



Die Wirkung von Histamin auf die
Nervenaktivität im humanen Plexus submucosus

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Eva Breunig
Freising, Juli 2006

Lehrstuhl für Humanbiologie

**Die Wirkung von Histamin auf die Nervenaktivität im
humanen Plexus submucosus**

Eva Breunig

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J.J. Hauner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schemann

2. Univ.-Prof. Dr. H. Daniel

Die Dissertation wurde am 18.07.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.10.2006 angenommen.

For it's mine, for it's mine,
Decarboxylated Histidine.
We've extracted you and weighed you.
By the living gut assayed you.
But we've yet to find your function - Histamine!

*Chorus of the international anthem of
the European Histamine Research Society (EHRS)*

Für meine Großeltern,
als Dank für ihre Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung

1.1	Das enterische Nervensystem	1
1.2	Neuro-Immun-Interaktion im Darm	3
1.3	Mastzellen	3
1.4	Histamin	4
1.4.1	H ₁ -Rezeptor	7
1.4.2	H ₂ -Rezeptor	8
1.4.3	H ₃ -Rezeptor	9
1.4.4	H ₄ -Rezeptor	10

II Material und Methoden

2.1	Material mit Quellenangaben	12
2.1.1	Reagenzien	12
2.1.2	Spritzpipetten	13
2.1.3	Präparationsmaterial	13
2.1.4	MSORT-Apparatur	14
2.1.5	Computerprogramme	15
2.2	Methoden	
2.1	Gewebegewinnung und Transport	16
2.2	Präparation	16
2.3	Versuchsvorbereitung	18
2.4	MSORT- "Multiple site optical recording technique"	18
2.4.1	Neuronale Färbung	19
2.4.2	Optische Messung	22
2.4.3	Datenerfassung	23
2.4.4	Elektrische Stimulation und Applikation der Pharmaka	24
2.4.5	Datenanalyse und Statistik	25
2.5	Pharmaka	25

III Ergebnisse

3.1	Histamin	32
3.2	Agonisten	35
3.3	Postsynaptischer H ₃ -Rezeptor	38
3.4	Histamin-Rezeptor-Clustering	40
3.5	Antagonisten	42
3.6	H ₃ - und H ₄ -Rezeptor vermittelter Effekt	45

IV	Diskussion	48
V	Zusammenfassung	54
VI	Literaturverzeichnis	56

I Einleitung

1.1 Das enterische Nervensystem (ENS)

Der Gastrointestinaltrakt ist ein eigenständiges Organ, welches vom enterischen Nervensystem gesteuert wird (Hansen, 2003). Das enterische Nervensystem befindet sich in den Wänden des gesamten Gastrointestinaltraktes vom Oesophagus bis hin zum Anus und den dazugehörigen Drüsen (Salvatorische Drüsen, Pankreas) und der Gallenblase (Hansen, 2003). Als Teil des autonomen Nervensystems reguliert das ENS Motilität, Sekretion, Blutfluß und Immunantworten. Das ENS besteht aus Nervenzellen, die in Ganglien variabler Größe organisiert sind. Ein dichtes Netzwerk von Fasersträngen verbindet die enterischen Nervenzellen untereinander und mit den Effektororganen bzw. mit anderen Teilen des autonomen Nervensystems. Mit seinen mehr als 100 Millionen Nervenzellen (Wood et al., 1999) stellt das enterische Nervensystem die größte Ansammlung von Nerven außerhalb des Gehirns dar und besitzt sogar mehr Nervenzellen als das Rückenmark. Da es anatomisch und funktionell dem Gehirn sehr ähnlich ist, wird es auch als „the little brain of the gut“ bezeichnet– das Bauchhirn (Wood, 1987).

Die Existenz dieses Nervensystems wurde erstmals von Meissner und Auerbach 1857 bzw. 1862 beschrieben (Auerbach, 1862; Meissner, 1857). Es gliedert sich in myenterischen Plexus (Auerbach, 1862), zwischen Längs- und Zirkulärmuskulatur lokalisiert, und submukösen Plexus (Meissner, 1857) zwischen Mukosa und Zirkulärmuskulatur (Mark et al., 2002). Bei größeren Säugetieren wie Affe, Schwein, Pferd, Hund als auch Ratte unterscheidet man zwei miteinander verbundene submuköse Netzwerke: der innere submuköse Plexus direkt unter der Muskularis mucosae und der an der Zirkulärmuskulatur des externen Muskels gelegene äußere submuköse Plexus (Schabadasch, 1930; Gunn, 1968; Stach, 1977; Christensen und Rick, 1987; Scheuermann et al., 1987b,c, 1989; Timmermans et al., 1992, 1997; Pearson, 1994; Pompolo, 1994; Balemba et al., 1998). Im menschlichen Darm und im Darm des Schweins existiert zusätzlich ein drittes Netzwerk; der intermediäre Plexus, der zwischen den beiden genannten Plexus liegt (Gunn, 1968; Hoyle und Burnstock, 1989; Dhatt und Buchan, 1994; Timmermans et al., 1994; Ibbamanneschi et al., 1995).

Im Laufe der letzten Jahre erfolgte durch die Anwendung und Kombination elektrophysiologischer, neurochemischer und neuropharmakologischer Techniken

die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung unterschiedlicher Nervenpopulationen im ENS. Das enterische Nervensystem verfügt über eine Vielzahl verschiedener Neurotransmitter, die auf Neurone, glatte Muskulatur der Darmwand, auf Gefäße sowie auf Epithelzellen einwirken (Schemann et al., 1990). Die Transmitter die eine exzitatorische Wirkung auf postsynaptische Neurone induzieren sind für schnelle postsynaptische Potentiale (fEPSPs) Acetylcholin (Nishi und North, 1973), Adenosin 5'-Triphosphat (ATP) (Galligan und Bertrand, 1994), Serotonin (Galligan und Bertrand, 1994) und Glutamat (Liu et al., 1997); für langsame postsynaptische Potentiale Acetylcholin, (North et al., 1985) VIP (Zafirov et al., 1985), Serotonin (Mawe et al., 1986), γ -Aminobuttersäure (Cherubini und North, 1984) und das Neuropeptid Substanz P (Freiling et al., 1999). Die Transmitter die eine inhibitorische Wirkung auf postsynaptische Neurone induzieren sind Acetylcholin (Tokimasa et al., 1994), Opioide (Mihara und North, 1986), Serotonin (Wade et al., 1994), Noradrenalin (North und Surprenant, 1985), Galanin (Yu et al., 1986), Somatostatin (Mihara et al., 1987) und das NPY (Hirai et al., 1997; Cunningham et al., 1994). Die wichtigsten exzitatorischen Transmitter, sind Acetylcholin und Substanz P. Die inhibitorischen Transmitter, die zu einer Hemmung der glatten Muskulatur führen, sind Stickoxid (NO), ATP und Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP).

Die Neurone des enterischen Nervensystems werden jedoch nicht nur über ihre neurochemische Codierung charakterisiert, sondern verfügen auch über unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften. Aufgrund ihres elektrophysiologischen Verhaltens werden intrinsische Neurone des Dünndarms in 4 Typen unterschieden: S/Typ-1 Neurone, AH/Typ-2 Neurone, Typ-3 Neurone und Typ-4 Neurone (Wood, 1994). Funktionell gliedern sich die Neurone in sensorische Neurone, Interneurone und Motorneurone (Wood, 1994). Sensorische Neurone kodieren als Chemo- oder Mechanorezeptoren verschiedene Stimuli, die auf die Magendarmwand einwirken, und leiten die Information innerhalb des ENS weiter. Interneurone verarbeiten die Information und regulieren die Erregbarkeit der Motorneurone, die dann letztendlich die Aktivität der Muskulatur und der Mukosa modulieren. Motoneurone senden Befehle an nicht-neuronale Effektorzellen, wie z.B. Muskelzellen, und beeinflussen damit deren Aktivität. (Wood, 1994).

1.2 Neuro-Immun-Interaktion im Darm

Im Gastrointestinaltrakt befindet sich die größte Ansammlung von Immunzellen im Körper. Das enterische Immunsystem ist, ähnlich wie das enterische Nervensystem, auf den Magen-Darm-Trakt spezialisiert: es wird als ein integratives System angesehen, das antigene und toxische Einflüsse, erkennt und verarbeitet. Eine intensive Kommunikation zwischen enterischen Nerven und enterischem Immunsystem ist Voraussetzung für lokale Neuro-Immun-Interaktionen, die bei Eindringen von Antigenen Barrierefunktionen übernehmen (Liu et al., 2003). Antigene aktivieren immunkompetente Zellen, die ihrerseits prosekretorisch wirkende Mediatoren, wie Histamin, Prostaglandine oder Leukotriene ausschütten (Fox et al., 1990; Knutson et al., 1990; Baenkler, 1987; Nolte, 1990). Diese Mediatoren stimulieren Epithelzellen direkt, aktivieren aber auch enterische Sekretomotorone, wodurch die Wirkung potenziert wird (Yu et al., 2001). Solche Neuro-Immun-Interaktionen aktivieren Muskel- und Mukosareflexe (Otterson et al., 1988, Sarna et al., 1991; Otterson et al., 1999). Die funktionelle Bedeutung liegt darin, dass luminaire Toxine durch die antigeninduzierte Stimulation der Sekretion stark verdünnt werden und durch gesteigerte Motilität den Darm schneller passieren.

In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass das enterische Immunsystem einen wesentlichen Einfluss auf neural-vermittelte Mukosafunktionen hat (Sharkey et al., 2001). Weiterhin beruhen die enterotoxischen Wirkungen vieler Bakterientoxine auf der Aktivierung von Neuro-Immun-Interaktionen (Argenzio, 1997). Neuro-Immun-Interaktionen sind das Resultat einer Aktivierung des enterischen Immunsystems und eine wesentliche Ursache pathologisch veränderter Darmfunktionen (Wood et al., 1999). In vitro Studien konnten zeigen, dass Entzündungsmediatoren eine erhöhte Erregbarkeit der Nervenzellen bewirken (Cooke et al., 1994). Entzündliche Darmerkrankungen (IBD) verursachen strukturelle und neurochemische Veränderungen im ENS (Lomax et al., 2005), jedoch sind die assoziierten funktionellen Beeinträchtigungen des ENS in Form veränderter synaptischer oder neuropharmakologischer Eigenschaften im Mensch bislang unbekannt.

1.3 Mastzellen

Mastzellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese entzündlicher und funktioneller Erkrankungen des Magen-Darmtraktes (Tunc et al., 2005). Über

Mastzellmediatoren, insbesondere Histamin, werden Immun-Nerv-Interaktionen gesteuert, die neural vermittelte Funktionsstörungen hervorrufen. Mastzellen befinden sich im gesamten Gastrointestinaltrakt (Rangachari, 1992). Die Verteilung von Mastzellen wird vor allem durch Entzündungen beeinflusst, wobei sich Mastzellen vermehrt außerhalb des Entzündungsherdes bzw. an der Demarkationslinie der Entzündung befinden (King et al., 1992). Studien an Tiermodellen haben gezeigt, dass Mediatoren der Mastzellen den epithelialen Ionentransport stimulieren (Bern et al., 1989; Crowe et al., 1990; Perdue et al., 1991). Diese Befunde konnten durch Ussing-Versuche auch direkt für den humanen Darm gezeigt werden (Crowe et al., 1993, 1997; Stack et al., 1995). Weiterhin ist die jejunale Sekretion von Histamin bei aktiven Crohn Erkrankungen erhöht (Knutson et al., 1990). Zudem wird die Cytokin-vermittelte Degranulation von Mastzellen in Zusammenhang mit Motilitätsstörungen postuliert (Del Valle et al., 2001).

Mastzellen sind Schlüsselbausteine immunoneuronaler Kommunikation und Signalweiterleitung zwischen Mastzellen und enterischen Nerven und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation gastrointestinaler Funktionen. In der Pathogenese einer Reihe von Darmerkrankungen unter anderem entzündlicher Darmerkrankungen (IBD) (Crowe et al., 1992) bei abdominalen Beschwerden, bei Lebensmittelallergien und funktioneller Darmerkrankungen insbesondere Reizdarmsyndrom (Irritable Bowel Syndrome, IBS) sind Mastzellen beteiligt. Studien an Colon-Biopsien von Patienten mit IBS zeigten, dass Mastzellen in erhöhter Dichte vorkommen, mehr Histamin freisetzen und näher an Nerven lokalisiert sind als in Kontroll-Präparaten (Barbara et al., 2004). Nach antigener Stimulation setzen Mastzellen eine Reihe von Mediatoren frei, wobei Histamin ein wichtiger Bestandteil dieses Cocktails ist und über eine Reihe metabotroper Rezeptoren wirkt.

1.4 Histamin

Eine Feinabstimmung des enterischen Nervensystems wird besonders durch Stimuli des vegetativen Nervensystems erreicht (Holzer et al., 2001). Gestört wird dieses Systems vor allem durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Frieling et al., 1997), wobei Histamin hierbei eine führende Rolle einnimmt (Traynor et al., 1993). Je nach Spezies und Lokalisation wird Histamin dabei von Enterochromaffin- (ECL) Zellen, verschiedenen Populationen von Mastzellen oder histaminergen Neuronen

gebildet, gespeichert und freigesetzt (Rangachari, 1992). Histamin kann über vier verschiedene membranständige Rezeptorproteine wirken. In der Reihenfolge ihrer Entdeckung werden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren als H₁ (Ash und Schild, 1966), H₂ (Black et al., 1972), H₃ (Arrang et al., 1983) und H₄ (Liu et al., 2000; Nakamura et al., 2000; Oda et al., 2000) bezeichnet. Die humanen H₁- und H₂-Rezeptoren wurden 1991 kloniert und charakterisiert (Gantz et al., 1991; Le Coniat et al., 1994; Oda et al., 2000) wohingegen die erfolgreiche Klonierung des humanen Histamin-H₃-Rezeptors erst 1999 durch *Lovenberg* (Lovenberg et al., 1999) gelang und die Identifikation des H₄-Rezeptor-Subtyps im Jahr 2000 (Oda et al.) erfolgte.

Es handelt sich bei allen Rezeptoren um heptahelikale Transmembranproteine, die extrazelluläre Signale über G-Proteine und intrazellulären Signaltransduktionskaskaden übertragen (Le Coniat et al., 1994; Nakamura et al., 2000). Obwohl die Rezeptor-Subtypen einer Familie entstammen, zeigen sie auffällige Unterschiede hinsichtlich der Verteilung, der Ligandenbindung und der Signalweiterleitung (Akdis et al., 2003; Mac Glashan, 2003; Schneider et al., 2002).

Stimulation von H₁-Rezeptoren verursacht u.a. intrazellulär G_{q/11}-vermittelt über Stimulierung der Phospholipase C (neben den Phospholipasen A₂ und D) einen Anstieg an Inositol-1,4,5-trisphosphat und 1,2-Diacylglycerol. Über den Anstieg an Botenstoffen, verbunden mit einer Steigerung der intrazellulären Calciumionenkonzentration, kommt es zur Stimulierung der Proteinkinase C als einem Schlüsselenzym der histaminvermittelten Signal-Transduktionskaskade. Histamin stimuliert die NF-κB-Signalkaskade, wodurch (pro)inflammatorische Mediatoren freigesetzt bzw. verstärkt exprimiert werden (Selektin, ICAM-1, VCAM-1, iNOS, IL-1β, IL-6, TNF-α, GM-CSF) (Bakker et al., 2002; Leurs et al., 2002). Der humane H₂-Rezeptor besteht aus einem Protein mit 359 Aminosäuren, das sowohl an das Adenylatcyclase- als auch an das Phosphoinositol-Second-Messenger-System gekoppelt ist. Dabei werden über einen GTP-abhängigen Mechanismus verschiedene Moleküle aktiviert (c-Fos, c-Jun PKC und p70S6 Kinase) (Del Valle et al., 1997). Studien in unterschiedlichen Spezies und einigen humanen Zellen konnten zeigen, dass die Hemmung charakteristischer Eigenschaften der Zellen hauptsächlich durch die histaminerge Wirkung an H₂-Rezeptoren vermittelt war. Die Signaltransduktionskaskade des H₃-Rezeptors erfolgt über die G_{i/o}-Untereinheit des G-Proteins und führt zu Abfall des cAMP-Spiegels, zur Akkumulation von Ca²⁺ und der Aktivierung des mitogen-aktivierten Proteinkinase-Signalwegs. Der H₄-Rezeptor-

Signaltransduktionsweg verläuft über die $G_{i/o}$ -Untereinheit des G-Proteins und führt zur Hemmung der Forskolin induzierten cAMP-Formation (Nakamura et al., 2000).

Im Gastrointestinaltrakt ist Histamin an der Säuresekretion des Magens (Tanaka et al., 2002), der Motilität des Darms und der Kommunikation zwischen Immunsystem und enterischem Nervensystem beteiligt. Neben diesen physiologischen Funktionen des Histamins kann es durch pathophysiologische Histaminwirkung am Darm zur Ausbildung einer sekretorischen Diarrhö kommen (Baum et al., 1989). Es ist allgemein bekannt, dass Histamin, während Entzündungsreaktionen von Effektorzellen (Mastzellen und basophilen Zellen) freigesetzt, die Immunantwort beeinflussen kann (Roszkowski, et al., 1977; Beer et al., 1987; Vannier et al., 1993; Banu et al., 1999). Eine der wichtigsten Funktionen von Histamin in Entzündungsreaktionen ist es, die Gefäßpermeabilität zu erhöhen. Dieser Effekt wird über H_1 -Rezeptoren moduliert (Thurmond et al., 2004). Immunologische Anomalien wurden z.B. in H_1 -Rezeptor-freien Mäusen festgestellt. Hier waren die T-Zell- und B-Zell-Antworten vermindert (Yanai et al., 1998; Banu et al., 1999). Th1 Zellen zeigen eine hauptsächliche, wenn auch nicht exklusive, Expression von Histamin H_1 -Rezeptoren, wohingegen Th2 Zellen hauptsächlich Histamin H_2 -Rezeptoren exprimieren, welche als negative Regulatoren der Proliferation von IL-4 und IL-13 Produktion agieren. Erhöhte mukosale Histamin Spiegel konnten auch in Patienten mit allergischen Enteroopathien, Lebensmittelallergien (Schwab et al., 2003), Crohn`s Erkrankungen (Winterkamp et al., 2002) und Ulcerosa Colitis Erkrankungen (Raithel et al., 1885) festgestellt werden. Außerdem wurde ein gesteigerter Histamin-Metabolismus in Patienten mit kollagener Colitis und Lebensmittelallergien gemessen. Studien von Crowe et al. (1997) an Humanpräparaten in Ussing-Kammer-Versuchen zeigten, dass die durch anti-IgE und Histamin induzierten Kurzschlussströme in IBD-Patienten geringere Werte lieferten als in Versuchen mit gesunden Gewebeproben. Weitere Befunde zeigen, dass die im humanen Colon durch Histamin vermittelten Kurzschlussströme ausschließlich über H_1 -Rezeptoren generiert sind ohne eine Beteiligung von H_2 - und H_3 -Rezeptoren (Keely et al., 1995). Die funktionelle Aktivität der Histaminrezeptor-Liganden variiert stark zwischen den Spezies und den getesteten Präparaten. Die genaue Funktion von Histamin im humanen enterischen Nervensystem ist noch nicht bekannt. Neuroimmun-Interaktionen werden bezüglich gestörter Darmfunktion diskutiert. Antagonisten der Histamin- H_2 -Rezeptoren werden erfolgreich bei Magen/Darm-Ulcera (Baum et al.,

1989) als auch bei Carcinompatienten (Kent et al., 1994) eingesetzt. Liganden für H₃-Rezeptoren werden präklinisch bei entzündlichen und neurodegenerativen Erkrankungen geprüft (Passani et al., 2004; Leurs et al., 2005). Die kürzlich entdeckten Histamin-H₄-Rezeptoren könnten zukünftig bei der Beeinflussung entzündlicher Prozesse und bei der Pharmakologie des Immunsystems eine Rolle spielen (Lim et al., 2005).

1.4.1 H₁-Rezeptor

Durch die über Histamin-H₁-Rezeptoren vermittelten intrazellulären Effekte kommt es peripher zur Kontraktion glatter Muskulatur (z.B. Bronchien, Darm, Arterien), zur Dilatation kleiner Blutgefäße (z.B. Arteriolen, Venolen, Kapillaren), zur Erhöhung der Permeabilität der Kapillaren, zur Stimulation afferenter Neurone und Zentral zur Steigerung des Wachzustands sowie zum Auslösen von Erbrechen.

Histamin H₁-Rezeptoren werden von einer Reihe von Zellen wie glatten Muskelzellen der Lunge und Gefäße, Hepatocyten, Chondrozyten, Nervenzellen, Endothelzellen und Dendriten exprimiert (Leurs et al., 1995; Smit et al., 1999, Toghiani et al., 2003). Auch in T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und Lymphozyten werden H₁-Rezeptoren gebildet, deren Stimulation proinflammatorische Prozesse induzieren. Cameron et al. quantifizierte H₁-Rezeptoren an der Oberfläche von Zellen und fand heraus, dass T-Zellen die höchste Ansammlung von H₁-Rezeptoren pro Zelle aufweisen, gefolgt von B-Zellen, T-Helferzellen und Monozyten. Diese Ergebnisse wurden von verschiedenen Forschungsgruppen bestätigt (Casale et al., 1985; Villemain et al., 1990). Einige Publikationen beschreiben den komplexen Zusammenhang von Histamin und dem Immunsystem in Bezug auf die immun-modulatorische Wirkung des H₁-Rezeptors. In H₁-Rezeptor „knockout“ Mäusen z.B. wurde eine Verminderung der T- und B-Lymphozytenpopulation festgestellt, die zu immunologischen Abnormalitäten führte (Yanai et al., 1998; Banu and Watanabe, 1999). Weitere Studien berichten über die Wirkung von H₁-Rezeptor-Antagonisten auf zellulärer und molekularer Ebene an allergischen Entzündungsreaktionen. Diese reichen von Hemmung der Freisetzung von basophilen Transmittern und Mastzell-Mediatoren bis zur „Downregulierung“ von Adhäsionsmolekülen und Hemmung der Chemokinfreisetzung (Cooper et al., 1990; de Backer, 1993; Hill et al., 1997, Leurs et al. 2002; Simons et al., 2002).

In enterischen Neuronen des myenterischen Plexus von Meerschweinchen induziert Histamin über H₁- und H₂-Rezeptoren langsame Depolarisationen. Diese sind mit einer Erhöhung des Eingangswiderstandes, vermehrter Erregbarkeit und sich wiederholenden Aktionspotentialentladungen assoziiert (Nemeth et al., 1984; Tamura und Wood, 1992). Histamin führt zu einer Kontraktion der Longitudinal-Muskulatur des Dünndarms von Meerschweinchen. Diese Kontraktionen sind über H₁-Rezeptoren innerviert, da sie mit dem H₁-Antagonisten Pylamin blockierbar waren (Zavec and Yellin, 1982; Trzeciakowski, 1987) und sind sehr wahrscheinlich durch eine direkte Aktivität an der glatten Muskulatur bedingt (Izzo et al., 1998).

H₁-Rezeptor-Antagonisten wurden effektiv zur Behandlung wässriger Durchfallerkrankungen, die mit Mastocytose und mikroskopischer Colitis assoziiert werden eingesetzt (Baum et al., 1989). Antagonisten des H₁-Rezeptors (Fexofenadin (Allegra)) werden zudem seit Jahren erfolgreich zur Behandlung von allergischen Reaktionen verwendet (Hall et al., 2000).

1.4.2 H₂-Rezeptor

Der H₂-Rezeptor ist neben seiner Funktion der Stimulation der gastrischen Säuresekretion (Tari et al., 1993), auch bei der Regulation der gastrointestinalen Motilität (Harry et al., 1963; Bennett et al., 1966) und der intestinalen Sekretion (Wang et al., 1990; Kelly et al., 1995) beteiligt. Eine Differenzierung bezüglich der Verteilung der Histamin H₁- und H₂-Rezeptorsubtypen ist nicht eindeutig möglich. Motilitätsstudien in Meerschweinchendarm zeigten eine Beteiligung von H₂-Rezeptoren, jedoch nicht unter Ausschluss von H₁-Rezeptoren. Morini und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die intestinale Muskelbewegung auf einem engen Zusammenspiel von H₁- als auch H₂-Rezeptoren beruht (Morini et al., 1993). Histamin induziert eine lang anhaltende zyklische Chloridsekretion im Dickdarm, die mit zyklischen Ringmuskelkontraktionen koordiniert ist (Frieling et al., 1993; Cooke et al., 1993). Grundlage für diese Reaktion ist die synchronisierte zyklische Aktivierung einer großen Zahl von Nervenzellen. Der durch die Stimulation des H₂-Rezeptors freigesetzte Metabolit der Arachidonsäure führt zur Muskelkontraktion (Barker Ebersole 1982). H₂-Antagonisten blockieren kompetitiv die H₂-Rezeptoren an der Belegzelle der Magenschleimhaut und hemmen die basale und die Histamin-stimulierte Säuresekretion. Histamin H₂-Rezeptoren sind die Schlüsselrezeptoren der langsam erregenden Effekte von Histamin an enterischen Neuronen (Frieling et al.,

1993; Nemeth et al., 1984; Tamura and Wood, 1992). Der selektive H₂-Rezeptor Agonist Dimaprit induziert exzitatorische Effekte und der H₂-Antagonist Cimetidin blockiert diese. Die Hypererregbarkeit bedingt durch Interaktionen von Histamin mit dem H₂-Rezeptor Subtyp nimmt zeitlich nicht ab. Alle langsamen EPSP-ähnlichen Aktivitäten von Histamin bestehen unvermindert, solange Histamin in der Perfusionslösung existiert. Diese neuronale Aktivität kann Stunden andauern (Tamura and Wood, 1992).

