen angeregt. Anschließend wurde in Gegenwart von Mepyramin (1 µM) zur Blockade der Histamin-H₁-Rezeptoren eine kumulative Konzentrations-Wirkungskurve mit (*R*)- α -Methylhistamin aufgenommen. Die Funktionsfähigkeit der Muskelpräparate wurde durch Zugabe des Histamin-H₃-Rezeptor-Agonisten (*R*)- α -Methylhistamin (100 nM) überprüft. Der Agonist bewirkte eine Relaxation der vorstimulierten Ringe um 50 – 100 %. Nach einer weiteren Spül- und Äquilibrationsphase und erneuter Feldstimulation über 30 min wurde eine kumulative Konzentrations-Wirkungskurve für (*R*)- α -Methylhistamin (1 – 1000 nM) aufgenommen. Nach einer intensiven Spül- und Äquilibrationsphase wurde das Organ für 20 min mit der zu untersuchenden Substanz in einer Konzentration, bei der keine Interaktion mit muskarinergen M₃-Rezeptoren zu erwarten war, inkubiert und eine kumulative Konzentrations-Wirkungskurve aufgenommen. Zur Blockade der Histamin-H₁-Rezeptoren wurde der Badflüssigkeit Mepyramin (1 µM) zugesetzt.¹⁴

Tab. 5.2.6 Bestimmung der H₃-Rezeptoraktivitäten

Nr.	pA ₂ ± SEM	n	Nr.	pA ₂ ± SEM	n	Nr.	pA ₂ ± SEM	n
48	< 6.3	4	96	< 6.3	4	105	6.91 ± 0.07	6
93	< 6.5	6	99	< 6.5	6	106	7.99 ± 0.04	6
94	< 6.3	6	101	< 6.3	6			
95	< 6.5	4	3	< 6.0	4			

5.2.7 Bestimmung der Muskarin-M₃-Rezeptoraktivität

Männliche Meerschweinchen (350 – 500 g) wurden durch Nackenschlag getötet und entblutet. Der Dünndarm wurde herauspräpariert und von Mesenterialgewebe befreit. Ca. 1.5 cm lange Ileum-Segmente wurden mit einem isotonischen Transducer (Typ TF6V5iso, Fa. Fleck, Mainz) mit einer Vorlast von 5 mN verbunden und in ein Organbad eingebracht. Als Badflüssigkeit diente mit Carbogen begaste Tyrodelösung bei einer Temperatur von 37 °C.^{259,260} Die Ileum-Kontraktionen wurden über einen Transducer Coupler 4711 und einen 4-Kanal-x/t-Schreiber (Kompensograph C1016, Fa. Siemens, Berlin) registriert. Nach Äquilibration wurde das Organ dreimal mit Carbachol (1 µM) vorstimuliert. Im Anschluß an eine Spül- und Ruhephase wurde eine kumulative Konzentrations-Wirkungskurve mit Carbachol aufgenommen. Nach einer erneuten Spül- und Ruhephase wurde der Ligand zugesetzt und nach 5-minütiger Inkubation eine weitere Konzentrations-Wirkungskurve mit steigenden Carbachol-Konzentrationen bis zur maximalen Kontraktion aufgezeichnet. Alle Bestimmungen erfolgten in Gegenwart von 1 µM Mepyramin. Aus den Konzentrations-Wirkungskurven wurden die pA₂-Werte ermittelt.^{244,263}

Tab. 5.2.7 Bestimmung der M₃-Rezeptoraktivitäten

Nr.	pA ₂ ± SEM	n	Nr.	pA ₂ ± SEM	n	Nr.	pA ₂ ± SEM	n
48	5.30 ± 0.06 ^a	6	96	5.15 ± 0.15	6	105	6.11 ± 0.11	4
93	6.34 ± 0.03	3	99	6.25 ± 0.06	4	106	6.38 ± 0.06	4
94	6.13 ± 0.05	5	101	6.00 ± 0.08	4			
95	6.29 ± 0.04	4	3	5.32 ± 0.11	6			

^a nicht-kompetitiver Antagonismus (pD'₂-Wert)