Erregung von submukösen Sekretomotoneuronen führt zu einer Steigerung der mukösen Sekretion von Elektrolyten und Wasser und verursacht somit eine Verflüssigung des Stuhls, die zu Durchfall führen kann (Cooke et al., 2000). Die derzeit therapeutisch eingesetzten H₂-Antagonisten sind Cimetidin, Ranitidin, Famotidin, Nizatidin und Roxatidin. H₂-Antagonisten bessern bei Patienten mit peptischen Ulzera rasch die Schmerzsymptomatik, beschleunigen die Ulkusheilung und verhindern unter langfristiger Anwendung die Rezidivhäufigkeit. Weiterhin wird Ranitidin (Zantac®) klinisch zur Behandlung von gastroösophagealen Reflux-Krankheiten eingesetzt (Kent et al., 1994; Soll et al., 1994).

1.4.3 H₃-Rezeptor

In den 80er Jahren wurde der H₃-Rezeptor als ein Heterorezeptor identifiziert, der primär in den Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert wird. Histamin H₃-Rezeptoren befinden sich beim Meerschweinchen präsynaptisch an Nerven des enterischen Systems und wirken inhibitorisch auf die Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt (Tamura et al., 1987; Poli et al., 1991; Frieling et al., 1993). Dieser im ZNS allgemeingültige Mechanismus (Schwartz et al., 1990) gilt auch bei neuronalen Schaltkreisen des myenterischen und submukösen Plexus des Dün- und Dickdarms von Meerschweinchen (Xia et al., 1996). Die langsamen inhibitorisch postsynaptischen Potentiale (IPSP) der Sekretomotoneurone von Meerschweinchen, welche durch die Freisetzung von Norepinephrin und Somatostatin generiert werden, werden durch Histamin blockiert (Liu et al., 2000).

Die funktionelle Beteiligung des H₃-Rezeptors in der neuronalen Kontrolle von Motilität, Sekretion und Durchblutung des Meerschweinchen-Darms ist unumstritten (Ishikawa 1987; Liu et al., 2000S, Blandizzi et al., 2000; Wood; 2004). Allerdings scheint die Verteilung von H₃-Rezeptoren an peripheren Nerven des Darms sehr speziesabhängig zu sein. So wurde sowohl beim Kaninchen (Pozzoli et al., 1997) als

auch bei Ratte (Hemedah et al., 2001) die funktionelle Abwesenheit von H₃-Rezeptoren gezeigt. Eine erst kürzlich erschienene Studie postuliert die Abwesenheit von H₃-Rezeptoren im humanen myenterischen Plexus (Sander et al., 2006).

Im Mensch vermutet man H₃-Rezeptoren an adenoidalen Mastzellen (Bent et al., 1991). Weiterhin gibt es Beweise einer postsynaptischen Lokalisation von H₃-Rezeptoren in der gastrointestinalen Muskulatur (Bertaccini et al., 2000) und in glatter Muskulatur der Lungenwege wo sie in Endothel-/ Epithelzellen oder in Muskelzellen exprimiert werden (Guc et al., 1988; Burgaud et al., 1993; Cardell et al., 1994; Delaunois et al., 1995). Hauptsächlich wird dem H₃-Rezeptor eine hemmende Funktion zugeschrieben, die neben der autoregulatorischen Freisetzung von Histamin auch die Freisetzung weiterer Neurotransmitter wie Dopamin, Serotonin, Noradrenalin, Aminobutyrsäure und Acetylcholin steuern soll. Fehlfunktionen dieser Autoregulation werden als mögliche Ursachen entzündlicher Prozesse postuliert (Dimitriadou et al., 1994). Mit dem H₃-Rezeptor-Agonisten R(-)- α -Methylhistamin und dem H₃-Rezeptor-Antagonisten Thioperamid sind sehr wirksame und selektive H₃-Rezeptor-Liganden gefunden worden (Arrang et al. 1987). Später wurden der H₃-Rezeptor-Agonist Imetit (Garbarg et al. 1992; Howson et al. 1992; Van der Goot et al. 1992) und der H₃-Rezeptor-Antagonist Clobenpropit (Van der Goot et al. 1992; Barnes et al. 1993) als noch wirksamere H₃-Rezeptor-Liganden beschrieben. Der H₃-Rezeptor-Agonist R(-)- α -Methylhistamin wurde in der Vergangenheit bis Phase II klinisch getestet. Mittlerweile werden Prodrugs, aus denen R(-)- α -Methylhistamin freigesetzt wird, geprüft (Krause et al. 1994, Rouleau et al., 1997). Mögliche therapeutische Einsatzgebiete für H₃-Rezeptor-Liganden sind z. B. Atemwegserkrankungen, Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes und /oder des ZNS. Zusätzlich werden H₃-Antagonisten bezüglich einer potentiellen Rolle in therapeutischen Einsatzgebieten wie Fettleibigkeit und Kognition, von der Pharmaindustrie auf Wirksamkeit geprüft (Passani et al., 2004; Leurs et al., 2005).

1.4.4 H₄-Rezeptor

Der erst kürzlich beschriebene H₄-Rezeptor wurde dem Chromosom 18q11.2 zugeschrieben. Der H₄-Rezeptor hat starke sequenzielle (Homologie von 37-43% zum H₃-Rezeptor davon 58% in der Transmembran-Region) und pharmakologische Ähnlichkeiten zum H₃-Rezeptor (Liu et al., 2001), trotz starker Unterschiede bezüglich ihrer Gewebe-Expressionsmuster. Der H₄-Rezeptor scheint häufiger

exprimiert zu werden, als bislang angenommen, besonders in den mit dem Immunsystem assoziierten Organen (Liu et al., 2000; Morse et al., 2001). Die Expression humaner H₄-Rezeptor mRNA wurde in Leukozyten einschließlich Neutrophilen, Eosinophilen, Monozyten, Lymphozyten, B Zellen und dendritischen Zellen, als auch in Gewebe von Knochenmark, Milz, Thymus, Colon, Dünndarm und Magen nachgewiesen (Nakamura et al., 2000; Oda et al., 2000; Coge et al., 2001; Morse et al., 2001; Liu et al., 2001; Zhu et al., 2001). Chronische Entzündungskrankheiten wie Asthma, gastrointestinale Erkrankungen oder Hautentzündungen zeichnen sich durch Akkumulation und selektive Aktivierung spezieller Leukozyten-Subtypen, den eosinophilen Granulozyten, aus, die vom Blut ins Gewebe dringen (Rothenberg, 1998). Eosinophile und Mastzellen sind Schlüsselzellen in der Pathophysiologie dieser chronischen Krankheitsbilder. Neuere Studien prognostizieren den H₄-Rezeptor als potentiellies Arzneimittelziel für immunologisch bedingte Erkrankungen (Iwan et al., 2005; Lim et al., 2005). Ganter et al. (2002) konnte zeigen, dass H₄- und H₂-Rezeptoren die durch Histamin induzierte Interleukin-16 Freisetzung von CD8 T-Zellen kontrollieren. Die physiologische Bedeutung von H₄-Rezeptoren impliziert weiterhin chemotaktische Reaktionen und Änderungen des Cytoskeletts von humanen Eosinophilen (O'Reilly et al., 2002; Buckland et al., 2003; Ling et al., 2004), Chemotaxis und intrazelluläre Calcium Freisetzung durch Mastzellen (Hofstra et al., 2003) und schließlich die Kontrolle der Leukotrien-B₄-Produktion durch Mastzellen, was anschließend zur vermehrten Einschleusung von Neutrophilen in das Bauchfell führt (Takeshita et al., 2003; Thurmond et al., 2004).

II Material und Methoden:

2.1 Material mit Quellenangaben

2.1.1 Reagenzien

Antibiotic Antimycotic (Z-18-M)	CCPro, Neustadt
Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (C-7902; Lot.: 101K0097)	Sigma-Aldrich, München
Cimetidin (C-4522; Lot: 85-F-0252)	Sigma-Aldrich, München
Clobenpropit dihydrobromid (Lot: 1A/17010)	Sigma-Aldrich, München
ω -Conotoxin GVIA (C-300)	Alomone Labs, München
Cy3 ^{TM3} -Konjugat (Katalog 711-165-152)	JacksonImmuno Research, Soham, UK
DI-8-Anepps, (D-3167; Lot.: 3471-2)	MolecularProbes, Invitrogen, Karlsruhe
Dimaprit hydrochlorid (0506; Lot.: 1/20158)	Tocris, Bristol, UK
Dimethyl sulfoxid DMSO (D-5879; Lot.: 77H0031)	MolecularProbes, Invitrogen, Karlsruhe
Dulbeccos Modified Eagles Medium (F-12 HAM; D8900)	Sigma-Aldrich, München
Ethanol (UN 1170; Lot: 021980004)	J.T. Baker, USA
Fast green (F-7252; Lot.:17F-3668)	Sigma-Aldrich, München
Gentamycin (Z-28-M)	CCPro, Neustadt
Glucose (G-7021)	Sigma-Aldrich, München
Hexamethonium (H-0879)	Sigma-Aldrich, München
Histamin (H-7250; Lot: 86F-0719)	Sigma-Aldrich, München
HTMT-Dimaleat (Cat No.: 0646)	Tocris, Bristol, UK
JNJ7777-120	Johnson&Johnson, San Diego, USA
Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Lot: 120K0256)	Sigma-Aldrich, München
4-Methylhistamin	BIOCAIR, UK Compound Bank
(R)-(-)- α -Methylhistamin Dihydrobromide (0569; 1A/1540792)	Tocris, Bristol, UK
Natriumazid (NaN_3) (S-8032)	Sigma-Aldrich, München
Natriumbicarbonat (NaHCO_3) (S-5761)	Sigma-Aldrich, München

Natriumchlorid (NaCl) (S-5886)	Sigma-Aldrich, München
Natriumphosphat (NaH ₂ PO ₄) (S-5011)	Sigma-Aldrich, München
Natriumphosphat Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ H ₂ O) (S9638; Lot: 100K0246)	Sigma-Aldrich, München
Natriumphosphat Heptahydrat (Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O) (S9390; Lot.: 112k0924)	Sigma-Aldrich, München
Nifedipin (N-7634; Lot.: 40H0563)	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd (P-6148)	Sigma-Aldrich, München
Picrinsäure (-36011)	Riedel de Häen, Marburg
Pluronic-F-127 (P-6867; Lot: 011-93)	MolecularProbes, Invitrogen, Karlsruhe
Pferdeserum (S-13M)	CCPro, Neustadt
Poly-L-Lysin-Lösung (P8920)	Sigma-Aldrich, München
Pyrilamin (P-5514; Lot12H0157)	gsk, Brentford, England
Ranitidin (R-0633; Lot 25H0718)	Sigma-Aldrich, München
Saccharose (7653)	Merck, Darmstadt

2.1.2 Spritzpipetten

Glaspipetten (W/Fil 1,0 mm; 4 IN; Item No: 1B100F-4)	WPI
Hitze filament (Breite 3,0 mm; Item No: F330B)	Science Product GmbH

2.1.3 Präparations-Material

Glaspetrischalen, Ø 9 cm	Zefa, München
Glaspetrischalen, Ø 14 cm	Zefa, München
Insect Pins 0,1mm (Item Nr: 26002-10)	FST; Heidelberg
Insect Pins 0,2mm (Item Nr: 26002-20)	FST; Heidelberg
Kaltlichtquelle (Highlight 2001)	Olympus, Hamburg
Perfusions-Pumpe (720001733)	ISMATEC, Zürich
Perfusionsschläuche (Nr.2111034)	Tygon, Saint-Gobain, Frankreich
Pumpenschläuche (Nr.07040047)	Tygon, Saint Gobain, Frankreich

Pumpenschlauch-Verbindungen

-Polypropylene Fittings 1/8x1/8

-Nr.YC-2306

Pinzette, fein (Dumont No: 5)

Pinzette, gebogen (Item No: 18/8)

Präparierschere (Item No: 15005-08)

Präparierschere, groß, gebogen (Item No: 15013-12)

Präparierschere, klein (Item No: 15005-08)

Schere (Item No:14054-13)

Stereomikroskop (Olympus SZ 40)

Sylgardring

Cole-Parmer

Instruments, Illinois, USA

Roland Vetter

Laborbedarf

FST; Heidelberg

Biochem, San Diego, USA

FST; Heidelberg

FST; Heidelberg

FST; Heidelberg

FST; Heidelberg

Olympus, Hamburg

Dow Corning, Midland,
USA

2.1.4 MSORT-Apparatur

Photodiodensystem

Diodensystem (SN# 469020)

Wu Tech Instrument;
Potomac MD, USA

Beleuchtung

Lichtquelle (Model 1600; Serial No.:3322)

OPTI QUIP, Highland
Mills, N.Y., USA,

Mikroskoplampengehäuse (Model 770)

OPTIQUIP, Highland
Mills, N.Y., USA

UNIBLITZ (Model D122)

Vincent Associates,
N.Y., USA

Shutter driver, Uni Blitz (Model D122)

Vincent Associates, New
York, NY, USA

Xenon -Lampe (XBO 150/CR OFR)

OSRAM, München

Mikroskop

Lichtmikroskop IX-50

Olympus, Hamburg

Interferenz-Optik nach Hoffmann

Olympus, Hamburg

Modifizierter Filterblock U-M41007:

Exzitationsfilter (HQ 545/30; 14903)

Emmisionsfilter (BA 580 IF)

Dicroitischer Spiegel (DM 656)

20x Öl-Immersionsobjektiv (NA 0.80)

40x Öl-Immersionsobjektiv (NA1.35)

Schwarzweiß Kamera (Mod 491)

Leuchtbeads (Lot:54A4-1)

TetraSpeck™ Fluorescent Microspheres SizeKit)

Olympus, Hamburg

Olympus, Hamburg

Olympus, Hamburg

Cohu inc, San Diego,
CA, USA

MolecularProbes,
Invitrogen, Karlsruhe

Stimulations-Apparatur

Pulsgenerator Master 8

Stimulus Isolator (A 360)

Teflonisolierter Platindraht (Ø 25µm) (PTT0110)

A.M.P.I., Jerusalem,
Israel

WPI, Berlin

WPI, Sarasota, USA

Pumpsysteme

MiniPuls3-Pumpe (ID:024548)

Pumpenschläuche (LotN°2107185)

Pumpenschläuche (LotN°2301283)

Perfusionsschläuche (No.:2307196)

Spritzpipetten-Puller (Modell P-87)

Thermostat 4,5 Liter, Thermomix 1480

Versuchstisch, vibrationsfrei

Gilson, Ohio, USA

ISMATEC, Zürich

ISMATEC, Saint Gobain,
Frankreich

Tygon, Saint-Gobain,
Frankreich

Sutter Instrument Co.,
USA

Braun

Science Products, Hofheim

2.1.5 Computer-Programme

IDL 5.2.1.

IgorPro, 3.1

Microsoft® Excel 2001

Research System Inc.,
Boulder Co, USA

Wave Metrics, Inc.

Microsoft® Power Point 2002

Microsoft® Word 2002

NeuroPlex®, 7.02

Paint ShopPro 7.04

Scion Image Beta 4.0.2

Sigma Stat 3.1

RedShirtImaging™ LLC,
Fairfield, CT, USA

Jasc®

Maryland, USA

Jandel®, Chicago, USA

2.2 Methoden

Gewebebegewinnung und Transport

Die Bereitstellung von vitalem menschlichem Gewebe war Grundlage um nötige Versuchsbedingungen zu schaffen und setzte eine optimale Kooperation zwischen dem Lehrstuhl für Humanbiologie und der Pathologie Rechts der Isar und dem Klinikum Freising voraus. Eine standardisierte Behandlung des Gewebes durch die Pathologie vor Ort war Voraussetzung für das Gelingen der Experimente. Dafür sollten die Präparate sofort in die zugestellten Nährlösungen überführt werden. Jede Verzögerung führte unweigerlich zum Verlust der Vitalität des Gewebes. Nach Entnahme war ein gekühlter Transport des Gewebes entscheidend.

2.2 Präparation

Präparation zur Isolierung des Plexus submukosus aus menschlichen Darm-Resektaten

Menschliche Geweberesektate aus Dick- und Dünndarm von 105 Patienten kamen aus der Chirurgie des Klinikums Freising und dem Klinikum Rechts der Isar der TU München. Die Diagnosen aufgrund welcher die Operationen durchgeführt wurden, waren neben Krebs, Divertikulitis unter anderem Morbus Crohn, analer Prolaps, Perforation, und Ulcer nach BII. Alle Abläufe sind durch die Ethikkommission der Technischen Universität München (Projektnummer 744/02) und der Landesärztekammer genehmigt worden.

Die humanen Resektate wurden in 250 ml Glasflaschen mit 200 ml Antibiotika angereicherter (Antibiotic antimycotic; CC-Pro, Item No:Z-18M; 2 ml in 200 ml Krebslösung) Krebslösung und 4°C geliefert. Das Resektat wurde zunächst mit 0,2 mm „Insect Pins“ in einer Glaspetrischale mit Sylgardboden (s.SOP 61) befestigt und aufgeschnitten. Danach wurde das Präparat gespannt und die Muskulatur mit einer kleinen Präparierschere (FST; Item No: 15005-08) abgeschnitten. Die Muskulatur wurde, sofern keine weitere Verwendung bestand, unmittelbar in eine Fixierschale überführt, gespannt und über Nacht fixiert. Während der gesamten Präparation wurde die Krebslösung alle 10 min erneuert.

Zur optischen Messung von Nervenzellaktivität im submukösen Plexus mit dem MSORT („multiple site optical recording technique, s. S. 18), wurden pro Versuch 2x3 cm große Gewebestücke benötigt. Pro Resektat präparierte man jeweils Gewebestücke für zwei Versuche. Überschüssiges Gewebe wurde fixiert. Die von Muskulatur und Fettrückständen befreiten Gewebestücke wurden nun in eine kleinere Glaspetrischale überführt, die mit 4°C kalter Carbogen-begaster Krebslösung perfundiert wurde. Zur Freilegung des Plexus submucosus wurde die Mukosa abpräpariert und der innere submuköse Plexus vorsichtig abgeschnitten. Dieser wurde dann über ein 1x2 cm großes Sylgardfenster (s. Abb.1) gespannt und mit 0,1 mm „Insect Pins“ befestigt.

Präparation zur Isolierung des Plexus submucosus aus Meerschweinchen-Colon

Ein entnommenes Colonsegment (proximales/ distales) wurde, falls nicht sofort präpariert, für maximal 30 min in Krebslösung gelagert. Die Befestigung des Segments erfolgte mit 0,2 mm dicken „Insect Pins“ auf einem Sylgardboden in einer Plastikpetrischale. Biologische Bedingungen wurden durch die Perfusion gekühlter, mit Carbogen begaster, Krebslösung gewährleistet. Zur Freilegung des Plexus submucosus wurde zunächst das Segment mesenterial geöffnet und das Gewebe straff gespannt und die Mukosa abpräpariert. Anschließend wurde das Gewebe mit der serosalen Seite nach oben erneut aufgespannt und die Muskulatur abgeschnitten. Die Präparation erfolgte unter einem Stereomikroskop bei 7-40facher Vergrößerung. Zur Beleuchtung wurde eine Kaltlichtquelle eingesetzt.

Der freigelegte submuköse Plexus wurde auf einen Sylgardring gespannt und in eine Versuchskammer eingebaut.

2.3 Versuchsvorbereitung

Zur optischen Messung von Nervenzellaktivität im submukösen Plexus mit dem MSORT (s. 2.4 MSORT) wurde der gespannte Plexus in eine eigens dafür gebaute Plexiglas-Kammer montiert. Die planare Befestigung in der Kammer erfolgte durch eine 3 mm dicke Kunststoffplatte mit 2x1 cm Fenster und einem Ring, der die Plastikplatte und das Sylgardfenster auf den Boden der Kammer drückte und durch Schrauben in dieser Position hielt (s. Abb. 1).

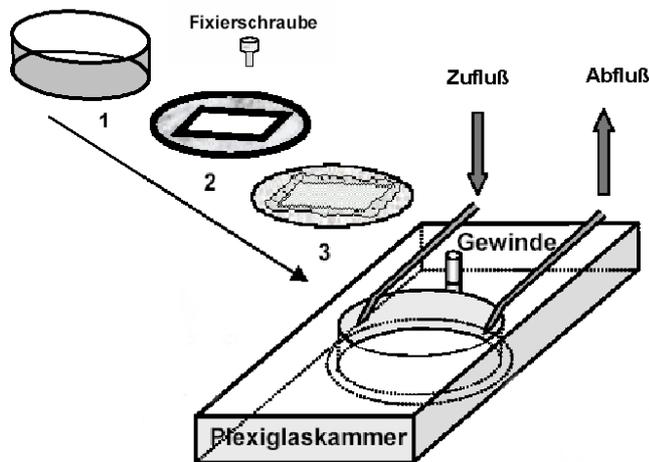


Abb.3: (1) Plastikring der (2) und (3) auf den Boden der Kammer drückt.

(2) 3 mm dicke Kunststoffplatte mit 2x1 cm großem Fenster, die zur planaren Befestigung des mit Gewebe bezogenen Sylgardrings (3) dient.

Die Perfusion mit 500 ml 37°C warmer, Carbogen-begaster Krebslösung erfolgte während der gesamten Versuchszeit und gewährleistete physiologische Bedingungen zur Versorgung des Gewebes. Die Perfusionsgeschwindigkeit wurde über eine Mini-Puls-Pumpe gesteuert und betrug 19,5 Umdrehungen pro Minute (Upm) mit einer Durchflussrate von 10 ml/ min. Die Perfusions-, Zu- und Ablaufschläuche wurden alle zwei Monate ausgewechselt. Anschließend wurde eine Erdungselektrode mit Knetgummi auf die Plexiglasplatte befestigt, so dass sie locker in die Kammer hing.

2.4 MSORT: „Multiple site optical recording technique“

Die "multisite optical recording technique" (MSORT) ist eine Methode die, unter zu Hilfenahme von spannungsabhängigen Farbstoffen (s.Material, 1.4), Aktivitätsmuster ganzer Neuronennetzwerke messen kann. Die direkte Analyse hunderter Neurone auf zellulärer und subzellulärer Ebene stellt damit eine Möglichkeit dar, Reaktionen verschiedener Zellen gleichzeitig zu detektieren. Es konnte bestätigt werden, dass

die räumliche und zeitliche Auflösung des MSORT die Messung schneller Aktionspotentiale erlaubt (Schemann, et al. 2002). Die Änderung der absoluten Fluoreszenz korrespondiert mit Signalen aus Studien, die mit intrazellulären Elektroden abgeleitet wurden (Neunlist et al., 1999).

2.4.1 Neuronale Färbung

Im Durchlicht konnten mit Hilfe eines x20 Ojektivs mit Interferenzkontrast nach Hoffmann Ganglien lokalisiert werden. Diese wurden dann mit Drückfüßen (Wood und Mayer, 1978) immobilisiert. Die Neurone wurden mit dem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff DI-8-ANEPPS angefärbt.

Spannungssensitive Farbstoffe ermöglichen die Detektion von Spannungstransienten mit hoher Orts- und Zeitauflösung. DI-8-ANEPPS gehört der Gruppe der Naphtylstyrylfarbstoffe an und besteht aus einem hydrophilen Pyridinring und zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffketten, die über einen Naphtalinring miteinander verbunden sind. Durch seine biochemischen Eigenschaften kann er sich in Phospholipid-Doppelmembranen einlagern und damit schnelle Membran-Potentialänderungen im Submillisekundenbereich erkennen. Der Farbstoff besitzt eine gute Membranstabilität und zeigt eine hohe Photostabilität bei gleichzeitig geringer Phototoxizität (Loew et al., 1978; Loew et al. 1985). Die Absorptions- und Emissionsmaxima von DI-8-ANEPPS (s.Abb.2) im an die Zellmembran gebundenen Zustand, liegen bei 465 nm und 635 nm. Der verwendete Anregungswellenbereich liegt bei 545 +/-15 nm. Die Emission des Farbstoffes wurde im Bereich >580 nm gemessen. Bei Depolarisation verschiebt sich das Emissionsspektrum etwas nach rechts und flacht sich etwas ab. Beides führt dazu, dass die gemessene Fluoreszenz abnimmt. Das zur Messung und Auswertung benutzte Programm Neuroplex 7.02 verrechnet dann die Kurve so, dass eine Depolarisation ein kleineres Fluoreszenzsignal ergibt und die Kurve nach oben verläuft (Tsau et al., 1996). Di-8-ANEPPS wurde bisher am enzymatisch dissoziierten enterischen Nervensystem (Obaid et al.1992) und am ENS von Häutchenpräparaten ("whole mount") in Versuchen an Maus-, Meerschweinchen- und Humanpräparaten (Neunlist et al., 1999; Schemann et al., 2005) angewendet.

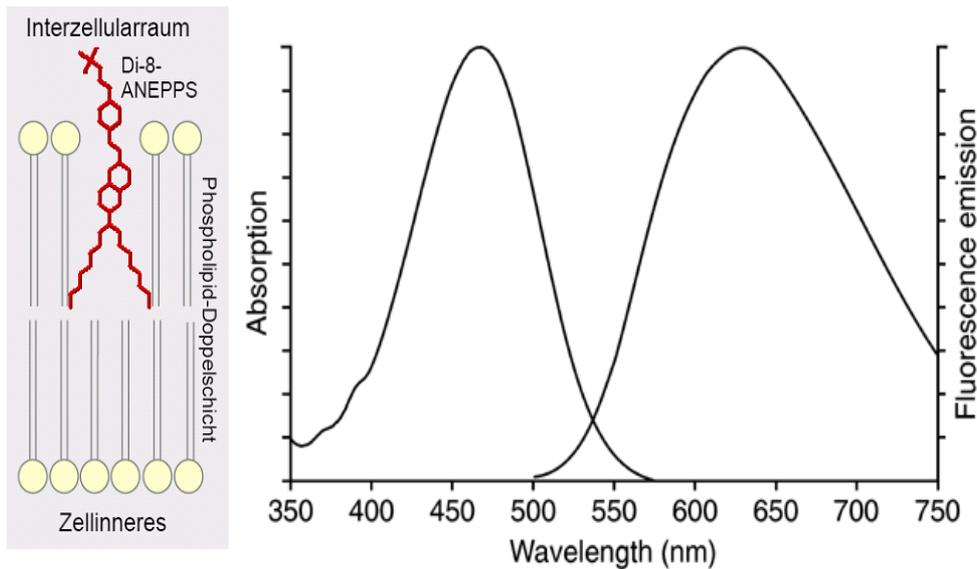


Abb.2) Links Schematische Darstellung der Integration und Ausrichtung des Styrylfarbstoffes Di-8-ANEPPS. Die hydrophile Kopfgruppe ragt in den Interzellularraum. **Rechts** Das Absorptions-Emission-Spektrum von Di-8-ANEPPS.

Di-8-ANEPPS wurde als Stocklösung (13,5 mM) in DMSO gelöst (5 mg Di-8-ANEPPS in 625 µl 99,9%igem DMSO) und als 60µl Aliquots bei 4°C gelagert. Zur neuronalen Färbung wurde die Endkonzentration von Di-8-ANEPPS für die Farbstoffspritze kurz vor Versuchsbeginn wie folgt angesetzt:

Farbstoffspritze

1,65 mg Pluronic F-127

+ 400 µl (begaste) Krebslösung

10 min in ca. 37° C warmem Wasser sonifizieren

+ 6µl Di-8-Anepps (Stocklösung)

20 sec vortexen (Falls Kristalle erkennbar sind, weitere 10 min sonifizieren)

Pluronic F-127 ist ein nicht-ionisches Tensid, das das Löslichmachen von wasserunlöslichen Farbstoffen oder anderen Materialien in physiologischen Medien erleichtert.

Das Protokoll für die Di-8-ANEPPS Stocklösung als auch der Farbstoffspritze wurde im Laufe der Versuchsreihe wie folgt geändert:

Di-8-ANEPPS-Stocklösung (15 mM)/ Pluronic F-127 (10%)/ DMSO (100%)

5 mg Di-8-Anepps
+ 281 µl DMSO
(30 sec vortexen)
+281 µl Pluronic F-127 20%ig in DMSO gelöst („ready to use“)

Im Falle von mikroskopisch erkennbaren Kristallen, wurde die Stocklösung für 10 min bei Raumtemperatur sonifiziert, Anschließend in Aliquots mit je 40 µl abgefüllt und bei 4°C dunkel gelagert. Die Di-8-ANEPPS-Stocklösung wurde unmittelbar vor dem Gebrauch für 10 min bei 50°C im Wärmeschrank gelöst. Da durch die mehrmalige Verwendung der Aliquots die Farbstoffintensität nachließ, wurden die neueren Stocklösungen in 200 µl Eppendorfgefäßen mit je 12 µl umgefüllt und bei 4°C gelagert.

Farbstoffspritze: (Di-8-ANEPPS 20 µM/ Pluronic 0,0135 %/ DMSO 0,135 %)
800 µl Krebslösung
+1,1 µl Di-8-Anepps-Stocklösung
(30 sec vortexen)

Da Kühlung eine mögliche Ursache zur Kristallbildung darstellte, wurden die zuletzt verwendeten Aliquots dunkel bei Raumtemperatur gelagert. Das restliche Protokoll zum Ansetzen des Farbstoffes blieb unverändert. Es stellte sich heraus, dass Erwärmen bei 50°C im Wärmeschrank über Zeitraum vom 24 Stunden, keine Beeinträchtigung bezüglich Qualität des Farbstoffes darstellte, vorausgesetzt der Farbstoff war komplett gelöst.

Zur neuronalen Färbung bzw. zur Applikation der Pharmaka wurde jeweils eine Spritzpipette mit einem Brown-Flaming Elektrodenpuller P-87 angefertigt. Dafür musste ein bestimmtes Programm ermittelt werden, das durch Variation der Einstellungen „heat“, „pull“, „velocity“ und „time“ am Puller die eingespannten Glaskanülen mit einer definierten Spritzenöffnung zog. Die benutzten Programmeinstellungen galten jeweils nur für eine bestimmte Konfiguration des Hitzefilamentes. Der Abstand Hitzefilament/ Kühlungsloch betrug 3,5 mm.

Die Spritzpipetten wurden anschließend in einen Mikroinjektionsmanipulator eingebaut. Der Manipulator erlaubte eine präzise Lokalisation der Pipette an das Ganglion, so dass der Farbstoff mittels eines Mikroinjektionspulses von 500 ms und einem Druck von 2 Bar in das Ganglion injiziert werden konnte. Zur Applikation des Farbstoffes wurde die Pipettenspitze minimal im Gewebe abgebrochen, da

ansonsten das Ganglion nicht vollständig gefärbt werden konnte und ein „Quaddeln“ ausschloss. Quaddeln ist der Vorgang der Farbstoffinjektion bei dem der mechanische Effekt des Druckimpulses die Zellen kurzzeitig blasenförmig hervorhebt und sich der Farbstoff in die Membran einlagert. Optimale Färbereigenschaften waren erreicht, wenn einzelne Neurone des Ganglions durch die Färbung der äußeren Membran unterschieden werden konnten (*Abb.3*).

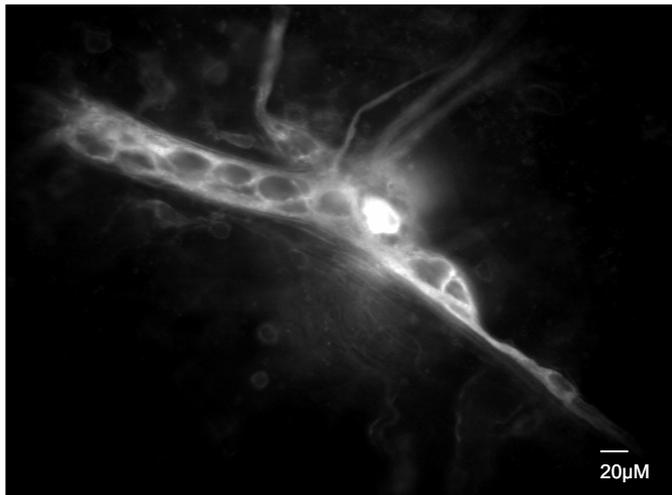


Abb.3: DI-8-ANEPPS gefärbtes humanes Neuron des Plexus submucosus. Einzelne Nervenzellen sind durch die gefärbten Zellmembranen identifizierbar und voneinander zu unterscheiden.

Studien belegen, dass eine spezifische Färbung das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert, als Folge die Signalstärke erhöht und die Phototoxizität reduziert (Schemann et al., 2002).

2.4.2 Optische Messung

Die Änderung der optischen Eigenschaften des Di-8-ANEPPS im elektrischen Feld der Membranspannung, äußert sich in einer Frequenzverschiebung des Absorptions- bzw. Emissionsmaximums. Da diese Änderungen im Subnanosekundenbereich stattfinden ist die optische Antwort schnell genug, um transiente Spannungsänderungen im Millisekundenbereich zu detektieren und damit Aktionspotentiale von Nervenzellen zu messen (Loew et al., 1979; Loew und Simpson, 1981). Nach einer visuellen Überprüfung der Färbung des Ganglions mit einem 40x Öl-Immersionsobjektiv unter Fluoreszenzlicht, erfolgte die Aufnahme der „resting light intensity“ (RLI) mit dem Programm Neuroplex zur späteren Verrechnung der Hintergrundfärbung. Die optische Messung der Nervenzellaktivität erfolgte, indem aus dem Xenonlampenspektrum das Anregungslicht des Fluoreszenzfarbstoffes durch einen Exzitationsfilter herausgefiltert wurde. Die Wahl der Filterkombination für den Farbstoff Di-8-ANEPPS stellt eine Modifikation des Cy3-Filters dar und wurde für

Messungen mit Di-8-ANEPPS durch Vergleich verschiedener Filterblöcke empirisch bestimmt (Obaid et al., 1999). Der Filterblock bestand aus folgenden Bauteilen:

- Exzitationsfilter (520-550 nm)
- dichroitischer Teilerspiegel (565 nm)
- Emissionsfilter (>580 nm)

Der sich anschließende dichroitische Spiegel lenkte das reflektierte (da <565nm) Licht durch das x40 Öl-Objektive auf das DI-8-ANEPPS gefärbte Ganglion. Das vom Präparat emittierte und vom Objektiv gesammelte Fluoreszenzlicht wurde dann über den dichroitischen Spiegel in den Abbildungsstrahlengang freigegeben (da >565nm) und durch einen Emissionsfilter auf die Glasfaseroptik des Photodioden-Arrays gelenkt. Der Lichtstrahl gelangte von den hexagonal gebündelten 464 Glasfasern auf die entsprechenden 464 Photodioden deren Ausgangssignale in der Anwendung auch als „traces“ bezeichnet werden (s. *Abb 4*).

Die Dauer der Belichtungszeit betrug für die Applikation der Pharmaka 3,2 bis 3,7 Sekunden. Das Gewebe sollte nur während der eigentlichen Messung belichtet werden, um die durch die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs verursachte Phototoxizität (Radikalbildung) zu limitieren. Eine kontrollierte Belichtungszeit wurde mittels eines Software getriebenen elektronischen Verschlusses (UNIBLITZ) sichergestellt.

2.4.3 Datenerfassung

Die optischen Signale wurden mit dem Programm IDL 5.2.1 verrechnet. Die Abtastrate bei 464 Dioden mit einem Durchmesser von jeweils 19 μm , betrug mit einem x40 Öl-Immersionsobjektiv 1,6 Hz. Die hohe zeitliche (1,6 kHz) und räumliche (280 μm^2 pro Diode) Auflösung ermöglichte die Detektion von Aktionspotentialen. Dabei wurden folgende Formen unterschieden: spontan generierte Aktionspotentiale, durch exogene Substanzen generierte Aktionspotentiale, elektrisch induzierte Summenaktionspotentiale und synaptisch erregte postsynaptische Potentiale. Die Fluoreszenzänderung wurde als $\Delta F/F$ angegeben (Änderung der Fluoreszenz/Fluoreszenz; "resting light intensity").

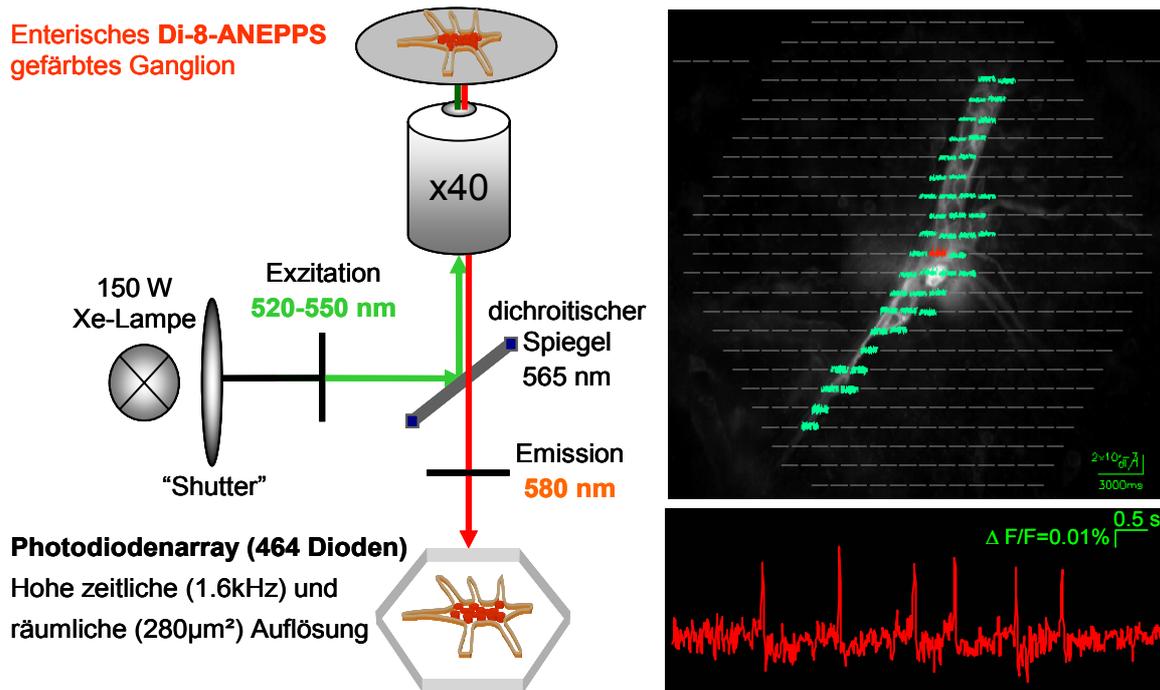


Abb. 4:) *Links* Schematischer Aufbau der zur optischen Messung von humanen Neuronen des submukösen Plexus verwendeten MSORT. *rechts oben* Fluoreszenz-Bild eines Di-8-ANEPPS gefärbten submukösen Ganglions des Menschen mit überlagertem Photodioden-array. Grün hervorgehoben sind ausschließlich die „traces“, die auf dem Ganglion liegen. Rot markiert und im Bild *rechts unten* vergrößert dargestellt, sind die Signale einer Photodiode, die spontan generierten Signale eines Neurons wiedergibt. $\Delta F/F =$ die Änderung der Fluoreszenz geteilt durch die Fluoreszenz Skalierungsbalken repräsentieren Zeit (0,5 s) und Änderung der Fluoreszenz ($\Delta F/F = 0,01\%$).

2.4.4 Elektrische Stimulation und Applikation der Pharmaka

Die Stimulationselektrode und die Erdung waren an dem Stimulus Isolator A360 angeschlossen. Die elektrische Stimulation der interganglionären Faserstränge wurde induziert indem die Elektrode vorsichtig auf ein Nervenbündel aufgesetzt wurde. Dabei sollte der Nerv nicht abgeklemmt, sondern nur leicht berührt werden, um die Stromweiterleitung nicht zu behindern. Es wurden je nach Gewebedicke Strom-Pulse mit der Stärke im Bereich von 40 μA - 400 μA gegeben.

Für die Applikation von Histamin und der Histamin-Rezeptor-Agonisten wurden Miroyjektions-Pipetten hergestellt (s. Kapitel 1.3) und in den links zum Mikroskopisch stehenden Manipulator eingebaut. Dieser Manipulator hatte den Vorteil, dass drei Pharmapipetten simultan eingebaut und in gleichem Abstand an das submuköse Ganglion herangeführt werden konnten. Die Applikationsdauer betrug zwischen 10-500 ms. Die Histamin-Rezeptor-Antagonisten wurden für 20 min bis maximal 40 min perfundiert. Nach den erfolgten Messungen wurde das Gewebe

für mindestens 45 min mit frischer Krebslösung ausgewaschen. Zwischen den jeweiligen Aufnahmen sollten mindestens 10 min liegen, um die Phototoxizität des Farbstoffes möglichst gering zu halten.

2.4.5 Datenanalyse und Statistik

Die Anzahl der Neurone pro Ganglion wurde visuell durch die Inspektion der Bilder der Di-8-ANEPPS gefärbten Zellen bestimmt. Die Bilder der Ganglien wurden unmittelbar nach dem jeweiligen Experiment mit einer Kamera und einem dafür entsprechenden Programm (Scion Image Version Beta 4.0.2) durchgeführt. Während der Analyse der optischen Daten wurden die so genannten „traces“ aller Dioden auf das entsprechende Bild des Ganglions projiziert. Signale der einzelnen Zellen wurden dann durch manuelles Zusammenfassen der Detektoren, welche die Aktivität der entsprechenden Zelle aufzeichnete, ermittelt. Pro Ganglion wurde die Prozentzahl derjenigen Zellen berechnet, die auf Histamin bzw. einer der Histamin-Rezeptor-Agonisten antworteten. Für die Analysen wurden diese Zahlen gemittelt. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) ausgedrückt. Für die Korrelations-Tests von Prozentzahl der Histamin sensitiven Zellen in Bezug auf Alter, Geschlecht oder Region wurden folgende statistischen Verfahren verwendet: „Pearson Product Moment Correlation“, „Mann-Whitney Rank Sum Test“ und „Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks“. P-Werte ≤ 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Um Unterschiede zwischen den einzelnen Darmregionen zu untersuchen wurde ein „one way analysis of variance“ durchgeführt (SigmaStat).

2.5 Pharmaka

Protokolle und Lösungen der Pharmaka

Nifedipin:

Nifedipin blockiert effektiv die Ca^{2+} -Kanäle und verhindert damit den Ca^{2+} -Einstrom (Strickland, 1998; Dolphin, 1998) indem es als Dihydropyridin mit hoher Aktivität an den geschlossenen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal bindet und die spannungsabhängige Öffnungswahrscheinlichkeit moduliert (Schütz 1996).

Nifedipin Stocklösung (10^{-2} M)

3,46 mg Nifedipin
in 1ml Ethanol pA

Nifedipin Perfusion (10^{-6} M):

50 μ l Nifedipin aus Stocklösung (10^{-2} M)
in 500 ml Krebslösung

Histamin:

Histamin Stocklösung (10^{-2} M)

1,84 mg Histamin
in 1 ml H_2O_{bidest}

Histamin Spritzpipette (10^{-4} M)

10 μ l His-Stocklösung (10^{-2})
in 990 μ l Krebslösung

H₁-Rezeptor-Agonist:

HTMT-Dimaleat Das Histamin-Trifluoromethyl-Toluidin-Derivat ist ein selektiver und potenter H₁-Rezeptor Agonist (Khan et al., 1885; Kahn et al., 1986; Qiu et al., 1990). HTMT-Dimaleat wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen für intrazelluläre Studien an Ileum-Resektaten des Meerschweinchens in Konzentrationen zwischen 3-10 μ M eingesetzt (De Man, et al, 2001). Zur optischen Messung neuronaler Aktivität im humanen submukösen Plexus dieser Arbeit wurde 10 μ M HTMT-Dimaleat in der Spritzpipette verwendet.

HTMT-Dimaleat Stocklösung (10^{-2} M)

6,14 mg HTMT-Dimaleat
in 1 ml H_2O_{bidest}

HTMT-Dimaleat Spritzpipette (10^{-5} M)

1 μ l His-Stocklösung (10^{-2})
in 999 μ l Krebslösung

H₁-Rezeptor-Antagonist:

Pyrilamin Die meist verwendete Referenzsubstanz zum Studium der Affinität von Liganden zum H₁-Rezeptor ist zweifellos der H₁-Rezeptor-Antagonist Pyrilamin (=Mepyramin) mit hoher Affinität ($pK_d = 9.4$) (Ison et al.; 1973) und guter Rezeptor-Selektivität. Seine besonderen Eigenschaften sind mit Schild-Analysen an Gehirnschnitten und an Ileum des Meerschweinchens bestätigt worden (Hill et al., 1990). Pyrilamin hat hohe Affinität zum H₁-Rezeptor wirkt jedoch in Konzentrationen höher als 10 μ M lokalanästhetisch, induziert Antworten an muskarinergen Rezeptoren ($> 5 \mu$ M) (van den Brink and Lein 1978), an H₂-Rezeptoren ($> 1 \mu$ M) (Green et al., 1977; Kanof et al., 1978; Hough et al., 1980), an Bindungsstellen von Benzodiazepinen, 7-Aminobutyrat, Dihydromorphin und an der

Monoamin-Wiederaufnahme (Hill, 1990). Zum Studium der H₁-Rezeptoren wurde daher 1µM im Perfusionsystem verwendet.

Pyrilamin Stocklösung (10⁻² M)

4,02 mg Pyrilamin
in 1 ml H₂O_{bidest}

Pyrilamin Perfusion (10⁻⁶ M)

10 µl Stocklösung (10⁻² M)
in 100 ml Krebslösung

H₂-Rezeptor-Agonist:

Dimaprit hydrochloride Dimaprit ist ein hoch spezifischer Histamin H₂-Rezeptor-Agonist (Parsons et al., 1994; Durant et al., 1994; Paquay et al., 1999; Farzin und Attarzadeh, 2000). Folgende Aktivitäten für Dimaprit am Meerschweinchen sind nachgewiesen worden: Wirkung am rechten Vorhof des Herzens (pD₂= 5.8), Säuresekretion im Magen (pD₂= 5.3) und Wirkung am Kortex (pK_d= 4.3) (Sterk et al., 1986). Die verwendeten Konzentrationen zum Studium des enterischen Nervensystems aus Meerschweinchen variieren je nach verwendeter Versuchsmethode im Bereich von 1 bis 100 µM (Frieling et al., 1993; Cooke et al., 1993; Starodub und Wood, 2000). Da die funktionelle Aktivität der Histamin-Rezeptor-Liganden innerhalb der untersuchten Spezies und den Präparaten stark variiert, wurde bei der vorliegenden Arbeit an humanen submukösen Nervenzellen eine Spritzpipetten-Konzentration von 50 µM Dimaprit eingesetzt, um unspezifische Effekte zu vermeiden.

Dimaprit-Stocklösung (10⁻² M)

2,34 mg Dimaprit
in 1 ml H₂O_{bidest}

Dimaprit Spritzpipette (50 µM)

5 µl Dimaprit-Stocklösung (10⁻²)
in 995 µl Krebslösung

H₂-Rezeptor-Antagonist

Ranitidin Ranitidin gilt als wirksamerer H₂-Rezeptor-Antagonist im Vergleich zu Cimetidin mit pA₂ Werten im Bereich von 6.7–7.3 (Van der Goot et al., 1991) und wurde daher in dieser Arbeit mit einer Konzentration von 10µM eingesetzt.

Stocklösung (10⁻² M)

3,51 mg Ranitidine
in 1 ml H₂O_{dest}

Ranitidin Perfusion (10⁻⁵ M)

10 µM Stocklösung
in 100 ml Krebslösung

H₃-Rezeptor-Agonist:

(R)-(-)- α -Methylhistamin dihydrobromide Der Histamin H₃-Rezeptor-Agonist (R)-(-)- α -Methylhistamin zeigt eine Affinitäts-Ordnung von Mensch > Meerschweinchen > Maus > Ratte (Hew et al., 1990, Schwartz et al., 1990, Hill et al., 1997). Aufgrund des hohen pK-Wertes von (R)-(-)- α -Methylhistamin mit 8,4 am humanen H₃-Rezeptor, gehört er zu den hochspezifischen H₃-Rezeptoragonisten (Arrang, et al., 1987). Neuere Daten beschreiben jedoch ebenfalls eine agonistische Wirkung am H₄-Rezeptor (Lim et al., 2005).

in 1 ml H₂O_{bidest}

R- α -Methylhistamin-Stocklösung

(10⁻² M)

2,87 mg R- α -Methylhistamin

R- α -Methylhistamin Spritzpipette (10⁻⁶ M)

0,1 μ l R- α -Methylhistamin-Stocklösung

in 1 ml Krebslösung

H₃-Rezeptor-Antagonist:

Clobenpropit dihydrobromid Clobenpropit fungierte als kompetitiver H₃-Antagonist in funktionellen Histamin H₃-Rezeptor-Bioassays an Meerschweinchen (Van der Goot et al., 1992) und in Vergleichsexperimenten mit radioaktiv markierten Bioassays (Harper et al., 1999). Das Pharmakon unterscheidet nicht zwischen H_{3A}⁻ und H_{3B}⁻-Rezeptor-Subtypen (Schlicker et al., 1994). Der Rezeptor zeichnet sich durch eine Affinitäts-Folge von Mensch > Meerschweinchen > Maus > Ratte aus. Die Affinität zum humanen H₃-Rezeptor liegt bei pK_i= 9.4 (Van der Goot et al., 1992; Kathmann et al., 1993). Clobenpropit wird eine agonistische Wirkung am H₄-Rezeptor zugeschrieben (Liu et al., 2001).

Clobenpropit Stocklösung (10⁻²M)

4,71 mg Clobenpropit

in 1 ml H₂O_{bidest}

Clobenpropit Spritzpipette (50 μ M)

50 μ l in Clobenpropit-Stocklösung

in 100 ml Krebslösung

Clobenpropit Perfusion (10⁻⁵ M)

10 μ l in Clobenpropit-Stocklösung

in 100 ml Krebslösung

H₄-Rezeptor-Agonist:

4-Methylhistamin 4-Methylhistamin wurde erst kürzlich als erster potenter H₄-Rezeptor-Agonist identifiziert (Herman et al., 2005). Bislang wurde 4-Methylhistamin ausschließlich als H₂-Agonist eingesetzt (Durant et al., 1975; Takahashi 2003).

4-Methylhistamin Stocklösung

(10^{-2} M)

1,98 mg 4-Methyl-Histamin

in 1 ml H₂O_{bidest}

4-Methylhistamin Spritzpipette (10^{-5} M)

1 µl His-Stocklösung (10^{-2})

in 999 µl Krebslösung

H₄-Rezeptor-Antagonist:

JNJ7777-120 Dieses Pharmakon wurde freundlicherweise von der Firma „JOHNSON&JOHNSON PHARMACEUTICAL RESEARCH & DEVELOPMENT“ zur Verfügung gestellt. Neuere Studien zeigen eine hohe antagonistische Selektivität des Indolylpiperazins JNJ7777-120 am H₄-Rezeptor (Jablonowski et al., 2003; Thurmond et al., 2004, Herman et al., 2005). JNJ7777-120 ist equipotent gegenüber H₄-Rezeptoren aus Mensch, Maus, und Ratte, zeigt jedoch eine 1000fache Selektivität gegenüber den H₁-, H₂-, und H₃-Rezeptoren. Kreuzreaktionen mit anderen Rezeptoren sind nicht bekannt (Thurmond et al., 2004) .

JNJ7777-120 Stocklösung

(10^{-2} M)

3,14 mg JNJ 7777-120

in 1 ml H₂O_{bidest}

JNJ7777-120 Perfusion

(10^{-5} M)

10 µl JNJ 7777-120-Stocklösung

in 100 ml Krebslösung

Hexamethonium

Hexamethonium ist ein nikotinerger, cholinerger Antagonist der für 40 min perfundiert wurde.

Hexamethonium Stocklösung (10^{-1} M)

36 mg Hexamethoniumbromid

in 1,0 ml Aqua _{bidest}.

Hexamethonium Perfusion 200 µM

200 µl Stocklösung (10^{-1} M)

in 100 ml Krebs-Lösung

Hexamethonium Spritzpipette (1 mM)

10 µl Stocklösung 10^{-1} M

in 1 ml Krebs-Lösung

ω-Conotoxin GVIA

ω-Conotoxin blockiert die synaptische Übertragung durch Hemmung der präsynaptischen N-Typ Calcium-Kanäle. Der Calcium-Kanal-Blocker wurde zur weiteren Verifizierung der Ergebnisse für 20 min perfundiert.

Stocklösung (82 µM)

1 mg ω-Conotoxin in 4 ml Aqua_{bidest}
(190 µl Aliquots bei -20°C gelagert)

Perfusion 500 nM

0,305 µl Stocklösung (82 µM)
in 50 ml Krebs-Lösung

2.6 Puffer und Lösungen

Krebslösung/ Ca²⁺-depletierte-Krebs-Lösung/ Kalium depletierte Krebslösung:

Die entsprechenden Mengen Natriumphosphat, Natriumchlorid, Natriumbicarbonat, Glucose und Kaliumchlorid wurden abgewogen und in Aqua_{bidest} gelöst. Dann wurde 1 ml MgCl₂/ 1 L Lösung zugegeben und für 15 min mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast bis ein pH von 7,4 erreicht war. Anschließend wurde das CaCl₂ (1 ml /1 L Krebslösung) zugegeben und für weitere 15 min begast. MgCl₂ und CaCl₂ wurden separat als Stocklösungen wie folgt gelagert: MgCl₂-Stock 1,2 M (243,96 g/1 L Aqua_{bidest}); CaCl₂-Stock 2,5 M (367,5 g/1 L Aqua_{bidest}).

Substanzen	Mol.Wt. (g/mol)	Krebslösung (mmol/L)	g/ L	Ca ²⁺ -depletierte Lösung (mmol/L)	g/ L	K ⁺ -depletierte Lösung (mmol/L)	g/ L
NaH ₂ PO ₄	120,0	1,2	0,144	1,2	0,144	1,2	0,144
NaCl	58,44	117	6,84	98	5,73	117	7
NaHCO ₃	84,01	25	2,10	25	2,10	25	2,10
Glucose	180,2	11	1,98	11	1,98	11	1,98
KCl	74,55	4,7	0,350	4,7	0,350	2	0,149
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203,3	1,2	0,244	16	3,25	1,2	0,244
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147,0	2,5	0,368	0,25	0,037	2,5	0,368

Phosphatpuffer (0,1 M):

3,0 g NaH₂PO₄·H₂O (Natriumphosphat monohydrat)
+ 32,68 g Na₂HPO₄·7H₂O (Natriumphosphat heptahydrat)
in 800 ml Aqua_{bidest} lösen

Mit 1 M NaOH oder 1 M H₃PO₄ wird der pH auf 7,44 equilibriert und anschließend mit Aqua_{bidest} auf 1 Liter aufgefüllt.

Phosphatpuffer-Saline (PBS-Puffer):

8,8 g NaCl in 800 ml Aqua_{bidest} lösen
+116 ml Phosphatpuffer (s.o.), pH=7.44
anschließend mit Aqua_{bidest} auf 1 Liter auffüllen.

Phosphatpuffer-Saline mit Natriumazid (PBS/NaN₃) 0,1%:

1 g NaN₃ (Natriumazid)
in 1 Liter PBS-Puffer (s.oben)

Fixierlösung (4%ige Paraformaldehyd-Lösung):

50 ml Phosphatpuffer (s.oben)
+ 2 g Paraformaldehyd (CH₂O)_n

Die Paraformaldehyd-Lösung wurde bei 60°C unter dem Abzug gerührt bis sie transparent war. Falls dies nicht geschah wurde tröpfchenweise 10 M NaOH zugegeben. Anschließend wurde die Lösung von der Heizplatte genommen und 100 µl Pikrinsäure (1,2 %) zugegeben. Die Lösung sollte nicht länger als fünf Tage benutzt werden und bei 2-8°C gelagert sein.

III Ergebnisse

Insgesamt wurden Versuche mit Human-Präparaten von 189 Patienten durchgeführt. Davon konnten 84 Präparate (92 Ganglien) nicht abgeleitet und 105 Präparate (n=2092 Neurone, 266 Ganglien) erfolgreich abgeleitet werden. Als erfolgreich abgeleitet galt ein Ganglion, wenn Aktionspotentiale durch exogene Pharmaka induziert werden konnten, Neurone spontan Aktionspotentiale generierten oder durch elektrische Stimulation interganglionärer Faserstränge Summenaktionspotentiale und synaptisch erregte postsynaptische Potentiale messbar waren.

Die Präparate stammten von 58 männlichen und 47 weiblichen Patienten. Das Durchschnittsalter der männlichen Patienten betrug 65 Jahre (Bereich 25 - 88 Jahre) und das der weiblichen Patienten 68 Jahre (Bereich 30 – 83 Jahre). Die Versuche erfolgten an Geweberesektaten von Jejunum (1), Ileum (13), Colon (88) und Rektum (3). Die Diagnosen aufgrund welcher die Operationen durchgeführt wurden, waren neben Krebs (75 Patienten) und Divertikulitis (18 Patienten) unter anderem Dickdarm-Polypen (4 Patienten), Stenosen (3 Patienten), Morbus Crohn (2 Patienten), analer Prolaps (1 Patient), Peritonitis (1 Patient), und Ulcer nach BII (1 Patient).

3.1 Histamin

Histamin aktiviert humane submuköse Neurone

Druckapplikation von 100 μ M Histamin mit einer Mikroinjektionspipette induzierte einen exzitatorischen Effekt in $37,5 \pm 2,8$ % der gemessenen Neurone (n= 800 Neurone, 117 Ganglien, 52 Präparate) (Abb.5). In diesen Geweben betrug die durchschnittliche Anzahl von Zellen pro Ganglion $7,3 \pm 3,6$ (Bereich: 2 – 21), vergleichbar zu Daten die basierend auf Färbungen mit Pan-neuronalen Markern durchgeführt wurden (Schneider et al., 2001).

Statistische Analysen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Histaminsensitiven Zellen und Alter (P=0.802), Geschlecht (P = 0.89) oder Darmregion (P = 0.44). Die exzitatorische Aktivität von Histamin bestand in der Entladung von Aktionspotentialen in zuvor inaktiven Zellen (n=89 Neurone, 34 Ganglien, 24 Patienten) mit einer durchschnittlichen Spike-Frequenz von $10 \pm 0,78$ Hz oder in einer Erhöhung der Spike Entladung in zuvor spontan aktiven Zellen (n=180

Neurone, 55 Ganglien, 31 Patienten). In diesen Zellen erhöhte Histamin die Entladungsfrequenz signifikant ($P = <0,0001$) von $2,1 \pm 0,26$ Hz auf $7,84 \pm 0,41$ Hz.

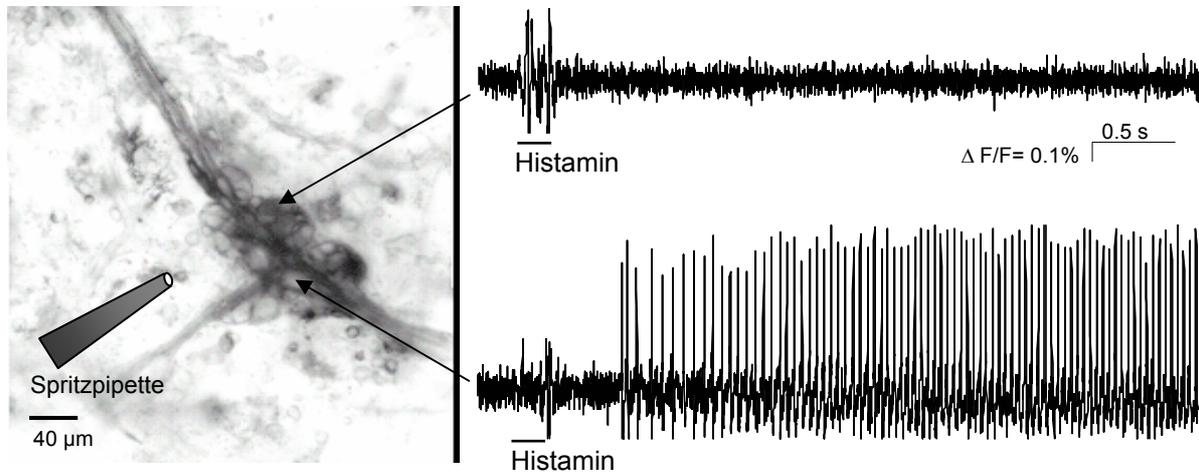


Abb.5: Histamin induziert einen erregenden Effekt in einigen Neuronen des humanen submukösen Plexus. **Links:** Fluoreszenz-Bild eines Di-8-ANEPPS gefärbten submukösen Ganglions. Einzelne Neurone des Ganglions können durch die Färbung der äußeren Membran unterschieden werden. Die Fluoreszenzänderung ($\Delta F/F$) wird rechts für beide Neurone vor und nach Druckapplikation von 200 ms Histamin mittels einer Spritzpipette angezeigt (schwarzer Balken). Das Neuron welches durch den oberen „trace“ dargestellt wird, zeigt keine Reaktion auf Histamin, wohingegen das Neuron des darunter liegenden „trace“ nach kurzer Verzögerung mit einer Aktionspotentialentladung reagiert, welche über die gesamte Aufnahmedauer von 4 s anhält. Die Ausschläge in den Abbildungen während der Spritzapplikation von Histamin sind Spritzartefakte bedingt durch leichte Bewegungen.

Submuköse Neurone generierten spontane Aktionspotentiale in einem Frequenzbereich von 0,4 - 7 Hz und Histamin induzierte Aktionspotentiale im Bereich von 3 - 24 Hz. Im Schnitt generierten $3,9 \pm 0,06$ Neurone pro Ganglion spontane Aktionspotentialentladungen. Diese Frequenz betrug im Mittel $2,1 \pm 0,26$ Hz. Nach einer Spritzapplikationsdauer von 500 ms Histamin, setzte der Effekt mit einer Verzögerung von 10 ms bis 1,7 s ein und erstreckte sich über die gesamte Aufnahmezeit von 3 - 5 Sekunden (s.Abb.5). Die Effektivität von Histamin war unabhängig vom Erregungszustand der Histamin-sensitiven Neurone, da spontan aktive Zellen und unerregte Zellen gleich antworteten ($P = 0,15$).

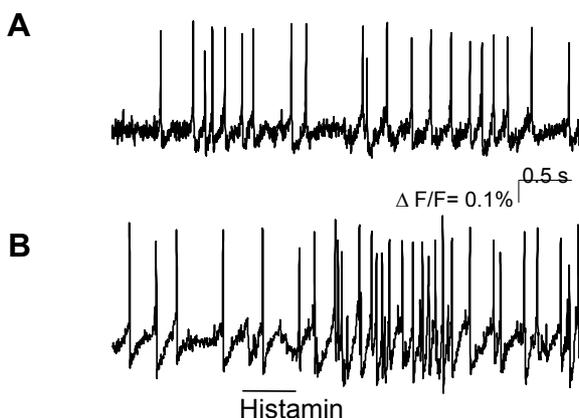


Abb. 6: Histamin hat keinen inhibitorischen Effekt auf spontan aktive submuköse Neurone. (A) Spontanaktive Aktionspotentialentladung eines Neurons. (B) Druckapplikation von 100 µM Histamin für 500 ms (schwarzer Balken) induzierte eine erhöhte Entladung von Aktionspotentialen, ohne das Entladungsmuster der spontanen Aktivität zu beeinträchtigen.

Eine Verminderung der spontan generierten Aktionspotentialentladungen durch Histamin konnte nicht beobachtet werden (n= 180 Neurone, 55 Ganglien, 31 Patienten), was zu dem Schluss führt, dass Histamin keinen inhibitorischen Effekt hat (s. Abb.6).

Um die Dauer der lang anhaltenden, Histamin-induzierten Aktionspotentialentladung zu ermitteln, wurde eine außergewöhnliche Messung von 18,85 Sekunden durchgeführt, wobei Histamin nach 0,98 Sekunden für 200 ms appliziert wurde. Dabei setzte der Effekt unmittelbar zum Applikationszeitpunkt ein und erstreckte sich über die restliche Aufnahmezeit von 17,87 Sekunden. Die Frequenz betrug 5 Hz (s. Abb.7). Da das System nicht in der Lage ist größere Datenmengen zu berechnen, konnte das Ende des Effekts nicht festgestellt werden. Weiterhin ist die kontinuierliche Ableitung von Nervenzellaktivität über mehrere Minuten bis Stunden aufgrund der Phototoxizität der Farbstoffe limitiert.

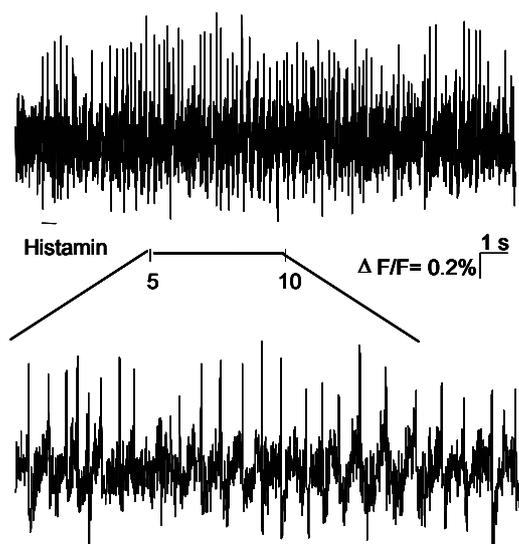


Abb.7: oben Die durch lokale Histamin-Applikation (schwarzer Balken) ausgelösten optischen Signale über einen Zeitraum von fast 18 Sekunden. **unten** Vergrößerter Auszug der Aktionspotentialentladung des darüber liegenden trace über einen Zeitraum von 5 Sekunden.

Mit Verlängerung der Applikationsgabe von 100 μ M Histamin (10 ms, 50 ms, 200 ms und 500 ms) konnte eine Erhöhung der Aktionspotentialentladungsfrequenz induziert werden. Diese Dosis-Wirkungsrelation (Abb.8) wurde in einer Versuchsreihe mit 38 Neuronen (5 Ganglien, 3 Patienten) erstellt. Die Frequenz wurde für alle Messungen mit der Anzahl der Aktionspotentiale, die ab Histaminapplikation über einen Zeitraum von 2,25 Sekunden generiert wurden, berechnet (Abb. 8).

3.2 Agonisten

Um die Pharmakologie der Histamin-induzierten Antworten zu studieren, wurde zunächst geprüft, ob selektive Agonisten für H₁-, H₂- und H₃- Rezeptoren in der Lage waren den exzitatorischen Effekt von Histamin zu imitieren. Dafür kamen folgenden Histamin-Rezeptor-Subtyp-Agonisten zum Einsatz: der H₁-Agonist HTMT-Dimaleat (10 µM), der H₂-Agonist Dimaprit (50 µM) und der H₃-agonist R(-)-α-Methylhistamin (1 µM) (s. auch *Material und Methoden, Pharmaka*). Alle drei Agonisten imitierten die Wirkung von Histamin (*Abb.8*).

Pharmakologie der Histaminantwort: Beteiligung der H₁-, H₂-, und H₃-Rezeptoren

Statistische Analysen der Wirkung der Histamin-Rezeptor-Agonisten ergaben, wie bei Histamin, keine signifikanten Korrelationen zwischen Agonist-sensitiven Zellen und Alter (P= 0,07 für den H₁-Agonist, P = 0,1 für den H₂-Agonist, P = 0,06 für den H₃-Agonist), Geschlecht (P = 0,28 für den H₁-Agonist, P = 0,42 für den H₂-Agonist, P = 0,1 für den H₃-Agonist) oder Darmregion (P = 0,08 für den H₁-Agonisten, P = 0,52 für den H₂-Agonisten, P = 0,45 für den H₃-Agonisten). Die Effektivität der Histamin-Rezeptor-Agonisten war, wie die des Histamins, unabhängig vom Erregungszustand der Agonist-sensitiven Neurone, da spontan aktive Zellen und unerregte Zellen gleich antworteten (P = 0,10 für den H₁-Agonist, P = 0,26 für den H₂-Agonist, P = 1,0 für den H₃-Agonist).

Spritzapplikation des H₁-Agonisten HTMT-Dimaleat induzierte in 341 Neuronen (43 Ganglien, 25 Patienten) Aktionspotentialentladungen mit einer durchschnittlichen Frequenz von $5,41 \pm 0,5$ Hz bei einer Spritzdauer von 500 ms. Es wurde eine Erhöhung der Spike-Entladung in zuvor spontan aktiven Zellen (n=10 Neurone, 4 Ganglien, 4 Patienten) erreicht. In diesen Zellen erhöhte HTMT-Dimaleat die Entladungsfrequenz signifikant (P= <0,0001) von $0,97 \pm 0,22$ auf $5,11 \pm 0,66$ Hz. In zuvor inaktiven Zellen induzierte HTMT-Dimaleat eine exzitatorische Aktivität in der Entladung von Aktionspotentialen mit einer durchschnittlichen Spike-Frequenz von $5,54 \pm 0,25$. Damit war in 29 ± 5 % der gemessenen Neurone ein exzitatorischer Effekt meßbar. Die durchschnittliche Zellzahl der abgeleiteten Ganglien betrug $7,9 \pm 0,63$ (Bereich 2-21). Insgesamt wurde die Wirkung des HTMT-Dimaleat an Neuronen des submukösen Plexus von 16 weiblichen (n= 263 Neurone, 29 Ganglien) und 9 männlichen (n= 78 Neurone, 14 Ganglien) Patienten untersucht. Wie auch bei

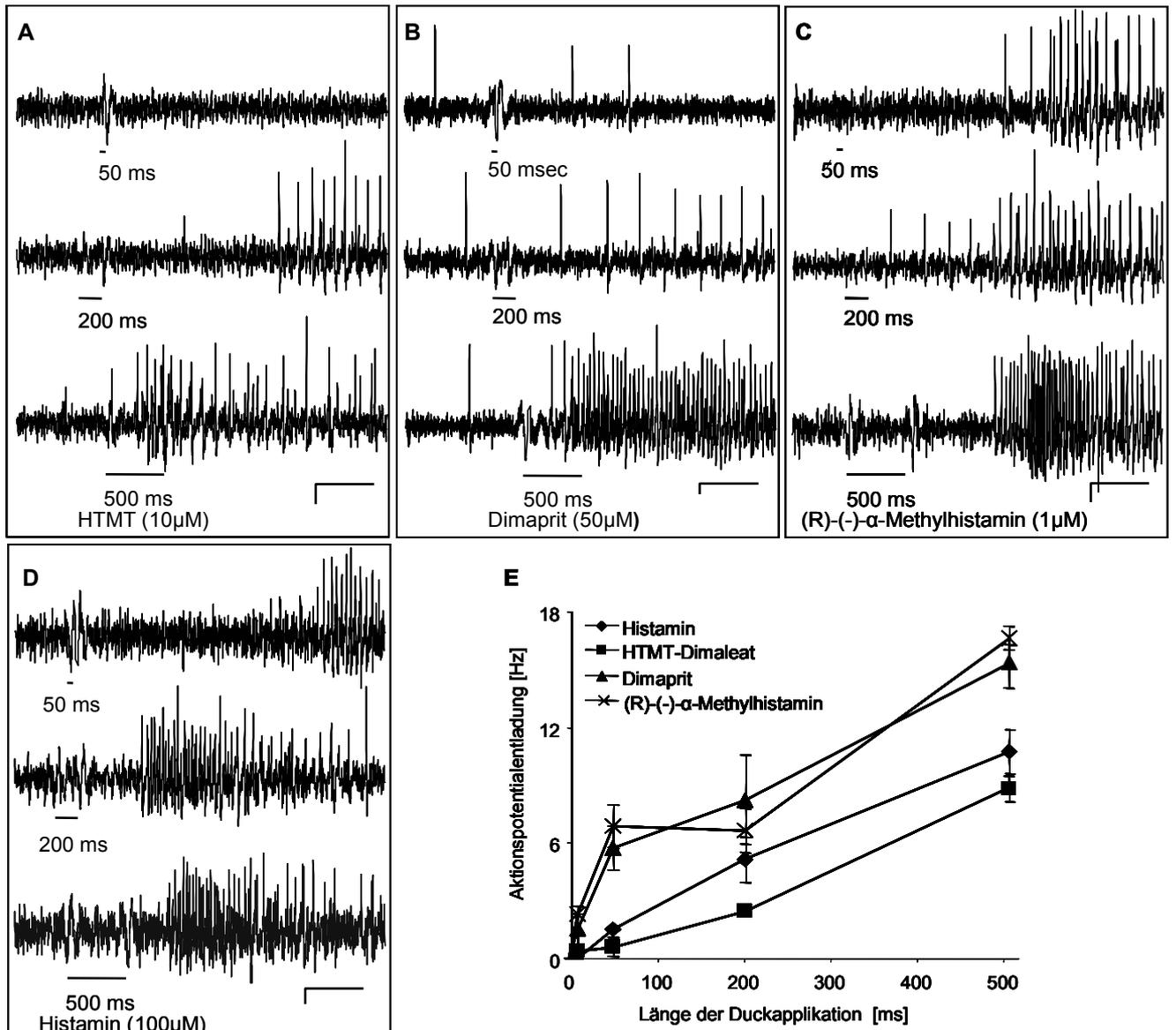


Abb. 7: Der H_1 -Agonist HTMT-Dimaleat (A), der H_2 -Agonist Dimaprit (B), der H_3 -Agonist (R)-(-)- α -Methylhistamin (C) und Histamin (D) induzierten eine dosis abhängige Aktionspotentialentladung (E). Die Reaktion von vier verschiedenen submukösen Neuronen auf die Druckapplikationen von 50 ms, 200 ms and 500 ms Histamin oder einer der entsprechenden Agonisten (schwarze Balken) werden hier dargestellt. Die vertikalen Anzeigebalken geben die Fluoreszenzänderung ($\Delta F/F = 0.1\%$) die horizontalen die Zeit (0.5 s) an. (E) Dosis-Wirkungskurven von Histamin und den Rezeptoragonisten nach Druckapplikationen von 10 ms, 50 ms, 200 ms und 500 ms (Die Datenpunkte zeigen Werte für $n = 11-25$ Neurone). Erhöhte Druckapplikationszeiten resultierten in einer Erhöhung der Entladung von Aktionspotentialen.

Histamin, resultierte eine Zunahme der Applikationsdauer des HTMT-Dimaleat in einer Zunahme der Frequenz von Aktionspotentialen. Diese Dosis-Wirkungsrelation

wurde in 25 Neuronen (3 Ganglien, 3 Patienten) durch Gabe von 10 ms, 50 ms, 200 ms und 500 ms HTMT-Dimaleat untersucht (s. Abb.7).

Die Wirkung am H₂-Rezeptor wurde mit dem selektiven H₂-Agonisten Dimaprit durchgeführt. Mit einer Konzentration von 50 µM in der Spritzpipette konnte in 24%±3 der untersuchten Neurone (n= 559 Neurone, 72 Ganglien, 36 Patienten) eine erregende Wirkung ermittelt werden. Die durchschnittliche Zellzahl der abgeleiteten Ganglien betrug dabei 7,8 ± 0,54 Neurone (Bereich: 2-23). Die Neurone reagierten auf Dimaprit mit einer durchschnittlichen Entladungsfrequenz von 12,52 ± 1,0 Hz. Es wurde eine Erhöhung der Spike-Entladung in zuvor spontan aktiven Zellen (n= 35 Neurone, 17 Ganglien, 11 Patienten) erreicht. In diesen Zellen erhöhte Dimaprit die Entladungsfrequenz signifikant (P= <0,0001) von 0,94 ± 0,66 auf 5,14 ± 0,76 Hz. In zuvor inaktiven Zellen induzierte Dimaprit eine exzitatorische Aktivität in der Entladung von Aktionspotentialen mit einer durchschnittlichen Spike-Frequenz von 16,02 ± 1,49.

Der Agonist R-(-)-α-Methylhistamin (1 µM) wurde zum Studium der H₃-Rezeptoren verwendet. Damit wurden Versuche an 619 Neuronen (70 Ganglien, 38 Patienten) durchgeführt. Es war unerwartet, dass die Neurone auf den H₃-Agonisten reagierten, da H₃-Rezeptoren bislang als präsynaptisch inhibitorische Rezeptoren bekannt

Tab.2: Übersicht der ermittelten Ergebnisse bei einer Spritzdauer von jeweils 500 ms mit Histamin und den Histamin H₁, H₂ und H₃-Rezeptor-Agonisten HTMT-Dimaleat (10µM), Dimaprit (50µM) und R-(-)-α-Methylhistamin (1µM). Die Effektivität war jeweils unabhängig vom Erregungszustand der Neurone, da spontan aktive Zellen und unerregte Zellen gleich antworteten.

	Histamin (100µM)	H ₁ -Rezeptor- Agonist HTMT Dimaleat (10µM)	H ₂ -Rezeptor- Agonist Dimaprit (50µM)	H ₃ -Rezeptor- Agonist R-(-)-α- Methylhistamin (1µM)
n-Zahl (Neurone, Ganglien, Präparate)	800, 117, 52	341, 43, 25	559, 72, 36	619, 70, 38
erregender Effekt durch Agonist	38%±2,8	29%±5,0	24%±3,0	36%±3,7
Durchschnittliche Zellzahl pro Ganglion	7,3±3,6	7,9±0,6	7,8±0,5	8,8±0,5
Zellzahl-Bereich	2-21	2-21	2-23	3-23
Durchschnittliche Entladungsfrequenz	7,8±0,4 Hz	5,4±0,5 Hz	12,5±1,0 Hz	13,5± 0,7 Hz
Entladungsfrequenz-Bereich	3-24 Hz	1,6-20 Hz	2,1-27 Hz	2,4-29 Hz

waren. Die Neurone feuerten durch Applikation von R-(-)- α -Methylhistamin Aktionspotentiale mit einer durchschnittlichen Frequenz von $13,51 \pm 0,71$ Hz. Dabei wurde eine Erhöhung der Spike-Entladung in zuvor spontan aktiven Zellen (n=26 Neurone, 10 Ganglien, 8 Patienten) erreicht. In diesen Zellen erhöhte R-(-)- α -Methylhistamin die Entladungsfrequenz signifikant ($P = <0,0001$) von $1,26 \pm 0,15$ auf $10,18 \pm 1,39$ Hz. In zuvor inaktiven Zellen induzierte R-(-)- α -Methylhistamin eine exzitatorische Aktivität in der Entladung von Aktionspotentialen mit einer durchschnittlichen Spike-Frequenz von $13,6 \pm 1,0$. Insgesamt reagierten $36\% \pm 3,7$ der Zellen auf den H_3 -Agonisten. Die durchschnittliche Zellzahl der bezüglich des H_3 -Agonisten untersuchten Ganglien betrug $8,84 \pm 0,54$ Neurone (Bereich:3-23).

3.3 Postsynaptischer H_3 -Rezeptor

Elektrophysiologische Experimente an enterischen Neuronen des Meerschweinchens zeigten, dass Histamin eine über H_3 -Rezeptor vermittelte, präsynaptisch hemmende Aktivität besitzt, die zu einer Reduktion der fEPSP-Amplitude führt (Tamura et al., 1988; Frieling et al., 1993). Diese Daten wurden erfolgreich im Plexus myentericus des Meerschweinchens reproduziert, um zeigen zu können, dass die verwendete Technik der optischen Messung in der Lage war, eine Hemmung von schnellen EPSPs detektieren zu können. $100 \mu\text{M}$ Histamin (79 Neurone, 10 Ganglien, 8 Versuchstiere) und $1 \mu\text{M}$ R-(-)- α -Methylhistamin (28 Neurone, 4 Ganglien, 4 Versuchstiere) blockierten, wie auch in der konventionellen Elektrophysiologie an Meerschweinchengewebe, die schnellen erregenden postsynaptischen Potentiale (fEPSP) von Neuronen des myenterischen Plexus, die durch elektrische Stimulation der interganglionären Faserstränge induziert wurden (s. Abb.9 A). Dabei betrug die Amplituden der fEPSP, ausgedrückt als relative Änderungen der Fluoreszenz, vor Histamin $2,16 \pm 0,09 \% \Delta F/F$ und in Histamin $0,17 \pm 0,03 \% \Delta F/F$ ($P=0,001$). Auch in R-(-)- α -Methylhistamin sanken die Werte signifikant von $1,05 \pm 0,07 \% \Delta F/F$ auf $0,21 \pm 0,05 \% \Delta F/F$ ($P=0,001$). Anders als im Meerschweinchen, zeigten sowohl der H_3 -Agonist als auch Histamin, keine inhibitorischen Effekte auf die fEPSPs im humanen submukösen Plexus (36 Neurone, 8 Ganglien, 4 Präparate) (s. Abb.9 C, 9 D). Die Amplituden der fEPSP blieben konstant in Histamin ($p=0,399$; $0,635 \pm 0,4 \% \Delta F/F$ versus $0,665 \pm 0,4 \% \Delta F/F$) und R-(-)- α -Methylhistamin ($p=0,311$; $0,422 \pm 0,2 \% \Delta F/F$ versus $0,424 \pm 0,2 \% \Delta F/F$). Zusätzlich wurde verifiziert, dass R-(-)- α -

Methylhistamin keinen erregenden Effekt auf Neurone des myenterischen Plexus von Meerschweinchen hat (Abb. 9 B).

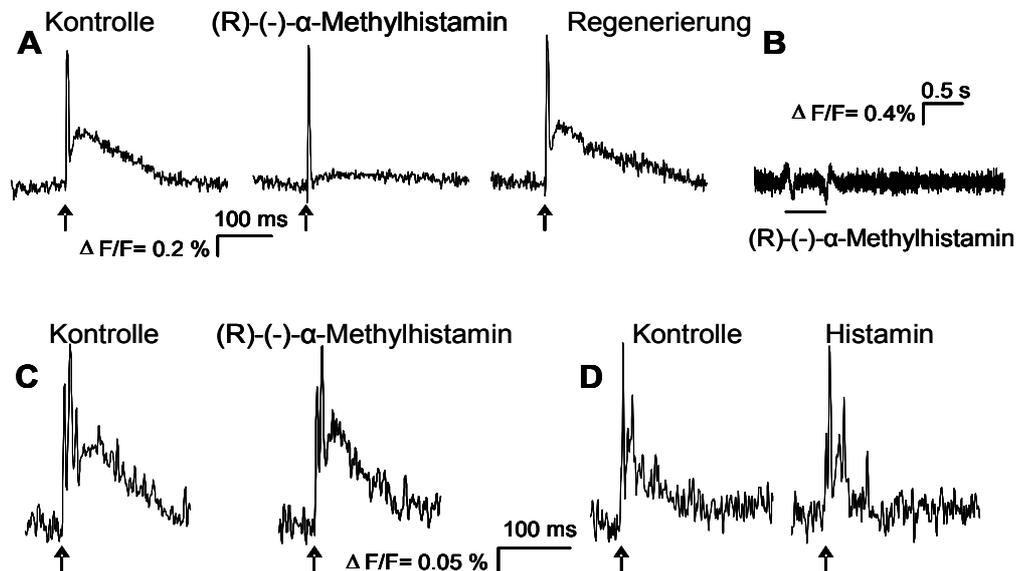


Abb.9: (R)-(-)-α-Methylhistamin blockierte fEPSPs von Meerschweinchen-Neuronen des myenterischen Plexus, hatte jedoch keinen Effekt auf fEPSPs von humanen Neuronen. **(A)** Elektrische Stimulation eines interganglionären Nervenstrangs (Pfeile) induzierte in einem Meerschweinchen-Neuron des myenterischen Plexus ein Summenaktionspotential gefolgt von einem fEPSP (linker trace). Das fEPSP verschwand nach Druckapplikation von (R)-(-)-α-Methylhistamin (mittlerer trace) und konnte nach einer Auswaschperiode wieder hergestellt werden (linker trace). **(B)** Druckapplikation von (R)-(-)-α-Methylhistamin induzierte keinen postsynaptischen Effekt in meerschweinchen Neuronen. **(C)** Elektrische Stimulation eines interganglionären Nervenstrangs (Pfeil) induzierte in einem humanen Neuron des submukösen Plexus ein Summenaktionspotential gefolgt von einem fEPSP (linker trace). Das fEPSP blieb durch die Druckapplikation von (R)-(-)-α-Methylhistamin unverändert (rechter trace). **(D)** Elektrische Stimulation eines interganglionären Nervenstrangs (Pfeil) induzierte in einem humanen Neuron des submukösen Plexus ein Summenaktionspotential gefolgt von einem fEPSP (linker trace). Das fEPSP blieb durch die Druckapplikation von Histamin unverändert (rechter trace).

Die durch lokale R(-)-α-Methylhistamin-Applikation ausgelösten optischen Signale wurden weiterhin nicht durch Calcium-depletierte Lösung beeinflusst (n=13 Neurone, 3 Ganglien, 2 Präparate). Da Calcium-depletierte Lösung nur die synaptische Übertragung blockiert, konnte damit die direkte postsynaptische Wirkung von R(-)-α-Methylhistamin nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden weiterhin durch Perfusion von Hexamethonium (200 μM) und ω-Conotoxin (500 μM) verifiziert. Weder der nikotinerge Antagonist Hexamethonium (10 Neurone, 3 Ganglien, 1 Präparat) noch der Calcium-Kanal-Blocker ω-Conotoxin (24 Neurone, 5 Ganglien, 3

Präparate) hemmten die exzitatorische Wirkung von (R)-(-)- α -Methylhistamin (s. Abb. 10). Die gemittelte Entladungsfrequenz von (R)-(-)- α -Methylhistamin betrug vor Perfusion von Hexamethonium $7,21 \pm 1,05$ Hz versus $7,16 \pm 1,10$ Hz in Hexamethonium ($200 \mu\text{M}$) und vor Perfusion von ω -Conotoxin $5,66 \pm 1,54$ Hz versus $5,00 \pm 1,39$ Hz in ω -Conotoxin ($500 \mu\text{M}$). Aufgrund der nicht-signifikanten Unterschiede ($P=0,970$ für (R)-(-)- α -Methylhistamin und Hexamethonium bzw. $P=0,109$ für (R)-(-)- α -Methylhistamin und ω -Conotoxin) war bestätigt, dass die Erregung nicht durch präsynaptische Transmitter-Freisetzung induziert ist, sondern durch Aktivierung postsynaptischer H_3 -Rezeptoren vermittelt wird.

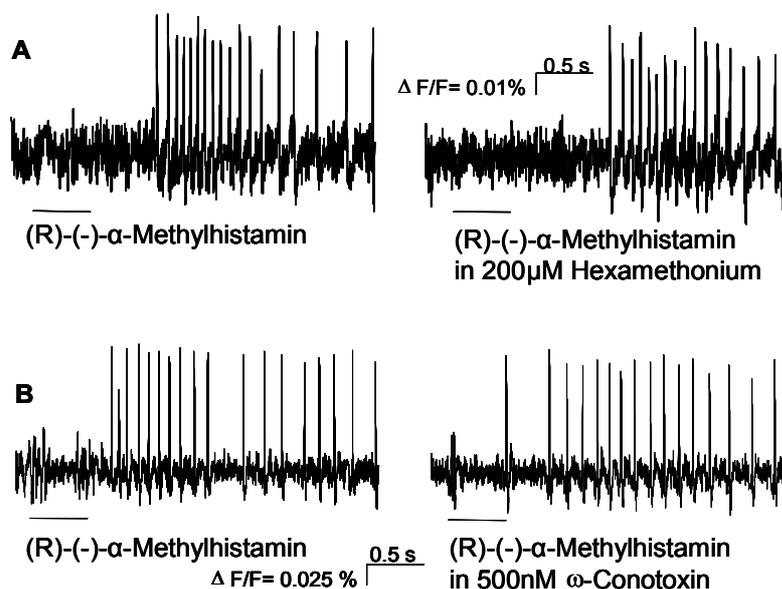


Abb. 10: Der erregende Effekt von (R)-(-)- α -Methylhistamin auf humane submuköse Neurone konnte weder durch den nikotinergen Antagonisten Hexamethonium (**A**) noch durch synaptische Blockade mit dem Calcium-Kanal-Blocker ω -Conotoxin (**B**) gehemmt werden.

3.4 Histamin-Rezeptor-Clustering

Histamin-Rezeptoren sind bei individuellen Neuronen in unterschiedlichen Kombinationen vertreten. Dieses Ergebnis erbrachte eine Versuchsreihe, die zur Ermittlung der Rezeptor-Verteilung durchgeführt wurde.

Bei paralleler Gabe von Histamin und dem H_1 -Agonisten auf dasselbe Ganglion zeigte sich beispielsweise, dass in 63 ± 9 % der Histamin-sensitiven Zellen HTMT-Dimaleat einen Effekt induzierte (34 Neurone, 4 Ganglien, 4 Präparate). Mikroapplikation des H_2 -Agonisten Dimaprit und Histamin generierte in 60 ± 4 % der Zellen einen Effekt auf den H_2 -Agonisten (87 Neurone, 15 Ganglien, 12 Präparate). Der H_3 -Agonist R(-)- α -Methylhistamin induzierte einen exzitatorischen Effekt in 82 ± 8 % der Zellen die auf Histamin reagierten (48 Neurone, 8 Ganglien, 5 Präparate) (Abb. 11).

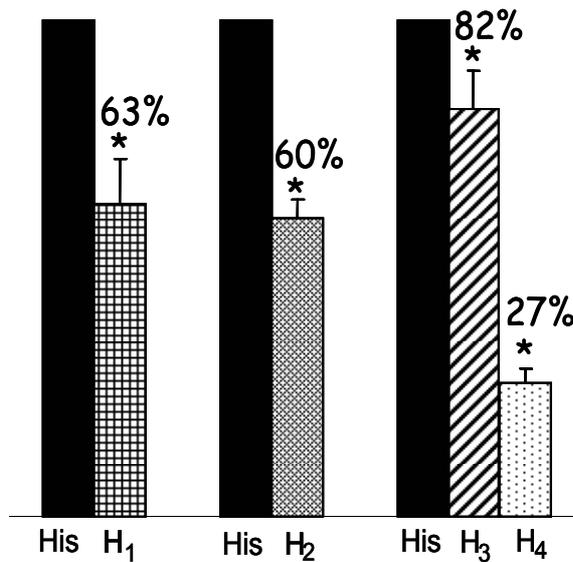


Abb. 11: Keiner der Agonisten induzierte eine Antwort zu 100% in Histamin-sensitiven Zellen. Applikation von Histamin und des H₁-Agonisten HTMT-Dimaleat (n= 4 Ganglien, 34 Neurone) zeigte eine Reaktion in 63% der Histamin-sensitiven Zellen durch HTMT-Dimaleat. Mikroinjektion von Histamin und des H₂-Agonisten Dimaprit (n= 16 Ganglien, 87 Neurone) belegte, dass 60% der Histamin-sensitiven Zellen durch Dimaprit aktiviert wurden. Applikation von Histamin und des H₃-Agonisten (n= 8 Ganglien, 48 Neurone) induzierte einen Effekt in 82% der Zellen die auf Histamin reagierten. Es wurde errechnet, dass 27% der Histamin-sensitiven Zellen auch 4-Methylhistamin-sensitiv waren (24 von 183 Neuronen, 12 Ganglien, 10 Präparate).

Dieses Verteilungsmuster verdeutlicht, dass keiner der Agonisten einen Effekt in allen Histamin-sensitiven Zellen induzieren konnte und impliziert dass die Rezeptoren in unterschiedlichen Rezeptor-Clustern vorkommen. Diese These wurde durch die Applikation der drei Agonisten in Kombination an 10 Ganglien (94 Neurone, 8 Patienten) untersucht und verifiziert.

41 von 94 Neurone antworteten auf mindestens einen der Agonisten. Die höchste Anzahl an Neuronen reagierte auf den H₁-Agonisten und den H₃-Agonisten, ohne jedoch auf den H₂-Agonisten Aktionspotentiale zu entladen (29 %). Die Neurone, die auf diese Agonisten-Kombination antworteten, wurden als H₁/H₃-Neurone bezeichnet. Sechs von sieben möglichen Kombinationen wurden detektiert. 27 % der Zellen reagierten ausschließlich auf den H₂-Agonist. In 20 % der Zellen konnten alle Histamin-Agonisten einen Effekt induzieren. 10 % antworteten ausschließlich den H₃-Rezeptor-Agonist. Die Kombination von H₁/H₂-Rezeptoren, als auch die Kombination von H₂/H₃-Rezeptoren, kam jeweils in 7% der untersuchten Zellen vor. Lediglich der ausschließlich durch den H₁-Rezeptor vermittelte Effekt fehlte (*Abb. 12*).

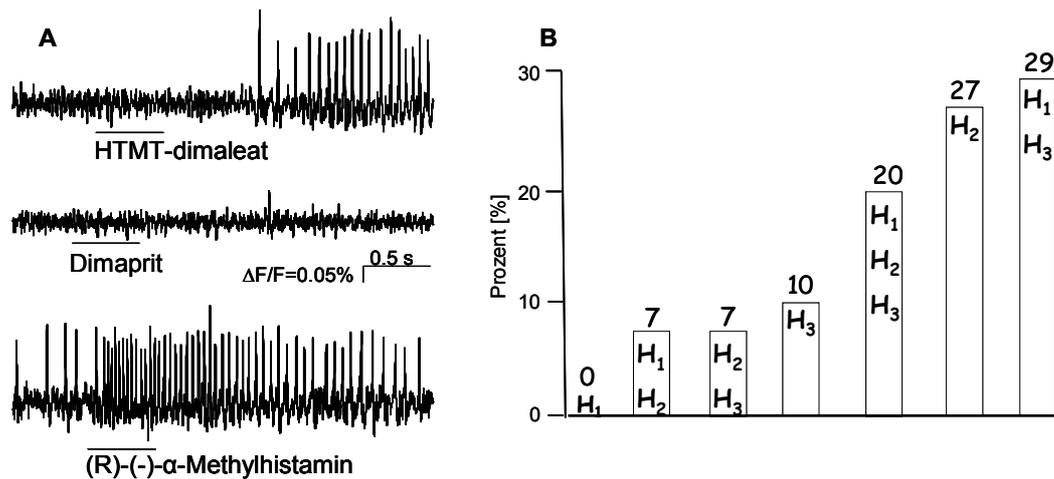


Abb. 10: Die neuronale Antwort durch die unterschiedlichen Histamin-Agonisten lässt auf ein bestimmtes Histamin-Rezeptor-Clustering schließen. (A) Ein Neuron des submukösen Plexus reagierte auf Spritzapplikation von 500 ms des H₁-Agonisten HTMT-Dimaleat, des H₃-Agonisten (R)-(-)-α-Methylhistamin jedoch nicht auf den H₂-Agonisten Dimaprit. Diese Variante wurde als H₁/H₃ deklariert. (B) Das Ergebnis einer solchen Versuchsreihe in 94 Neuronen von 10 Ganglien zeigte, dass die meisten Neurone (29 %) auf den H₁- und den H₃-Agonist antworteten, jedoch nicht auf den H₂-Agonisten. Alle möglichen Kombinationen, mit Ausnahme des ausschließlich über den H₁-Rezeptor-Agonisten vermittelten Effektes, wurden detektiert.

3.5 Antagonisten

Selektive H₁-, H₂- und H₃-Rezeptor-Antagonisten wurden eingesetzt um die Spezifität der Agonisten zu testen. Diese Studie wurde an 15 Präparaten von 11 Colon-Resektaten durchgeführt. Die Perfusion des H₁-Antagonisten Pylilamin (1 μM) reduzierte signifikant den Effekt von HTMT-Dimaleat von $5,4 \pm 2,2$ Hz auf $0,5 \pm 0,5$ Hz (n= 13 Neurone, 5 Ganglien, 5 Präparate). Dabei wurde der Effekt bei 9 Neuronen vollständig geblockt und bei 4 Neuronen auf jeweils 1 bis 3 Aktionspotentiale reduziert, was eine Verringerung der Aktivität um 85% bedeutete. Der selektive H₂-Antagonist Ranitidin (10 μM) blockierte komplett die Dimaprit induzierten Aktionspotentialentladungen. Die Frequenz verringerte sich von $14,1 \pm 5,8$ Hz auf 0 Hz (n= 22 Neurone, 5 Ganglien, 5 Präparate). Ebenfalls blockierte der H₃-Antagonist Clobenpropit (10 μM) den Effekt von (R)-(-)-α-Methylhistamin in fast allen untersuchten Neuronen (n= 25 Neurone, 8 Ganglien, 7 Präparate). Die Frequenz sank von $11,5 \pm 8,5$ Hz auf $0,1 \pm 0,2$ Hz. Die Effekte der Agonisten konnten teilweise nach einer Auswaschphase von 30 – 60 min regeneriert werden (s.Abb.13).

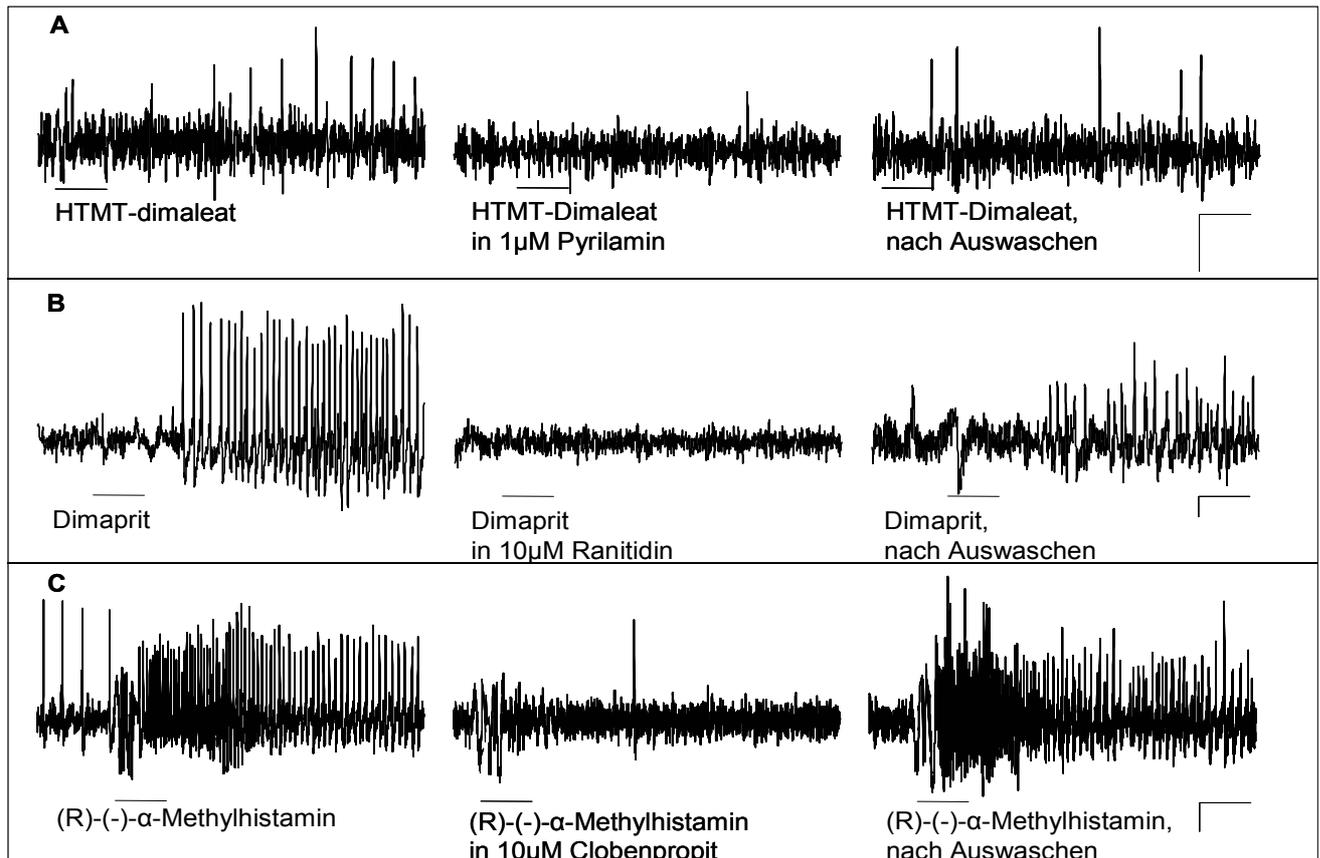


Abb. 11: Die durch Histamin-Rezeptor-Agonisten induzierte Aktionspotentialentladung konnte durch selektive Antagonisten blockiert werden. (A) Der Effekt des H_1 -Agonisten HTMT-Dimaleat wurde durch den H_1 -Antagonisten Pyloramin ($1 \mu\text{M}$) geblockt und nach einer Periode des Auswaschens wieder induziert. (B) Effekt des H_2 -Agonisten Dimaprit wurde durch den H_2 -Antagonisten Ranitidin geblockt ($10 \mu\text{M}$) und nach Auswaschen des Antagonisten wieder hergestellt. (C) Effekt des H_3 -Agonisten (R)-(-)- α -Methylhistamin wurde durch den H_3 -Antagonisten Clobenpropit ($10 \mu\text{M}$) geblockt und nach Auswaschen wieder erzeugt. Die Agonisten wurden durch Druckapplikation (schwarzer Balken) vor währen und nach Perfusion des Antagonisten angewendet. Maßstab (rechts im Bild) gibt horizontal die Zeit (0.5 s), vertikal die Änderung der Fluoreszenz ($\Delta F/F = 0.1\%$) an.

Eine weitere Versuchsreihe diente der Verifizierung der bislang erhaltenen Ergebnisse und der Untermauerung der spezifischen Wirkung der Agonisten und Antagonisten an den entsprechenden Histamin-Rezeptoren. Dafür wurden Kreuzreaktionsstudien durchgeführt. Die Antagonisten wurden jeweils für 20-40 min perfundiert, während die Agonisten für 500 ms druckappliziert wurden. Die Versuchsreihe erfolgte an 17 Ganglien ($n = 75$ Neurone, 10 Preparate) (s. Abb14). Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass die Wirkung des H_1 -Agonisten nicht durch den H_2 -Antagonisten ($p = 0,994$; $2,87 \pm 0,8$ Hz versus $2,88 \pm 1,1$ Hz) bzw. den H_3 -Antagonisten ($p = 0,195$; $9,9 \pm 9,4$ Hz versus $9,0 \pm 10,9$ Hz) unterbunden wurde, die

Wirkung des H₂-Agonisten nicht durch den H₁-Antagonisten ($p= 0,463$; $3,9 \pm 2,1$ Hz versus $4,3 \pm 1,7$ Hz) bzw. den H₃-Antagonisten ($p= 0,795$; $3,1 \pm 0,9$ Hz versus $3,0 \pm 0,1$ Hz) beeinflusst wurde und schließlich die Wirkung des H₃-Agonisten nicht durch den H₁-Antagonisten ($p= 0,054$; $8,8 \pm 2,6$ Hz versus $10,6 \pm 3,6$ Hz) bzw. dem H₂-Antagonisten ($p= 0,213$; $5,9 \pm 2,4$ Hz versus $6,6 \pm 3,4$ Hz) geblockt werden konnte (Abb. 14).

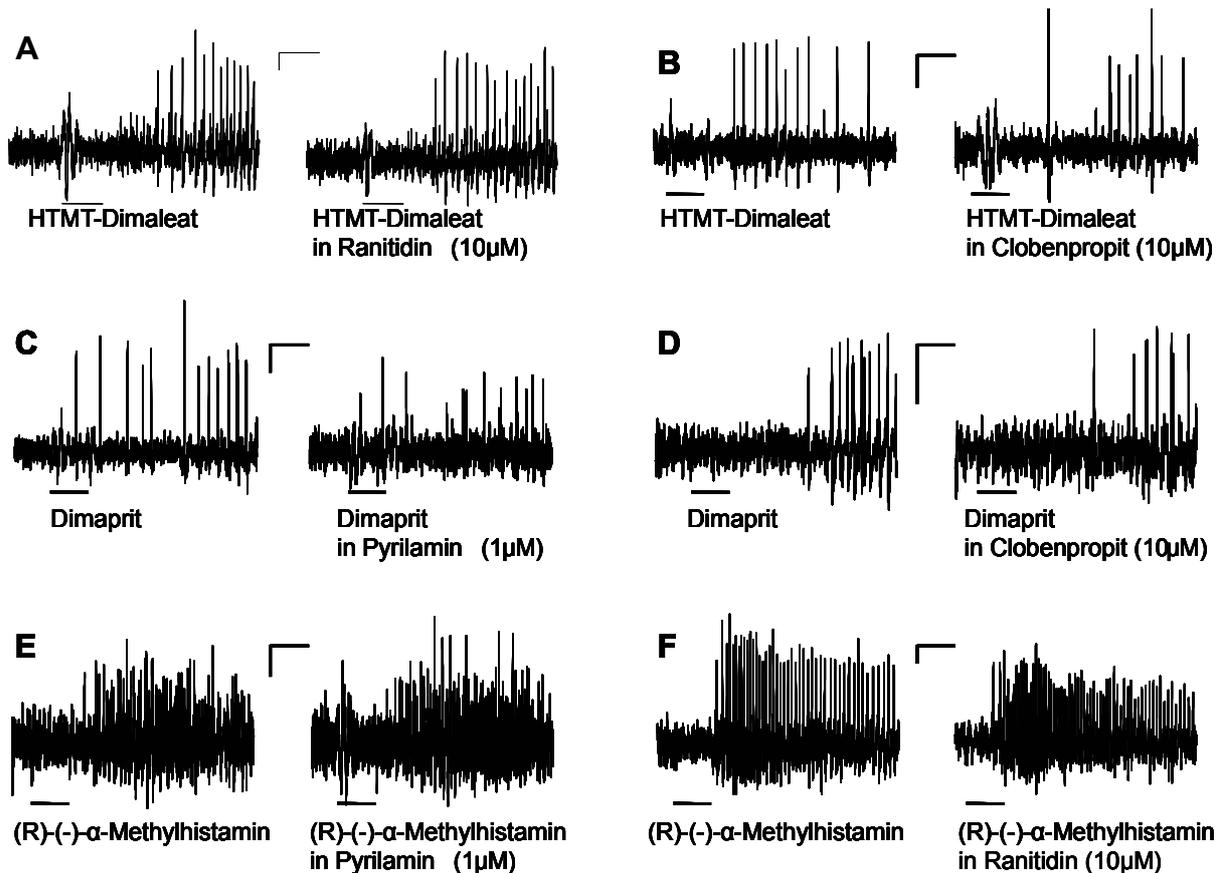


Abb.14: Kreuzreaktionsstudien an humanen submukösen Neuronen beweisen die Spezifität für H₁-, H₂- und H₃-Rezeptoren. Die durch Druckapplikation des H₁-Agonisten HTMT-Dimaleat (schwarzer Balken) induzierten Aktionspotentiale verblieben in Gegenwart des H₂-Antagonist Ranitidin (A) bzw. des H₃-Antagonisten Clobenpropit (B). Weiterhin wurden die Aktionspotentiale durch Druckapplikation des H₂-Agonisten Dimaprit nicht durch Perfusion des H₁-Antagonist Pylamin (C) oder des H₃-Antagonist Clobenpropit (C) blockiert. Druckapplikation des H₃-Agonisten (R)-(-)-α-Methylhistamin (schwarzer Balken) induzierte Aktionspotentiale, die nicht durch den H₁-Antagonisten Pylamin (E) noch den H₂-Antagonisten Ranitidin (F) geblockt wurden. Skalierungsbalken: x-Achse= 0.5 sek; y-Achse Änderung der Fluoreszenz $\Delta F/F= 0.1\%$. Die Dauer der Spritzapplikation betrug jeweils 0,5 sek.

3.6 H₃- und H₄-Rezeptor vermittelter Effekt

Bemerkenswert war die exzitatorische Wirkung bedingt durch Applikation des H₃-Agonisten (R)-(-)- α -Methylhistamin. Ein erregender, H₃-vermittelter Effekt wurde bislang nicht beschrieben. Im weiteren Verlauf der Arbeit stellte sich somit die Frage, ob der potentiell Histamin-H₃-medierte Effekt nicht wie bislang angenommen über H₃-Rezeptoren, sondern eventuell über den strukturverwandten H₄-Rezeptor vermittelt war. Clobenpropit wird als partieller Agonist mit geringer Affinität zum H₄-Rezeptor beschrieben und (R)- α -(-)-Methylhistamin ist ein schwach wirkender Ligand des humanen H₄-Rezeptors (Xie et al., 2005; Lim et al., 2005). Die geringe Konzentration von (R)-(-)- α -Methylhistamin (1 μ M in der Spritzpipette, entspricht 0,1 μ M effektiver Konzentration am Neuron, s. Methoden) machte eine Kreuzreaktion in diesen Versuchen jedoch unwahrscheinlich. Weiterhin kann ein Mitwirken von H₄-Rezeptoren durch (R)- α -(-)-Methylhistamin in dieser Studie ausgeschlossen werden, da der Effekt nicht durch Perfusion des spezifischen H₄-Rezeptor Antagonisten JNJ7777-120 mit Konzentrationen von 1 μ M (38 Neurone, 2 Ganglien, 2 Präparate), 10 μ M (75 Neurone, 4 Ganglien, 4 Präparate) oder 50 μ M (16 Neurone, 1 Ganglion, 1 Präparat) verändert wurde. Die durchschnittliche Frequenz der Aktionspotentialentladungen durch (R)- α -(-)-Methylhistamin betrug vor Perfusion von 1 μ M JNJ7777-120 $12,02 \pm 1,10$ Hz und während der Perfusion von 1 μ M JNJ7777-120 $12,72 \pm 0,91$ Hz und war somit nicht signifikant unterschiedlich ($P=0,633$). Das gleiche konnte bei Versuchen mit Perfusion von 10 μ M ($11,31 \pm 1,48$ Hz versus $10,79 \pm 1,35$ Hz; $P=0,769$) und 50 μ M ($8,83 \pm 1,82$ Hz versus $12,39 \pm 2,06$ Hz; $P=0,105$) JNJ7777-120 festgestellt werden.

Es folgte eine weitere Versuchsreihe, die zunächst die Existenz von H₄-Rezeptoren im submukösen Plexus feststellen sollte. Dabei wurde die, erst kürzlich als potenter und selektiver H₄-Agonist identifizierte (Lim et al., 2005), früher hauptsächlich zum Studium des H₂-Rezeptors verwendete Substanz, 4-Methylhistamin und Clobenpropit auf mehrere Ganglien appliziert. Druckapplikation von 4-Methylhistamin erregte eine kleine Zahl von humanen submukösen Neuronen (*Abb. 15*). Ohne Ranitidin in der Perfusionslösung induzierte die Druckapplikation von 10 μ M 4-Methylhistamin Aktionspotentialentladungen in 26 % der Neurone (6 von 26 Neuronen, 2 Ganglien, 2 Präparate). Diese Verhältnis stieg auf 38 % mit 500 ms Applikation von 50 μ M 4-Methylhistamin (5 von 14 Neurone, 2 Ganglien, 2 Präparate). Blockade der H₂-Rezeptoren durch Perfusion mit 10 μ M Ranitidin reduzierte die Zahl der Neurone die

auf 500 ms Applikation von 10 μM oder 50 μM 4-Methylhistamin reagierten auf 3,8 % (3 von 79 Neuronen, 7 Ganglien, 4 Präparate) bzw. 8 % (7 von 88 Neuronen, 8 Ganglien, 4 Präparate). Die gemittelte Frequenz der Aktionspotentialentladungen nach Applikation von 4-Methylhistamin betrug $3,9 \pm 0,7$ Hz ohne Ranitidin und $1,2 \pm 0,3$ Hz in Ranitidin. Die 4-Methylhistamin-induzierten Antworten, die trotz Perfusion von Ranitidin ermittelt wurden, waren nach Perfusion des H_4 -Rezeptor Antagonisten JNJ7777-120 bei Konzentrationen von 10 μM und 50 μM vollständig geblockt (16 Neurone, 6 Ganglien, 6 Präparate, jeweils 0 Hz), jedoch nicht bei einer Konzentration von 1 μM JNJ7777-120 (4 Neurone, 2 Ganglien, 2 Präparate; $2,13 \pm 0,67$ Hz versus $2,05 \pm 0,62$ Hz; $P = 0,857$) (Abb. 15).

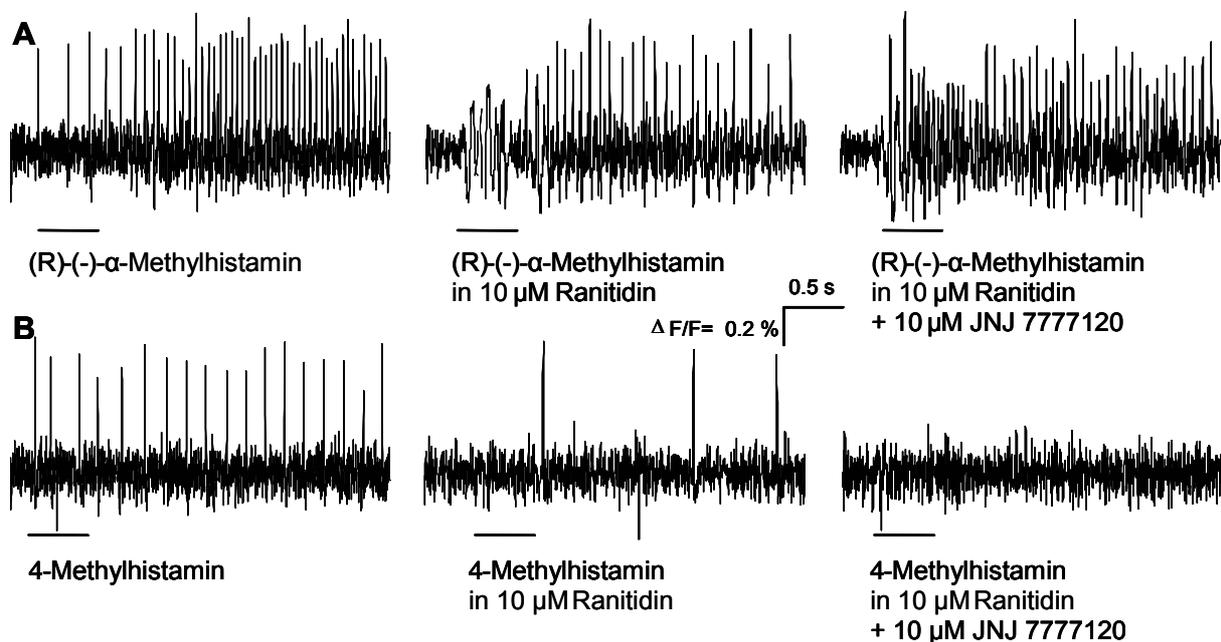


Abb. 15: H_3 - und H_4 -Rezeptor vermittelte Erregungen im humanen submukösen Plexus waren Rezeptor-spezifisch. **A)** Die durch Spritzapplikation des H_3 -Agonisten (R)-(-)- α -Methylhistamin (500 ms) induzierten Aktionspotentialentladungen (*links*) konnten nicht durch Perfusion des H_4 -Antagonisten JNJ7777-120 (10 μM) blockiert werden (*rechts*). **B)** Spritzapplikation des H_4 -Agonisten 4-Methylhistamin induzierte Aktionspotentiale bei identischen Neuronen (*links*). Die Antwort wurde durch den H_2 -Antagonisten Ranitidin reduziert aber nicht geblockt (*mitte*). Zusätzliche Perfusion des H_4 -Antagonisten JNJ7777-120 blockierte komplett die durch 4-Methylhistamin induzierte Erregung (*rechts*). Die Ausschläge in manchen Abbildungen während der Spritzapplikation des Agonisten sind Spritzartefakte bedingt durch leichte Bewegungen.

Spritzapplikation von 10 μM Clobenpropit induzierte keinen Effekt ($n = 43$ Neurone, 4 Ganglien, 2 Präparate), aber in 8 von 91 Neuronen (8 Ganglien, 3 Präparate) konnte ein erregender Effekt nach Spritzapplikation mit hohen Konzentrationen von

Clobenpropit (50 μM) festgestellt werden. Die gemittelte Frequenz der Aktionspotentialentladungen nach Applikation von Clobenpropit betrug $2,76 \pm 0,4$ Hz. Damit induzierte 50 μM Clobenpropit in $13 \pm 5\%$ der gemessenen Neurone einen erregenden Effekt. Ohne Ranitidin in der Krebslösung erzielten 10 μM Clobenpropit in 8% der Zellen, 50 μM Clobenpropit in 24% der Zellen und 100 μM Clobenpropit in 2% der jeweils abgeleiteten Ganglien einen erregenden Effekt.

Druckapplikation des H_4 -Agonisten (50 μM) 4-Methylhistamin und des H_3 -Agonisten R(-)- α -Methylhistamin (1 μM) auf identische Neurone (189 Neurone, 15 Ganglien, 9 Präparate) in Gegenwart von Ranitidin in der Perfusionslösung, bestätigen weiter den Befund der Existenz von H_3 - und H_4 -Rezeptoren (*Abb. 15*). Der H_4 -Rezeptor Agonist 4-Methylhistamin induzierte in 24 dieser Neurone einen Effekt, wohingegen der H_3 -Agonist R(-)- α -Methylhistamin einen Effekt in 81 dieser Neurone induzierte. Interessanterweise, antworteten alle Zellen die auf den H_4 -Agonisten antworteten, auch auf den H_3 -Agonisten, aber nicht umgekehrt. Somit erfolgte eine H_4 -Rezeptor-vermittelte Erregung in 13 % der humanen submukösen Neurone (24 von 189 Neuronen, 15 Ganglien, 9 Präparate). Es wurde errechnet, dass 27 % der Histaminsensitiven Zellen 4-Methylhistamin-sensitiv waren (*s. Abb 11*).

Diese Ergebnisse und die vorherigen Experimente erlauben drei Rückschlüsse. 1. Der erregende Effekt auf R(-)- α -Methylhistamin ist tatsächlich über H_3 -Rezeptoren vermittelt. 2. Die Aktivierung von H_4 -Rezeptoren führt zu exzitatorischen Antworten bei Neuronen des humanen submukösen Plexus. 3. Eine kleine Gruppe H_3 -sensitiver Neurone werden durch den H_4 -Agonisten aktiviert.

IV Diskussion

Im Zusammenhang mit Neuroimmun-Interaktionen im Magen-Darm-Trakt existieren zahlreiche Berichte, die den Effekt von Entzündungsmediatoren auf enterische Nerven beschreiben (Mayer und Wood, 1975; Frieling et al., 1999; Sharkey et al., 2002; Mawe et al., 2004). Die Befunde der immuno-neuronalen Kommunikation basieren jedoch hauptsächlich auf Untersuchungen an Tiermodellen, deren Ergebnisse nicht unmittelbar auf Humanpräparate übertragbar sind. Studien aus unserem Versuchslabor belegen eine immuno-neuronale Modulation humaner enterischer Neurone (Breunig et al., 2003, Schemann et al., 2004), die unter anderem durch die Applikation eines Mastzellcocktails zur Aktivierung humaner enterischer Neurone führte (Schemann et al., 2005). Die vorliegende Arbeit belegt, dass Histamin humane submuköse Neurone erregt und führte zur Identifizierung der an der Histamin-induzierten Erregung beteiligten Histamin-Rezeptor-Subtypen. Alle Histamin (H_1 -, H_2 -, H_3 - und H_4 -) Rezeptoren sind an der erregenden Antwort beteiligt. In vergleichbaren Studien an Meerschweinchen-Neuronen des submukösen Plexus (Frieling et al., 1993) waren, die durch Histamin induzierten erregenden Effekte über den H_2 -Rezeptor generiert, da sie mit dem H_2 -Antagonisten Cimetidin blockiert und mit dem H_2 -Agonisten Dimaprit ausgelöst werden konnten. Der Befund, dass H_2 -Rezeptor-Agonisten den Effekt von Histamin auf humane enterische Neurone imitieren, ist somit Deckungsgleich mit Befunden aus elektrophysiologischen und histo-chemischen Untersuchungen, die an einzelnen enterischen Meerschweinchen-Neuronen des submukösen und myenterischen Plexus durchgeführt wurden (Nemeth et al., 1984; Frieling et al., 1994). Bei einigen Meerschweinchen-Neuronen des myenterischen Plexus wurde weiterhin eine durch den H_1 -Rezeptor vermittelte Komponente der Histamin-Antwort beschrieben (Nemeth et al., 1984). Wir schließen daraus, dass Histamin im humanen enterischen Nervensystem eine mögliche neuronale Aktivität besitzt. Die unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften der Histamin-Rezeptoren spielen dabei eine entscheidende Rolle.

Alle verwendeten Histamin-Rezeptor-Liganden zeichneten sich durch eine hohe Affinität zu ihren jeweiligen Rezeptoren aus (s. Material und Methoden). Um trotzdem unspezifische Wirkungen an anderen Rezeptoren auszuschließen, war es wichtig die Histamin-Rezeptor-Liganden in Kombination mit ihren Antagonisten zu testen und in Konzentrationen einzusetzen, die ihre Affinität zum Rezeptor widerspiegeln. Zu diesem Zweck wurden Studien mit selektiven Antagonisten der H_1 -, H_2 - und H_3 -

Rezeptoren (Pyrilamin, Ranitidin, Clobenpropit) durchgeführt, die zeigten, dass die neurophysiologischen Effekte durch die entsprechenden Agonisten vermittelt waren. Zusätzlich bewiesen die durchgeführten Kreuzreaktionsstudien an humanen submukösen Neuronen die Spezifität für H₁-, H₂- und H₃-Rezeptoren. Aufgrund unseres Versuchsaufbaus werden die pharmakologischen Substanzen 1:10 verdünnt bis sie ein Ganglion erreichen.

Die durchgeführten Kreuzreaktions-Studien und die Tandem-Experimente geben Grund zu der Annahme, dass die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen zur Entschlüsselung der Histamin-Rezeptoren angemessen waren- zumindest bezüglich des humanen submukösen Plexus und der angewandten Versuchsmethode.

Neben der hohen Beteiligung von H₁-Rezeptoren und der Entschlüsselung einer exzitatorisch neuronalen Komponente von H₄-Rezeptoren, war eines der überraschenden Ergebnisse der Befund, dass H₃-Rezeptoren erregende Effekte im humanen submukösen Plexus induzierten. Der über H₃-Rezeptoren generierte Effekt war insofern von besonderer Bedeutung, da die H₃-sensitiven Zellen die größte Population Histamin-sensitiver Zellen darstellten und die exzitatorischen Effekte mit Konzentrationen erreicht wurden die, 10-100 fach geringer waren, als die Konzentrationen der anderen Agonisten. Im Gegensatz zum enterischen Nervensystems des Meerschweinchens, in dem die Aktivierung des H₃-Rezeptors zu einer präsynaptischen Hemmung führt (Tamura et al., 1988; Coruzzi et al., 1991, Poli et al., 1991, Bertaccini et al., 1995), induziert die Aktivierung des H₃-Rezeptors im ENS des Menschen einen postsynaptischen erregenden Effekt. Die hier dargelegten Ergebnisse postulieren, dass humane enterische Neurone des submukösen Plexus postsynaptisch lokalisiert sind und erregende Effekte modulieren. Folgende Befunde sprechen dafür, dass die (R)- α -(-)-Methylhistamin induzierten Erregungen tatsächlich H₃-spezifische Effekte sind: 1. H₁-, H₂- oder H₄-Antagonisten hatten keinen Einfluss auf die (R)- α -(-)-Methylhistamin-induzierte Antwort. 2. Versuche bei denen H₁-, H₂- und H₃-Agonisten auf identische Neurone appliziert wurden, ergaben unterschiedliche Rezeptor-Kombinations-Muster, wodurch Kreuzreaktionen auszuschließen sind. 3. Hochfrequente Aktionspotentiale wurden durch den H₃-Agonisten (R)- α -(-)-Methylhistamin induziert und den H₃-Antagonisten Clobenpropit vollständig blockiert. 4. Interaktionen mit dem strukturverwandten H₄-Rezeptor können ausgeschlossen werden, da der spezifische H₄-Antagonist JNJ7777120 keinen Einfluss auf die Antwort des H₃-Agonisten zeigte und Co-Applikation von H₃-

und H₄-Agonisten auf identische Neurone ergab, dass eine größere Anzahl von Neuronen auf den H₃-Agonisten antworteten, als auf den H₄-Agonisten.

Bislang wurde ein H₃-vermittelter Effekt auf die neuronale Aktivität ausschließlich als hemmend beschrieben, oft mit einer präsynaptischen Lokalisation des H₃-Rezeptors. Dies gilt für Studien an Neuronen des Gehirns und enterischen Neuronen des Meerschweinchens, bei denen eine Aktivierung des H₃-Rezeptors in der Hemmung von Transmitter-Freisetzung resultierte, mit der Folge einer Abnahme der fEPSP Amplitude (Nemeth et al., 1984; Frieling et al., 1993; Haas et al., 2003).

Unsere Befunde demonstrieren, dass weder Histamin noch (R)- α -(-)-Methylhistamin eine hemmende Wirkung auf die elektrisch induzierten fEPSPs des humanen submukösen Plexus hatten. Ein methodischer Fehler bezüglich der Empfindlichkeit des optischen Systems kann weiterhin ausgeschlossen werden, da die Applikation des H₃-Agonisten R-(-)- α -Methylhistamin auf Neurone des myenterischen Plexus aus Meerschweinchen eine Unterdrückung der fEPSPs induzierte.

Durch Versuche mit Calcium-depletierter Lösung, die die synaptische Übertragung blockiert, konnte die direkte postsynaptische Wirkung von R-(-)- α -Methylhistamin nachgewiesen werden. Weiterhin wurden die durch R-(-)- α -Methylhistamin (1 μ M) induzierten Aktionspotentialentladungen weder durch die Perfusion des nikotinergeren Antagonisten Hexamethonium (200 μ M) gehemmt, noch durch die Perfusion des Calcium-Kanal-Blockers ω -Conotoxin (500 nM) blockiert. Diese Ergebnisse validieren den Befund eines postsynaptischen H₃-Rezeptors.

Diesbezüglich scheint das humane ENS einzigartig zu sein, da bislang alle neuronalen H₃-Rezeptor vermittelten Effekte durch eine präsynaptische Komponente moduliert wurde. Es gibt jedoch Hinweise auf eine postjunctionale Lokalisation von H₃-Rezeptoren z.B. in Muskeln des Gastrointestinaltraktes (Bertaccini et al., 2000) sowie in der Gefäß- (Ea-Kim et al., 1992, Djuric et al., 1995) und Lungenmuskulatur (Guc et al., 1988; Burgaud et al., 1993; Cardell et al., 1994 Delaunois et al., 1995), wo man sie in Endothel- und Epithelzellen oder in Muskelzellen vorfindet. In allen Beispielen jedoch modulieren sie hemmende Effekte. Mit der Identifizierung einiger Isoformen des H₃-Rezeptors (Hancock et al., 2003; Bakker et al., 2004) und von der Spezies abhängigen pharmakologischen Heterogenität der H₃-Rezeptoren (Ireland-Denny et al., 2001), könnte eine H₃-Rezeptor vermittelte, erregende Wirkung, wie sie hier beschrieben wird, bald molekularbiologisch verifiziert sein.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Sander et al., wurde eine Expression von H₁-, H₂- und H₄- Rezeptoren, nicht jedoch von H₃-Rezeptoren, im humanen Darm dargelegt (Sander et al., 2005). Es gibt keine Erklärung für die Diskrepanz bezüglich der nicht vorhandenen H₃-Rezeptoren in der Studie von Sander und der über H₃-Rezeptoren vermittelten neuronalen Aktivität in der vorliegenden Studie. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die relativ geringe Expression des H₃-Rezeptors, oder einer H₃-Rezeptor-Isoform der Proben, die der Sander-Studie benutzt wurden, nicht erkannt wurden. Es ist wichtig hinzuzufügen, dass die Studie auf Proben zweier Patienten basierte, wobei eine Probe die Kontrolle darstellte und die andere von einem Patienten mit Reizmagen (IBS) stammte (Sander et al., 2005).

Unsere Studie zeigt erstmals die potentielle Existenz von H₄-Rezeptoren in Ganglien des submukösen Plexus des menschlichen Darms. Beweise dafür liefern Versuche mit dem H₄-Agonisten 4-Methylhistamin, der in Anwesenheit von Ranitidin zur Blockade der H₂-Rezeptoren, auf enterische Ganglien appliziert, in mehreren Neuronen Aktionspotentialentladungen induzierte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Effekt von 4-Methylhistamin durch JNJ7777-120 signifikant blockiert wurde. JNJ7777-120 konnte den Effekt von R-(-)- α -Methylhistamin jedoch nicht blockieren, was zu dem Schluss führt, dass sowohl H₃- als auch H₄-Rezeptoren an der Histamin-induzierten Antwort beteiligt sind. Unsere Studien zeigen erstmals die Effekte von Histamin auf humane enterische Neurone. Widersprüchlich zu den Befunden aus Meerschweinchen moduliert Histamin seine Aktivität im humanen enterischen Nervensystem über H₁-, H₂-, H₃- und H₄-Rezeptoren. Der erregende Effekt von Histamin könnte ein Grund von Funktionsstörungen der Motilität und Sekretion bei funktionellen und entzündlichen Darmerkrankungen sein. Die humanspezifische Pharmakologie von Histamin, vor allem der Beteiligung von H₃- und H₄-Rezeptoren, öffnet neue Wege für therapeutische Strategien zur Behandlung von Darmkrankheiten.

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Studie war die pharmakologische Identifizierung bestimmter Subpopulationen von humanen submukösen Neuronen. Diese wurden aufgrund von Reaktions-Mustern auf verschiedene Histamin-Rezeptor-Agonisten charakterisiert. Histamin-Rezeptoren individueller Neurone traten in unterschiedlicher Kombination der H₁-, H₂-, und H₃-Rezeptoren auf. Dies führte zu der Frage, ob Histamin-Rezeptoren in bestimmten Histamin-Rezeptor-Klustern organisiert sind. Um diese pharmakologischen Ergebnisse zu erzielen, waren jedoch

relativ lange Aufnahmezeiten nötig. Somit sind toxische Einflüsse des spannungsensitiven Farbstoffes auf die Funktion einzelner Subpopulationen nicht auszuschließen. Eine funktionelle Bedeutung von sogenannten Histamin-Rezeptor-Klustern im enterischen Nervensystem wurde bislang nicht untersucht.

Neben der gründlich dokumentierten direkten Wirkung von Histamin auf Zielorgane, gilt es zukünftig die spezifische Wirkung von enterischen Histamin-Rezeptoren auf die Darmfunktion zu behandeln. Die vorliegende Studie legt nahe, dass alle vier Rezeptoren berücksichtigt werden sollten, wenn es gilt, die funktionelle Bedeutung neuronal vermittelter Histamin Reaktionen im humanen Darm zu ermitteln. Da in der vorliegenden Arbeit die Effekte von Histamin auf Neurone des submukösen Plexus untersucht wurden, sollten die zukünftigen Zielgewebe Epithelzellen, Gefäßmuskulatur oder Immunzellen darstellen. Während einerseits den Neuronen des humanen Darms eine Rolle der Mastzellmediator-induzierten Ionensekretion zugesprochen wurde (Crowe et al., 1993), widerlegen andere einen Einfluss von enterischen Neuronen, aufgrund einer TTX-Unempfindlichkeit der Histamin-Antwort (Keely et al., 1995). Diese Studien basierten auf direkt vermittelter Histamin-Einwirkung. Es könnte erstrebenswert sein, diese Versuche auszubauen, indem neural vermittelte Effekte nach lang anhaltender Histaminapplikation untersucht werden. Diese würden dann chronische Histamin-Konzentrationen bei entzündlichen Darmerkrankungen widerspiegeln. Ähnliche Versuche in Meerschweinchen-Colon belegten deutlich, dass Histamin zyklische Steigerungen der Ionensekretion auslöste, die wiederum eine Erregung enterischer Neurone verursachte (Cooke et al., 1995).

Aufgrund des klinischen Erfolgs der H₁- und H₂-Antagonisten, werden nun ähnliche Erwartungen an die gezielte Pharmakotherapie mit H₃- und H₄-Antagonisten gestellt (Leurs et al., 2005). Bislang wurden H₄-Rezeptoren hauptsächlich in Zusammenhang mit Immunzellen lokalisiert und ihre Beteiligung an der Regulation von Immunreaktionen ist weitgehend gesichert (Thurmond et al., 2004). H₄-Rezeptor-Antagonisten könnten eine neue pharmakologische Methode darstellen, um Dickdarmentzündungen zu behandeln. Die Anschaulichkeit in der Histamin-Rezeptor Expression von Patienten mit Lebensmittel- und entzündlichen Darmerkrankungen (IBS), besonders ein Anstieg der H₁- und H₂-Rezeptor mRNA Spiegel, unterstreichen potentiell den klinischen Nutzen von Arzneimitteln, die an histaminergen Signalkaskaden wirken (Sander et al., 2005). Die Ergebnisse der Histamin-

vermittelten neuronalen Aktivität und die human-spezifische Pharmakologie dieser Studie, könnte helfen, solche Medikamente zu entwickeln.

V Zusammenfassung

Mastzellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese entzündlicher und funktioneller Erkrankungen des Magen-Darmtraktes. Über Mastzellmediatoren, insbesondere Histamin, werden Neuroimmun-Interaktionen gesteuert, die neural vermittelte Funktionsstörungen hervorrufen. Diese Arbeit galt der Untersuchung der bisher unbekanntem Wirkung von Histamin auf das humane enterische Nervensystem (ENS) mit Hilfe einer hochauflösenden Neuro-Imaging Technik an pathologisch unauffälligen Darmresektaten von über 100 Patienten. Histamin induzierte in 37% der untersuchten enterischen Nervenzellen (800 Neurone, 109 Ganglien, 52 Präparate) eine direkt vermittelte, lang anhaltende erregende Wirkung mit Aktionspotentialentladungen. Diese aktivierende Wirkung konnte durch den H₁-Agonist HTMT-Dimaleat (43 Ganglien), den H₂-Agonisten Dimaprit (72 Ganglien), den H₃-Agonisten R-(-)-alpha-Methylhistamine (70 Ganglien) sowie den H₄-Agonisten (12 Ganglien) nachgeahmt, und durch die H₁-, H₂-, H₃- und H₄-Antagonisten Pylilamin, Ranitidin, Clobenpropit und JNJ7777120 blockiert werden. Applikation der Rezeptoragonisten in Kombination erlaubte Rückschlüsse auf die funktionelle Rezeptorausstattung im humanen ENS. Sechs von sieben möglichen Expressionsmustern wurden ermittelt: die Kombinationen aus H₁/H₃-Rezeptor (29% der gemessenen Zellen), H₁/H₂-Rezeptor (7%), H₂/H₃-Rezeptor (7%) und H₁/H₂/H₃-Rezeptor (20%). Mit Ausnahme der Wirkung am H₁-Rezeptor, wurden sowohl Wirkungen am H₂-Rezeptor (27%), als auch am H₃-Rezeptor (10%) unabhängig weiterer Kombinationen detektiert. Eine hemmende Wirkung von Histamin wurde nicht beobachtet.

Diese Ergebnisse belegen erstmals Effekte von Histamin in humanen enterischen Nervenzellen. Im Gegensatz zu Befunden in Tiermodellen wird im humanen ENS die aktivierende Histaminwirkung über H₁-, H₂-, H₃- und H₄-Rezeptoren vermittelt. Die erregende Wirkung von Histamin könnte die Ursache für die, mit funktionellen und entzündlichen Erkrankungen assoziierten, Störungen der Motilität und Sekretion sein. Die human-spezifische Pharmakologie der Histaminwirkung, insbesondere die Beteiligung von H₃- und H₄-Rezeptoren, eröffnet Ansätze für neue therapeutische Strategien zur Behandlung von Magen-Darmstörungen.

Summary

The enteric nervous system and the immune system are integrated systems that play an important role in the regulation of gastrointestinal functions. So far the effect of histamine on neural activity in the human submucous plexus has not been established. To record activity of nerve cells with high spatial and temporal resolution we applied a fast NeuroImaging technique on ganglia of the human submucous plexus from macroscopically normal preparations of more than 100 patients who underwent surgery for primarily cancer. Histamine was applied directly onto a single ganglion by brief pressure microejection (50-500 ms) from a spritz pipette (100 μ M histamine). Histamine evoked a long lasting excitatory effect consisting of action potential discharge in 37% of the examined neurons (800 neurons, 109 ganglia, 52 preparations). This effect was mimicked by the H₁-agonist HTMT-dimaleat (43 ganglia), the H₂-agonist dimaprit (72 ganglia), the H₃-agonist (R)-(-)-alpha-methylhistamine (70 ganglia) and the H₄-Agonist 4-methylhistamine (12 ganglia) The resulting action potential discharges induced by either one of the agonists could be blocked by the specific antagonists pyrilamine, ranitidine, clobenpropit or JNJ777-120. Application of histamine receptor agonists in combination gave evidence of a certain histamine receptor cluster at human submucous neurons. Six out of seven possible combinations occurred: the combinationen of H₁/H₃ receptor (29%), H₁/H₂ receptor (7%), H₂/H₃ receptor (7%) und H₁/H₂/H₃ receptor (20%). With the exception of the H₁ receptor, the H₂ receptor (27%) as well as the H₃ receptor was expressed independently of other combinations. An inhibitory effect of histamine was never obtained.

Our results revealed for the first time the effects of histamine receptor agonists and antagonists in the human ENS. In contrast to data from animal models, the excitatory effect of histamine in the human ENS is mediated through H₁, H₂, H₃ and H₄-receptors. The excitatory effect could be the reason of functional and inflammatory disorders associated with dysfunction in motility and secretion. The human specific pharmacology of histamine-effects, especially the involvement of H₃- and H₄-receptors may provide the pharmacological background to target histamine receptors involved in the pathogenesis of gut diseases.

VI Literatur

Akdis CA, Blaser K. Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:15-22.

Alexander M. Starodub and Jackie D. Wood, 2000. Histamine H₂ Receptor Activated Chloride Conductance in Myenteric Neurons From Guinea Pig Small Intestine

Argenzio RA. Neuro-immune pathobiology of infectious enteric disease. *Adv Exp Med Biol.* 1997;412:21-9.

Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor. *Nature.* 1983 Apr 28;302(5911):832-7.

Arrang, JM. Highly potent and selective ligands for histamine H₃-receptors. *Nature* 327, 117–123 (1987).

Ash AS, Schild HO, Receptors mediating some actions of histamine. *Br J Pharmacol.* 1966 Aug;27(2):427-39. *Br J Pharmacol.* 1997 Feb;120(4 Suppl):302-14, discussion 300-1.

Auerbach, 1862; Über einen Plexus gangliosis myogastricus. 39er Jahr-Bericht u. Abh. der Schlesischen Gesellschaft für Vaterländ. Cult.,

Bacci S, Faussone-Pellegrini S, Mayer B, Romagnoli P. Distribution of mast cells in human ileocecal region. *Dig Dis Sci.* 1995 Feb;40(2):357-65.

Baenkler HW, Lux G, Gunthner R, Kohlhauf M, Matek W. Biopsy histamine in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Hepatogastroenterology.* 1987 Dec;34(6):289-90.

Bakker RA, Schoonus SBJ, Smit MJ, Timmerman H, Leurs R: Histamine H₁-receptor activation of nuclear factor- κ B: Roles for G beta gamma and G alpha(q/11) subunits in constitutive and agonist-mediated signaling. *Mol Pharmacol* 2001;60:1133-1142

Bakker, R.A.: Timmerman, H.: Leurs, R. Histamine receptors: specific ligands, receptor biochemistry, and signal transduction. *Clin. Allergy Immunol.* (2002) 17, 27-64.)

Leurs, R.: Church, M.K.: Tagliabatella, M. H₁ Antihistamines: Inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. *Clin. Exp All.* (2002) 32, 489-498)

Bakker RA. Histamine H₃-receptor isoforms. *Inflamm Res.* 2004 Oct;53(10):509-16.

Balemba OB, Grondahl ML, Mbassa GK, Semuguruka WD, Hay-Smith A, Skadhauge E, Dantzer V, The organisation of the enteric nervous system in the submucous and mucous layers of the small intestine of the pig studied by VIP and neurofilament protein immunohistochemistry. *J Anat.* 1998 Feb;192 (Pt 2):257-67.

Banu Y, Watanabe T: Augmentation of antigen receptor-mediated responses by histamine H₁ receptor signaling. *J Exp Med* 1999;189:673-682

Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Cottrell GS, Grady E, Bunnett NW, Collins SM, Corinaldesi R. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004;126:693–702.

Barker LA, Ebersole BJ. Histamine H₂-receptors on guinea-pig ileum myenteric plexus neurons mediate the release of contractile agents. *J Pharmacol Exp Ther.* 1982 Apr;221(1):69-75.

Barnes JC, Brown JD, Clarke NP, Clapham J, Evans DJ, O'Shaughnessy CT. Pharmacological activity of VUF 9153, an isothiourrea histamine H₃ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1993 Nov 30;250(1):147-52.

Baum CA, Bhatia P, Miner PB Jr. Increased colonic mucosal mast cells associated with severe watery diarrhea and microscopic colitis. *Dig Dis Sci.* 1989 Sep;34(9):1462-5

Beaven MA, Soll AH, Lewin KJ. Histamine synthesis by intact mast cells from canine fundic mucosa and liver. *Gastroenterology.* 1982 Feb;82(2):254-62.

Beaven, MA (1982). Factors regulating availability of histamine at tissue receptors. *Pharmacology of Histamine Receptors*, edited by C.R. Ganellin and M.E. Parsons. Bristol, UK: Wright, 103-145.

Beer, D. J. & Rocklin, R. E. Histamine modulation of lymphocyte biology: Membrane receptors, signal transduction, and functions. *Crit. Rev. Immunol.* 7, 55±91 (1987).

Bennett A, Whitney B. A pharmacological study of the motility of the human gastrointestinal tract. *Gut* 1966;7:307-16.

Bent S, Fehling U, Braam U, Schunack W, Schmutzler W. The influence of H₁-, H₂- and H₃-receptors on the spontaneous and ConA induced histamine release from human adenoidal mast cells. *Agents Actions.* 1991 May;33(1-2):67-70.

Bern MJ, Sturbaum CW, Karaylacin SS, Berschneider HM, Wachsman JT, Powell DW. Immune system control of rat and rabbit colonic electrolyte transport: role of prostaglandins and enteric nervous system. *J Clin Invest* 1989;83: 1810–20.

Bertaccini G, Morini G, Coruzzi G, Schunack W. Histamine H₃ receptors in the guinea pig ileum: evidence for a postjunctional location. *J Physiol Paris.* 2000 Jan-Feb;94(1):1-4.

Bertaccini G., Coruzzi G., An update on histamine H₃ receptors and gastrointestinal functions, *Dig. Dis. Sci.* 40 (1995) 2052–2063.
Black et al., 1972

Blandizzi C, Tognetti M, Colucci R, et al. Histamine H₃ receptors mediate inhibition of noradrenaline release from intestinal sympathetic nerves. *Br J Pharmacol* 2000;129:1387–96.

Bornstein JC, Costa M, Furness JB Enteric neurones and their chemical coding. in: Holle, G. E. and Wood, J. D. (Hrsg.): Advances in the innervation of the gastrointestinal tract. Elsevier, Amsterdam, 1992;S. 101-114.

Bornstein JC, Costa M, Furness JB, Kunze WA, Electrophysiological characterization of myenteric neurons: how do classification schemes relate? 1994, J. Auton. Nerv. Syst. 48 (1), 1-15.

Bornstein JC, Costa M, Furness JB. Synaptic inputs to immunohistochemically identified neurones in the submucous plexus of the guinea-pig small intestine. J Physiol. 1986 Dec;381:465-82.

Brehmer A, Stach W, Krammer HJ, Neuhuber W (1998) Distribution, morphology and projections of nitrergic and non-nitrergic submucosal neurons in the pig small intestine. Histochem Cell Biol 109:87-94

Breunig E, Schemann M, Zeller F. Histamine excites neurones in the human submucous plexus. Neurogastroenterol & Motil 2003;15:A10

Buckland KF, Williams TJ, Conroy DM. Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H(4) receptor. Br J Pharmacol.140(6):1117-27. 2003

Burgaud J.L., Oudart N., Bronchodilatation of guinea-pig perfused bronchioles induced by the H3-receptor for histamine: role of epithelium, Br. J. Pharmacol. 109 (1993) 960-966.

Cameron W, Doyle K, Rocklin R. Histamine type I (H₁) receptor radioligand binding studies: normal T cell subsets, B cells and monocytes. J Immunol 1986;136:2116-20. 95

Camilleri M. Management of the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 120 (3):652-668, 2001.

Cardell L.O., Edvinsson L., Characterization of the histamine receptors in the guinea-pig lung: evidence for relaxant histamine H3 receptors in the trachea, Br. J. Pharmacol. 111 (1994) 445-454.

Casale T, Wescott S, Kaliner M. Characterization of histamine H1 receptors on human mononuclear cells. Int J Immunopharmacol 1985;7:639-45.

Christensen J, Rick GA. Intrinsic nerves in the mammalian colon: confirmation of a plexus at the circular muscle-submucosal interface. J Auton Nerv Syst. 1987 Dec;21(2-3):223-31.

Cooke et al., 1994, Neuroimmune signaling in regulation of intestinal ion transport. Am J Physiol; 266: G168-78

Cooke HJ, Wang YZ, Rogers R. Coordination of Cl⁻ secretion and contraction by a histamine H2-receptor agonist in guinea pig distal colon. Am J Physiol. 1993 Nov;265(5 Pt 1):G973-8.

Cooper, D.G.: Young, R.C.: Durant, G.J.: Ganellin, C.R. Histamine receptors. In: Pharmaceutical chemistry (1990). C. Hansch, P.G. Sammes, J.B. Taylor (Hrsg.) Pergamon Press. Oxford, U.K., pp.323-421.

Coruzzi G, Poli E., Bertaccini G. (1991). Histamine receptors in isolated guinea pig duodenal muscle: H3 receptors inhibit cholinergic neurotransmission. *J Pharmacol Exp Ther* 258 325-31.0

Costa M, Furness JB, Pompolo S, Brookes SJ, Bornstein JC, Bredt DS, Snyder SH. Projections and chemical coding of neurons with immunoreactivity for nitric oxide synthase in the guinea-pig small intestine. *Neurosci Lett.* 1992 Dec 14;148(1-2):121-5.

Costa M., Cuello A. C., Furness J. B. and Franco R. (1980a) Distribution of enteric neurons showing immunoreactivity for substance P in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 5, 323±331.

Costa M., Furness J. B., Buffa R. and Said S. I. (1980b) Distribution of enteric nerve cell bodies and axons showing immunoreactivity for vasoactive intestinal polypeptide in the guinea-pig intestine. *Neuroscience* 5, 587±596.

Crowe R, Kamm MA, Burnstock G, Lennard-Jones JE., 1992, Peptide-containing neurons in different regions of the submucous plexus of human sigmoid colon. *Gastroenterology.* 1992 Feb;102(2):461-7

Crowe SE, Luthra G K, Perdue M H, Mast cell mediated ion transport in intestine from patients with and without inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 41: 785–792:

Crowe SE, Perdue MH. Anti-immunoglobulin E-stimulated ion transport in human large and small intestine. *Gastroenterology* 1993;105:764–72.

Crowe SE, Perdue MH. Gastrointestinal food hypersensitivity: basic mechanisms of pathophysiology. *Gastroenterology* 1992;103:1075–95.

Crowe SE, Sestini P, Perdue MH. Allergic reactions of rat jejunal mucosa. Ion transport responses to luminal antigen and inflammatory mediators. *Gastroenterology* 1990;99:74– 82.

Dale, HH, Feldberg: The chemical transmitter of vagus effects on stomach. *J. Physiol.*1934 (81), 320-334.

Daugherty, B.L. (2004) Histamine H4 antagonism: a therapy for chronic allergy? *Br. J. Pharmacol.* 142, 5–7

Daum PR, Hill SJ, Young JM. Histamine H1-agonist potentiation of adenosine-stimulated cyclic AMP accumulation in slices of guinea-pig cerebral cortex: comparison of response and binding parameters. *Br J Pharmacol.* 1982 Oct;77(2):347-57.

De Backer, M.D.: Gommeren, W.: Moereels, H.: Nobels, G.: Van Gompel, P.: Leysen, J.E.: Luyten, W.H.: Genomic cloning, heterologous expression and pharmacological characterization of a human histamine H1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1993) 197, 1601-1608.

De Man JG, Moreels TG, De Winter BY, Bogers JJ, Van Marck EA, Herman AG, Pelckmans PA. Disturbance of the prejunctional modulation of cholinergic neurotransmission during chronic granulomatous inflammation of the mouse ileum. *Br J Pharmacol.* 2001 Jul;133(5):695-707.

Del Valle J, Gantz I: Novel insights into histamine H2 receptor biology. *Am J Physiol* 1997;273:G987-G996.

Delaunois A., Gustin P., Garbarg M., Ansay M., Modulation of acetylcholine, capsaicin and substance P effects by histamine H3 receptors in isolated perfused rabbit lungs, *Eur. J. Pharmacol.* 277 (1995) 243–250

Dhatt N, Buchan AM, 1994, Colocalization of neuropeptides with calbindin D28k and NADPH diaphorase in the enteric nerve plexuses of normal human ileum. *Gastroenterology.* 1994 Sep;107(3):680-90.

Djuric D.M., Andjelkovic I.Z., The evidence for histamine H3 receptor-mediated endothelium-dependent relaxation in isolated rat aorta, *Med. Inflamm.* 4 (1995) 217-221.

Dolphin AC; Mechanisms of modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *J Physiol (Lond)* (1998) 506:3-11

Durant GJ, Ganellin CR, Parsons ME. Dimaprit-[S-[3-(N,N-dimethylamino)propyl]isothioureia] a highly specific histamine H2-receptor agonist. Part 2. Structure activity considerations. 1977 *Agents Actions.* 1994 Dec;43:139-43.

Ea-Kim L., Javellaud J., Oudart N., Endothelium-dependent relaxation of rabbit middle cerebral artery to a histamine H3 agonist is reduced by inhibitors of nitric oxide and prostacyclin synthesis, *Br. J. Pharmacol.* 105 (1992) 103–106.

Endo Y: Simultaneous induction of histidine and ornithine decarboxylases and changes in their product amines following the injection of *Escherichia coli* lipopolysaccharide into mice. *Biochem Pharmacol* 1982;31:1643-1647

Eyre P, and Chand N (1982) Histamine receptor mechanism of the lung. *Pharmacology of Histamine Receptors*, edited by C.R.Ganellin and M.E. Parsons. Bristol, UK: Wright, 298-322)

Farzin and Attarzadeh (2000) Influence of different histamine receptor agonists and antagonists on apomorphine-induced licking behavior in rats. *Eur.J.Pharmacol.* 404 169.

Fluhler E, Burnham VG, Loew LM. 1985, Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes.. *Biochemistry* 24, 5749-575599)

Frieling T, Cooke HJ, Wood JD. Histamine receptors on submucous neurons in guinea pig colon. *Am J Physiol* 1993;264:G74– G80

Frieling T, Cooke HJ, Wood JD. Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea pig colon after sensitization to milk antigen. *Am J Physiol*. 1994 Dec;267(6 Pt 1):G1087-93

Frieling T, Rupprecht C, Dobreva G, Schemann M. Differential effects of inflammatory mediators on ion secretion in the guinea-pig colon. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1997 Oct;118(2):341-3.

Furness JB, Young HM, Pompolo S, Bornstein JC, Kunze WAA, McConalogue K (1995): Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in digestive tract. *Gastroenterol*, 108:554-563

Gantner F, Sakai K, Tusche MW, Cruikshank WW, Center DM, Bacon KB: Histamine H₄ and H₂ receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8⁺ T cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303: 300– 307.

Gantz I, Schaffer M, DeValle J, et al. Molecular cloning of a gene encoding the histamine H₂ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:429-33. [Erratum, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:5937.]

Green JP, Johnson CL, Weinstein H, Maayani S. Antagonism of histamine-activated adenylate cyclase in brain by D-lysergic acid diethylamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5697-701.

Guc M.O., Ilhan M., Kayaalp S.O., Epithelium-dependent relaxation of guinea-pig tracheal smooth muscle by histamine: evidence for non-H₁- and non-H₂-histamine receptors, *Arch. Int. Pharmacodyn*. 296 (1988) 57–65.

Gunn M. Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. *J Anat*. 1968 Jan;102(2):223-39.

Haas H, Panula P. The role of histamine and the tuberomammillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Feb;4(2):121-30.

Hall IP: Pharmacogenetics of asthma. *Eur Respir J* 2000;15:449-451

Hancock AA. H₃ receptor antagonists/inverse agonists as anti-obesity agents. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003 Oct;4(10):1190-7.

Hansen 2003, "The Enteric Nervous System I: Organisation and Classification", *Pharmacology & Toxicology* 2003, 92, 105–113.

Harper EA, Shankley NP, Black JW. Characterization of the binding of [³H]-clobenpropit to histamine H₃-receptors in guinea-pig cerebral cortex membranes. *Br J Pharmacol*. 1999 Oct;128(4):881-90

Harry J. The action of drugs on the circular muscle strip from guinea-pig isolated ileum. *Br J Pharmacol* 1963;20:399-417.

Hemedah M, Loiacono R, Coupar IM, Mitchelson FJ. Lack of evidence for histamine H3 receptor function in rat ileum and human colon. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2001 Feb;363(2):133-8.

Herman D. Lim*, Richard M. van Rijn*, Ping Ling, Remko A. Bakker, Robin L. Thurmond, and Rob Leurs. Evaluation of histamine H1-, H2-, and H3-receptor ligands at the human histamine H4 receptor: Identification of 4-methylhistamine as the first potent and selective H4 receptor agonist. June 9, 2005 as DOI:10.1124/jpet.105.087965.

Hew RW, Hodgkinson CR, Hill SJ. Characterization of histamine-H3 receptors in guinea pig ileum with H3-selective ligands. *Br J Pharmacol.* 1990 Nov;101(3):621-4.

Hill S. J., Ganellin, Timmermann H., Schwartz J.C., Shankley N.P., Young J.M., Schunack, W., Levi R., Haas H.L., 1997. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol. Rev.* (1997) 49, 253-278.

Hill SJ, Young JM. Related Characterization of [³H]mepyramine binding to the longitudinal muscle of guinea pig small intestine. *Mol Pharmacol.* 1981 May;19(3):379-87.

Hill S.J., Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol Rev.* 1990 Mar;42(1):45-83.

Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL, Fung-Leung WP. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Jun;305(3):1212-21.

Holzer P, Schicho R, Holzer-Petsche U, Lippe IT The gut as a neurological organ. *Wien Klin Wochenschr.* 2001 Sep 17;113(17-18):647-60.

Hough LB, Weinstein H, Green JP. One agonist and two receptors mediating the same effect: histamine receptors linked to adenylate cyclase in the brain. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1980;21:183-92.

Hoyle CH, Burnstock G. Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *J Anat.* 1989 Oct;166:7-22.

Ibba-Manneschi L, Martini M, Zecchi-Orlandini S, Fausone-Pellegrini MS. Structural organization of enteric nervous system in human colon. *Histol Histopathol.* 1995 Jan;10(1):17-25.

Ireland-Denny L, Parihar AS, Miller TR, Kang CH, Krueger KM, Esbenshade TA, Hancock AA. Species-related pharmacological heterogeneity of histamine H(3) receptors.

Ishikawa S, Sperelakis N. A novel class (H3) of histamine receptors on perivascular nerve terminals. *Nature* 1987;327:158-60.

Ison R.R., Franks F.M., Soh K.S. The binding of conformationally restricted antihistamines to histamine receptors. *J. Pharm. Pharmacol.* 25 (1973) 887-894

Iwan J.P, de Esch R, Thurmond L, Jongejan A, Leurs R. The histamine H4 receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Pharmacol Sciences* 2005,Vol.26 No.9,

Jablonowski, J.A. et al. (2004) The histamine H4 receptor and potential therapeutic uses for H4 ligands. *Mini Rev. Med. Chem.* 4, 993–1000

Jablonowski, J.A., Grice, C.A., Chai, W., Dvorak, C.A., Venable, J.D., Kwok, A.K., Ly, K.S., Wei, J., Baker, S.M., Desai, P.J., Jiang, W., Wilson, S.J., Thurmond, R.L., Karlsson, L., Edwards, J.P., Lovenberg, T.W. and Carruthers, N.I. (2003). The first potent and selective nonimidazole human histamine H4 receptor antagonists. *J. Med. Chem.*, 46, 3957–3960.

Kanof PD, Greengard P., *Nature*. 1978 Mar 23;272(5651):329-33. Brain histamine receptors as targets for antidepressant drugs.

Kathmann M, Schlicker E, Detzner M, Timmerman H., Nordimaprit, homodimaprit, clobenpropit and imetit: affinities for H3 binding sites and potencies in a functional H3 receptor model. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1993 Nov;348(5):498-503.

Kelly SJ, Stack WA, O'Donoghue DP, Baird AW, Regulation of ion transport by histamine in human colon. *Eur J Pharmacol*. 1995 Jun 12;279(2-3):203-9

Kent, L., and H. T. Debas. Peripheral regulation of gastric acid secretion. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (3rd ed.), edited by L. R. Johnson. New York: Raven, 1994, p. 1185–1226

Khan MM, Marr-Leisy D, Verlander MS, Bristow MR, Strober S, Goodman M, Melmon KL. The effects of derivatives of histamine on natural suppressor cells. *J Immunol*. 1986 Jul 1;137(1):308-14.

Khan MM, Melmon KL, Marr-Leisy D, Verlander MS, Egli M, Lok S, Goodman M. Congener derivatives and conjugates of histamine: synthesis and tissue receptor selectivity of the derivatives. *J Med Chem*. 1987 Nov;30(11):2115-20.

Knutson L, Ahrenstedt O, Odland B, Hallgren R. The jejunal secretion of histamine is increased in active Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1990 Apr;98(4):849-54).

Langley, J. N. 1921; *The autonomic nervous system Part 1*. W. Heffer and Sons, Cambridge

Le Coniat M, Traiffort E, Ruat M, Arrang J-M, Berger R. Chromosomal localization of the human histamine H1-receptor gene. *Hum Genet* 1994;94:186-8

Leurs R, Smit MJ, Timmerman H: Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther* 1995;66:413-463.

Leurs, R.; Church, M.K.; Tagliabatella, M. H1-Antihistamines: Inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. *Clin. Exp. All.* (2002) 32, 489-498.

Leurs, R. The histamine H3 receptor: from gene cloning to H3 receptor drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, (2005) 107–120

Lim HD , van Rijn RM, Ling P, Bakker RA, Thurmond RL, Leurs R; Evaluation of histamine H₁-, H₂-, and H₃-receptor ligands at the human histamine. H₄ receptor: Identification of 4-methylhistamine as the first potent and selective H₄ receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Sep;314(3):1310-21. Epub 2005 Jun 9.

Ling P, Ngo K, Nguyen S, Thurmond RL, Edwards JP, Karlsson L, Fung-Leung WP. Histamine H₄ receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *Br J Pharmacol.* 2004 May;142(1):161-71.

Lippert U, Artuc M, Grutzkau A, Babina M, Guhl S, Haase I, Blaschke V, Zachmann K, Knosalla M, Middel P, Kruger-Krasagakis S, Henz BM. Human Skin Mast Cells Express H₂ and H₄, but not H₃ Receptors. *J Invest Dermatol.* 2004 Jul;123(1):116-23

Liu C, Ma X, Jiang X, Wilson SJ, Hofstra CL, Blevitt J, Pyati J, Li X, Chai W, Carruthers N, Lovenberg TW. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H₄) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol.* 2001 Mar;59(3):420-6.

Liu C, Wilson SJ, Kuei C, Lovenberg TW. Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H₄ receptors reveals substantial pharmacological species variation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Oct;299(1):121-30.

Liu S, Hu HZ, Gao N, Gao C, Wang G, Wang X, Peck OC, Kim G, Gao X, Xia Y, Wood JD. Neuroimmune interactions in guinea pig stomach and small intestine. *Am J Physiol* 2003;284:G154– G164.

Liu S, Xia Y, Hu H, Ren J, Gao C, Wood JD. Histamine H₃ receptor-mediated suppression of inhibitory synaptic transmission in the submucous plexus of guinea-pig small intestine. *Eur J Pharmacol* 2000;397:49–54.

Loew, Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes.. *Biochemistry* 24, (1978) 5749-575599

Lomax AE, Fernandez E, Sharkey KA. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil.* 2005 Feb;17(1):4-15.

Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, et al. Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. *Mol Pharmacol* 1999;55:1101-7. in allergic disease. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2002:141-78.)

MacGlashan D Jr. Histamine: a mediator of inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:Suppl 4:S53-S59.

Mark Berner Hansen, The Enteric Nervous System I:Organisation and Classification Department of Gastrointestinal Surgery K, Bispebjerg University Hospital of Copenhagen, DK-2400 Copenhagen NV,Denmark, 2002.

Mawe GM, Collins SM, Shea-Donohue T. Changes in enteric neural circuitry and smooth muscle in the inflamed and infected gut. *Neurogastroenterol & Motil* 2004; 16:133-136

Mayer CJ, Wood JD. Properties of mechanosensitive neurons within Auerbach's plexus of the small intestine of the cat. *Pflugers Arch* 1975;357:35-49.

Mazumdar S, Das KM Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in the colon from normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 1992 Feb;87(2):176-81

Meissner, 1857 Über die Nerven der Darmwand. *Z. Ration. Med. N. F.* 8, 364-366.

Milligan G, Bond R, Lee M: Inverse agonism: Pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy? *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:10-13

Morini G, Kuemmerle JF, Impicciatore, Grider JR und Makhlof (1993). (Coexistence of histamine H1 and H2 receptors coupled to distinct signal transduction pathways in isolated intestinal muscle cells. *J Pharmacol. Exp Ther.* 264 Suppl 2, 598.)

Morini, G., J. F. Kuemmerle, M. Impicciatore, J. R. Grider, and G. M. Makhlof. Coexistence of histamine H1 and H2 receptors coupled to distinct signal transduction pathways in isolated intestinal muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264, Suppl. 2: 1993, p. 598.

Morse KL, Behan J, Laz TM, West RE Jr, Greenfeder SA, Anthes JC, Umland S, Wan Y, Hipkin RW, Gonsiorek W, Shin N, Gustafson EL, Qiao X, Wang S, Hedrick JA, Greene J, Bayne M, Monsma FJ Jr. Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Mar;296(3):1058-66.

Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, Ohta M, Tanaka K: Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HHR4. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:615-620

Nemeth PR, Ort CA, Wood JD. Intracellular study of effects of histamine on electrical behaviour of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *J Physiol* 1984;355:411-425.

Neunlist M, Aubert P, Toquet C et al. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 2003; 52: 84-90.

Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rauser L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL, O'Dowd BF: Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol* 2001;59:427-433.

Nolte H, Spjeldnaes N, Kruse A, Windelborg B. Histamine release from gut mast cells from patients with inflammatory bowel diseases. *Gut.* 1990 Jul;31(7):791-4.

Obaid AL, Koyano T, Lindstrom J, Sakai T, and Salzberg BM. Spatiotemporal patterns of activity in an intact mammalian network with single-cell resolution: optical studies of nicotinic activity in an enteric plexus. *J Neurosci* 19: 3073-3093, 1999.

Oda, T.; Morikawa, N.; Saito, Y.; Masuho, Y.; Matsumoto, S. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Type of Histamine Receptor Preferentially Expressed in Leukocytes. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 36781-36786.

Oishi et al. (1989) Oishi R, Itoh Y, Nishibori M, Saeki K. Effects of histamine H3-agonist (R)-alpha-methylhistamine and the antagonist thioperamide on histamine modulation in the mouse and rat brain. *J Neurochem.* 1989 May;52(5):1388-92.

O'Reilly M, Alpert R, Jenkinson S, Gladue RP, Foo S, Trim S, Peter B, Trevethick M, Fidock M. Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils--role in eosinophil chemotaxis. *J Recept Signal Transduct Res.* 2002 ,22(1-4):431-48.

Ottoson A, Jansen I und Edvinsson L (1988). Characterization of histamine receptors in isolated human cerebral arteries. *Br J Pharmacol.* 94: 901-907)

Otterson MF, Sarna SK, Leming SC, Moulder JE, Fink JG. Effects of fractionated doses of ionizing radiation on colonic motor activity. *Am J Physiol* 1992;263:G518–G526.

Otterson MF, Sarna SK, Moulder JE. Effects of fractionated doses of ionizing radiation on small intestinal motor activity. *Gastroenterology* 1988;95:1249–1257.

Paesen G, Adams P, Nuttall P, Stuart D: Tick histamine-binding proteins: Isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Mol Cell* 1999;3:661-666

Palacios JM, Garbarg M, Barbin G, Schwartz JC. Pharmacological characterization of histamine receptors mediating the stimulation of cyclic AMP accumulation in slices from guinea-pig hippocampus. *Mol Pharmacol.* 1978 Nov;14(6):971-82.

Paquay JB, Hoen PA, Voss HP, Bast A, Timmerman H, Haenen GR. Nitric oxide synthase inhibition by dimaprit and dimaprit analogues. *Br J Pharmacol.* 1999 May;127(2):331-4.

Parsons ME, Owen DA, Ganellin CR, Durant GJ Dimaprit-[S-[3-(N,N-dimethylamino)propyl]isothiourea]-a highly specific histamine H2-receptor agonist. Part 1. *Pharmacology.* 1977 *Agents Actions.* 1994 Dec;43(3-4):132-8

Passani, M.B. et al. (2004) The histamine H3 receptor as a novel therapeutic target for cognitive and sleep disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 618–625

Perdue MH, Masson S, Wershil BK, Galli SJ. Role of mast cells in ion transport abnormalities associated with intestinal anaphylaxis. Correction of the diminished secretory response in genetically mast cell-deficient W/W^v mice by bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1991;87:687– 93.

Peters S, Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor in Veterinärmedizin, (Dr. med. vet.) durch die Tierärztliche Hochschule Hannover unter Leitung von Prof. Schemann, 2001

Pimont S, Bruley Des Varannes S, Le Neel JC, Aubert P, Galmiche JP, Neunlist M., Neurochemical coding of myenteric neurones in the human gastric fundus. *Neurogastroenterol Motil.* 2003 Dec;15(6):655-62.

Poli E, Stark H, Bertaccini G. Histamine H3-receptor activation inhibits acetylcholine release from the guinea pig myenteric plexus. *Agents Actions.* 1991 May;33(1-2):167-9.

Poli E., Coruzzi G, Bertaccini G. (1991). Histamine H3-receptors regulate acetylcholine release from the guinea pig ileum myenteric plexus. *Life Sci* 48 PL 63-8
Pompolo, 1994;

Porter AJ, Wattchow DA, Brookes SJ, Costa M. Projections of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide-reactive submucosal neurons in the human colon. *J Gastroenterol Hepatol.* 1999 Dec;14(12):1180-7.

Pozzoli C, Poli E, Costa A, De Ponti F. Absence of histamine H3-receptors in the rabbit colon: species difference. *Gen Pharmacol.* 1997 Aug;29(2):217-21.

Qiu R, Melmon KL, Khan MM. Effects of histamine-trifluoromethyl-toluidide derivative (HTMT) on intracellular calcium in human lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990 Jun;253(3):1245-52.

Raithel M, Matek M, Baenkler HW, Jorde W, Hahn EG. Mucosal histamine content and histamine secretion in Crohn's disease, ulcerative colitis and allergic enteropathy. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 108: 127-133

Rangachari, P. K. Histamine: mercurial messenger in the gut. *Am. J. Physiol.* 262 (Gastrointest. Liver Physiol. 25): G1–G13, 1992.

Roszkowski, W., Plaut, M. & Lichtenstein, L. M. Selective display of histamine receptors on lymphocytes. *Science* 195, 683±685 (1977).

Sander LE., Lorentz A., Sellge G., Coeffier M., Neipp M., Veres T., Frieling, T. Meier P. N., Manns M. P., and Bischoff S. C. Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract. *Gut* 55 (4):498-504, 2006.

Sarna SK, Otterson MF, Cowles VE, Sethi AK, Telford GL. In vivo responses to gut inflammation. In: Collins SM, Snape WJ, eds. *Effects of immune cells and inflammation on smooth muscle and enteric nerves.* Boca Raton: CRC Press, 1991:83–93.

Schabadasch A., 1930; Intramurale Nervengeflechte des Darmrohrs. *Z. Zellforsch.* 10, 320-385

Schemann M and Wood J.D., 1989, Electrical behavior of myenteric neurones in the gastric corpus of the guinea-pig. *J. Physiol. (London)* 417, 501-518

Schemann M and Wood J.D., 1989, Synaptic behavior of myenteric neurones in the gastric corpus of the guinea-pig. *J. Physiol. (London)* 417, 519-535.

Schemann M, Michel K, Ceregrzyn M, Zeller F, Seidl S, Bischoff SC. Human mast cell mediator cocktail excites neurons in human and guinea-pig enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.* 2005 Apr;17(2):281-9.

Schemann M, Michel K, Peters S, Bischoff SC, Neunlist M. Cutting-edge technology. III. Imaging and the gastrointestinal tract: mapping the human enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Jun;282(6):G919-25.

Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol & Motil* 2004;55-59.

Schemann M, Schaaf C, Mader M. Neurochemical coding of enteric neurons in the guinea pig stomach. *J Comp Neurol.* 1995 Mar 6;353(2):161-78.

Schemann M. Neurophysiology of the enteric nervous system *Gastroenterol Verh.* 1990 Mar;26:234-5.

Scheuermann DW, Stach W, Timmermans JP, Adriaensen D, De Groodt-Lasseel MH. Neuron-specific enolase and S-100 protein immunohistochemistry for defining the structure and topographical relationship of the different enteric nerve plexuses in the small intestine of the pig. *Cell Tissue Res.* 1989 Apr;256(1):65-75.

Scheuermann DW, Stach W, Timmermans JP. Topography, architecture and structure of the plexus submucosus externus (Schabadasch) of the porcine small intestine in scanning electron microscopy. *Acta Anat (Basel).* 1987;129(2):105-15.

Scheuermann DW, Timmermans JP. Differing chemical content of the neuronal populations of submucosal ganglionic plexus of the enteric nervous system. *Gastroenterology.* 1993 May;104(5):1579.

Schlicker E, Kathmann M, Reidemeister S, Stark H, Schunack W. Novel histamine H3 receptor antagonists: affinities in an H3 receptor binding assay and potencies in two functional H3 receptor models. *Br J Pharmacol.* 1994 Aug;112(4):1043-8.

Schneider E, Rolli-Derkinderen M, Arock M, Dy M. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol* 2002;23:255-63.

Schneider J, Jehle EC, Starlinger MJ, Neunlist M, Michel K, Hoppe S, Schemann M. Neurogastroenterol, Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. *Motil.* 2001 Jun;13(3):255-64.

Schütz W: Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: Das Herz In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie (W Forth), 7 Auflage, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg; pp 363-406, 1996

Schwab D, Hahn EG, Raithel M. Enhanced histamine metabolism: a comparative analysis of collagenous colitis and food allergy with respect to the role of diet and NSAID use. *Inflamm Res* 2003; 52: 142-147

Schwartz et al (1990) A third histamine receptor subtype- characterization, localization and functions of the H3-receptor. *Agents Actions* 30 13.

Seifert R, Hoer A, Schwaner I, Buschauer A. Histamine increases cytosolic Ca²⁺ in HL-60 promyelocytes predominantly via H₂ receptors with an unique agonist/antagonist profile and induces functional differentiation. *Mol Pharmacol.* 1992 Aug;42(2):235-41.

Sharkey KA, Kroese AB., Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. *Anat Rec.* 2001 Jan 1;262(1):79-90.

Sharkey KA, Mawe GM. Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. *Curr Opin Pharmacol.* 2002;2:669-77.

Simons, F.E.R. Comparative pharmacology of H₁ antihistamines: Clinical relevance. *Am. J. Med.* (2002) 113, 38S-46S.

Smit MJ, Hoffmann M, Timmerman H, Leurs R: Molecular properties and signaling pathways of the histamine H₁ receptor. *Clin Exp Allergy* 1999;29:19-28.

Soll, A. H., and T. Berglindh. Receptors that regulate gastric secretory function. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (3rd ed.). New York: Raven, 1994, p. 1139–1170.

Stach W (1977) Die differenzierte Gefäßversorgung der Dogielschen Zelltypen und die bevorzugte Vaskularisation der Typ I Zellen in den Ganglien des Plexus submucosus externus (Schabadasch) des Schweins. *Z Mikrosk Anat Forsch* 91:421–429

Stach W (1983) Über morphologisch definierte vertikale Verbindungen innerhalb des Darmwandnervensystems im Schweinedünndarm. *Verh Anat Ges* 77:577–578

Stack WA, Keely SJ, O'Donoghue DP, Baird AW. Immune regulation of human colonic electrolyte transport in vitro. *Gut* 1995;36:395–400

Starodub A and Wood JD, 2000. Histamine H₂ Receptor Activated Chloride Conductance in Myenteric Neurons From Guinea Pig Small Intestine
Stern G.J., Van der Schaar M.W.G., Rademaker B., Van der Goot H., Timmerman H., *Agents Actions* 18 (1986) 231–234.

Strickland KN: Advances in antiarrhythmic therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 28(6): 1515-1546, 1998

Takahashi HK, Morichika T, Iwagaki H, Tamura R, Kubo S, Yoshino T, Mori S, Akagi T, Tanaka N, Nishibori M. Histamine downregulates CD14 expression via H₂ receptors on human monocytes. *Clin Immunol.* 2003 Sep;108(3):274-81.

Takeshita K, Sakai K, Bacon KB, Gantner F. Critical role of histamine H₄ receptor in leukotriene B₄ production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Dec;307(3):1072-8.

Tamura K, Palmer JM, Wood JD. Presynaptic inhibition produced by histamine at nicotinic synapses in enteric ganglia. *Neuroscience*. 1988 Apr; 25(1): 171-179.

Tanaka S, Hamada K, Yamada N *et al*. Gastric acid secretion in L-histidine decarboxylase-deficient mice. *Gastroenterology* 2002;122:145-55.

Tari A, Yamamoto G, Sumii K *et al*. Roles of histamine 2 receptor in increased expression of rat gastric H⁺-K⁺ ATPase- α -subunit induced by omeprazole. *Am J Physiol* 1993;265:G752-G758.

Thurmond RL, Desai PJ, Dunford PJ, Fung-Leung WP, Hofstra CL, Jiang W, Nguyen S, Riley JP, Sun S, Williams KN, Edwards JP, Karlsson L. A potent and selective histamine H₄ receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Apr;309(1):404-13. Epub 2004 Jan 13.

Timmermans JP, Adriaensen D, Cornelissen W, Scheuermann DW. Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1997 Oct;118(2):331-40.

Timmermans JP, Barbiers M, Scheuermann DW, Bogers JJ, Adriaensen D, Fekete E, Mayer B, Van Marck EA, De Groot-Lasseel MH. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the enteric nervous system of the developing human digestive tract. *Cell Tissue Res*. 1994 Feb;275(2):235-45.

Timmermans JP, Scheuermann DW, Stach W, Adriaensen D, De Groot-Lasseel MH. Functional morphology of the enteric nervous system with special reference to large mammals. *Eur J Morphol*. 1992;30(2):113-22.

Togias A: H₁-receptors: Localization and role in airway physiology and in immune functions. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:S60-S68

Traynor TR, Brown DR, O'Grady SM. Effects of inflammatory mediators on electrolyte transport across the porcine distal colon epithelium. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993 Jan;264(1):61-6.

Tsau Y, P. Wenner, M. J. O'Donovan, L. B. Cohen, L. M. Loew, and J. P. Wuskell. Dye screening and signal-to-noise ratio for retrogradely transported voltage-sensitive dyes. *J Neurosci Methods* 70 (2):121-129, 1996.

Tunc B, Filik L, Altintas E, Turhan N, Ulker A, Dagli U. Mucosal mast cells in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinic, Turkiye Yuksek Ihtisas Hospital, Ankara, Turkey* 2005;48(3-4):163-4.

van den Brink FG, Lien EJ. pD₂-, pA₂- and pD₂'-values of a series of compounds in a histaminic and a cholinergic system. *Eur J Pharmacol*. 1977 Aug 1;44(3):251-70.

Van der Goot *et al* (1992) Isothiourea analogues of histamine as potent agonists or antagonists of the histamine H₃ receptor. *Eur.J.Med.Chem.* 27 511.

- Van der Goot H, Timmerman H, Selective ligands as tools to study histamine receptors. *Eur J Med Chem.* 2000 Jan;35(1):5-20.
- Van der Goot H., Bast A., Timmerman H., in: Uvnäs B. (Ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 97, Springer-Verlag, Berlin, 1991, pp. 573–748.
- Vannier, E. & Dinarello, C. Histamine enhances interleukin (IL)-1-induced IL-1 gene expression and protein synthesis via H2 receptors in peripheral blood mononuclear cells. Comparison with IL-1 receptor antagonist. *J. Clin. Invest.* 92, 281±287 (1993).
- Villemain FM, Bach J, Chatenoud L. Characteristics of histamine H1 binding sites on human T lymphocytes by means of 125 I-iodobolpyramin: preferential expression of H1 receptors on CD8 T lymphocytes. *J Immunol* 1990;144:1449-59.
- Wang YZ, Cooke HJ, Su HC. Histamine augments colonic secretion in guinea pig distal colon. *Am J Physiol* 1990;258:G432-G439.
- Windaus, A.; Vogt, W. Synthese des Imidazolyl-ethylamins. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1907, 40, 3691-3695.
- Winterkamp S, Weidenhiller M, Otte P, Stolper J, Schwab D, Hahn EG, Raithel M. Urinary excretion of N-methylhistamine as a marker of disease activity in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 3071-3077
- Wood JD (1994): Physiology of the enteric nervous system. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*, edited by Johnson LR, Raven press , New York, Volume 1, second edition, chapter 3:67-109
- Wood JD, Alpers DH, Andrews PL, 1999., *Fundamentals of neurogastroenterology. Gut.* 1999 Sep;45 Suppl 2:II6-II16.
- Wood JD. Neurophysiological theory of intestinal motility. *Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi.* 1987 Jun;23(3):143-86.
- Wood JD. Enteric neuroimmuno physiology and pathophysiology. *Gastroenterology* 2004;127:635–57.
- Wulf, H.; Ledowski, T.; Linstedt, U.; Proppe, D.; Sitzlack, D.: Neuromuscular blocking effects of rocuronium during desflurane, isoflurane, and sevoflurane anaesthesia. *Can J Anaesth* 1998 Jun; 45(6):526-32
- Yanai K, Son LZ, Endou M, Sakurai E, Watanabe T: Targeting disruption of histamine H1 receptors in mice: Behavioral and neurochemical characterization. *Life Sci* 1998;62:1607-1610.
- Yu LC, Perdue MH. Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. *Immunol Rev.* 2001 Feb;179:61-73.

Danksagungen



Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schemann, der es mir möglich machte, meine Promotion am Lehrstuhl für Humanbiologie anzufertigen. Zudem möchte ich mich recht herzlich für die vielen Hilfestellungen und Anregungen bedanken.



Herausheben möchte ich vor allem Herrn Dr. Klaus Michel, der mich eingearbeitet und weiterführend unterstützt hat. Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Klaus für seine fachliche und persönliche Hilfsbereitschaft und sein offenes Ohr für Probleme.



Weiterer Dank gilt besonders Sebastian Hoff, der mich in guten wie in schwierigen Zeiten unterstützt und motiviert hat. Seine freundliche und offene Art hat stets zu einem guten Arbeitsklima beigetragen.



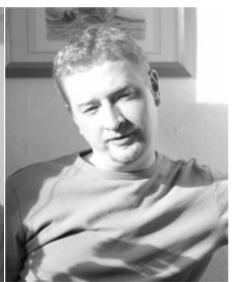
Bei Christa Heilmeier möchte ich mich für die freundliche Unterstützung im Labor bedanken. Des Weiteren gilt ihr der Dank für die vielen Kleinigkeiten, ohne die das Leben nur halb so schön wäre.



Frau Stefanie Wochian danke ich für die unkomplizierte Umsetzung bürokratischer Verwaltungsangelegenheiten und einer sympathischen Zusammenarbeit.



An dieser Stelle sei auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Zusammenarbeit gedankt.



LEBENS LAUF

ANGABEN ZUR PERSON

Name **BREUNIG EVA**
Adresse **52, DR.V.DALLER STRASSE,
85356, FREISING, DEUTSCHLAND**
Telefon **08161-209055**
E-mail e.breunig@gmx.de
Geburtsdatum **02.01.1976**
Geburtsort **FREIBURG IM BREISGAU**
Staatsangehörigkeit **Deutsch**
Familienstand **Ledig**



SCHUL- UND BERUFSBILDUNG

• Datum (von – bis)

2006- heute Pharmareferentin bei INNOVEX im Außendienst der Firma ALTANA
Pharma Deutschland
2002- heute Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften Dr.rer.nat.
am Lehrstuhl für Humanbiologie der TU München, Weihenstephan
1996-2002 Studium zur Erlangung des Grades einer Diplom-Biologin
an der Universität zu Köln
1986-1996 Gymnasium mit Abiturabschluss
- Emmendingen
- Berlin
- Karlsruhe-Neureut
- Schriesheim
- Siegburg (Abitur)
1993-1994 Auslandsaufenthalt in CA, USA mit Highschool-Diplom
1982-1986 Grundschule

• Hauptfächer/berufliche
Fähigkeiten
• Technische Fähigkeiten und
Kompetenzen

Humanbiologie, Neurophysiologie, Pharmakologie, Biochemie, Botanik
MS Office, Molekularbiologie, Immunohistochemie, Fluoreszenzmikroskopie

SONSTIGES

MUTTERSPRACHE

Deutsch

SONSTIGE SPRACHEN

englisch

• in Wort und Schrift

sehr gut

Führerschein

Klasse 1a, 3