

**Histamin-induzierte Radikalproduktion in der Darmwand: Charakterisierung durch pharmakologische Wirkstoffe und spezifische Antikörper**

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades**

**der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät**

**der Eberhard Karls Universität**

**zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Desislava Emilova Naydenova-Wenk**

**geb. Naydenova**

**2014**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Heinle

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Enck

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Histamin als Ursache von Nahrungsmittelunverträglichkeiten .....	5
1.2 Biosynthese von Histamin.....	7
1.3 Abbau von Histamin.....	9
1.4 Wirkung von Histamin und Histamin-Rezeptoren .....	12
1.5 Histamin und Oxidativer Stress.....	15
1.6 Aufbau der Darmwand.....	17
1.7 Fragestellung .....	19
<b>2 Materialien</b> .....	<b>20</b>
2.1 Geräte.....	20
2.2 Chemikalien .....	20
2.3 Lösungen .....	22
2.4 Biologische Materialien .....	24
<b>3 Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.1 Gewinnung der Gewebe-Präparate .....	25
3.1.1 Präparation von intakten Ileum Ringpräparaten .....	25
3.1.2 Präparation von homogenisiertem Ileum.....	25
3.1.3 Präparation der Submucosa.....	26
3.2 Luminol-verstärkte Chemilumineszenz .....	26
3.3 Histamin-induzierte Reaktive-Sauerstoffspezies (ROS)- Produktion .....	27
3.4 Putrescin-induzierte Reaktive-Sauerstoffspezies (ROS)- Produktion .....	28
3.5 Hemmung der Reaktive-Sauerstoffspezies (ROS)-Produktion ....	29
3.5.1 Hemmung der ROS durch Histaminrezeptor Antagonisten	30
3.5.2 Hemmung der ROS-Produktion durch Aminoguanidin .....	30
3.5.3 Einfluss der DAO-Antikörper auf die Histamin-induzierte Radikalproduktion .....	31
3.6 Untersuchungen am humanen Ileumgewebe .....	31
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
4.1 Einfluss der Substrat Konzentration auf ROS Produktion .....	33
4.1.2 Einfluss der Putrescin Konzentration auf ROS Produktion	35
4.2 Einfluss der Histamin-Rezeptor Antagonisten auf die Histamin-induzierte Radikalproduktion.....	37

4.2.1	Einfluss des H3-Rezeptor Antagonisten Clobenpropit auf die Histamin-induzierte Radikalproduktion .....	37
4.2.2	Einfluss des H2-Rezeptor Antagonisten Ranitidin auf die Histamin-induzierte Radikalproduktion .....	39
4.2.3	Einfluss des H1-Rezeptor Antagonisten Cetirizin auf die Histamin-induzierte Radikalproduktion .....	41
4.3	Einfluss von Aminoguanidin auf Histamin-induzierte Radikalproduktion .....	43
4.4	Ergebnisse von Vorversuchen an humanen Darmpräparaten .....	45
4.4.1	Einfluss der Diaminoxidase-Antikörper ( DAO-AK) auf Histamin-induzierte Radikalproduktion .....	45
4.4.2	Einfluss von Putrescin auf die ROS-Produktion beim humanen Dünndarmpräparat .....	47
4.4.3	Einfluss des H3-Rezeptor Antagonisten Clobenpropit auf Putrescin-induzierte Radikalproduktion am humanen Dünndarmpräparat .....	48
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>50</b>
5.1	Rolle von Histamin im Darm und oxidativer Stress .....	50
5.2	Substratspezifität .....	52
5.3	Hemmbarkeit der Histamin-induzierten Radikalproduktion durch Histamin-Rezeptor-Blocker .....	54
5.4	Weitere Hemmstoffe der Histamin-induzierten Radikalproduktion	56
5.5	Mögliche Therapie der Histaminunverträglichkeit durch DAO.....	58
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>59</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>61</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AG	Aminoguanidin
AK	Antikörper
AUC	Area under the curve
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
DAO	Diaminoxidase
DAO-AK	Diaminoxidase-Antikörper
ECL-Zellen	enterochromaffin-ähnlichen-Zellen
HNMT	Histamin-N-Methyltransferase
MAO	Monoaminoxidase
MW	Mittelwert
NMA	Nahrungsmittelallergien
NMU	Nahrungsmittelunverträglichkeit
RDS	Reizdarmsyndrom
ROS	Reaktive-Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Histamin als Ursache von Nahrungsmittelunverträglichkeiten

Der Begriff Nahrungsmittelunverträglichkeit (NMU) bezeichnet verschiedene nahrungsabhängige Beschwerden unterschiedlicher Genese. Die Symptome reichen von typischen kutanen Beschwerden (Erythem, Pruritus, Flusch, Urtikaria), gastrointestinalen Beschwerden (Flatulenz, Koliken, Diarrhö), respiratorischen Beschwerden (nasale Obstruktion, Fließschnupfen, Asthmaanfälle), kardialen Komplikationen (Hypo- und Hypertonie, Arrhythmien) bis zu Kopfschmerzen und Dysmenorrhö. Neben strukturellen und funktionellen Ursachen muss zwischen toxischer - (bedingt durch Toxinwirkungen, wie z.B. durch Bakterien-, Pflanzen-, Pilztoxine, Glykoalkaloide oder andere Gifte) und nicht toxischer - (bedingt durch z.B. Salicylate, biogene Amine, Sulfite etc.) Genese der Unverträglichkeit differenziert werden ( Zopf et al. 2009).

Die funktionell bedingte NMU wird, wie auch das Reizdarmsyndrom (RDS), oft nur durch eine isolierte Funktionsstörung hervorgerufen. Die strukturell bedingte NMU hat dagegen ihre Ursache in einer anatomisch-morphologisch belegbaren Erkrankung mit einer Strukturveränderung des Gastrointestinaltraktes.

Die toxischen Reaktionen sind bedingt durch Toxinwirkungen, wie z.B. durch Kontamination der Nahrungsstoffe durch Bakterien-, Pflanzen-, Pilztoxine, Glykoalkaloide oder andere Gifte.

Die nicht toxischen Reaktionen werden aufgrund zweier verschiedener Mechanismen unterteilt in die immunologisch sowie die nicht immunologisch vermittelten Reaktionen. Das Immunsystem ist hierbei nicht spezifisch einbezogen, so dass nicht immunologisch vermittelte Formen der NMU keine Allergie darstellen. Dieses Spektrum umfasst pseudoallergische und pharmakologische Wirkungen durch:

- Biogene Amine ( z.B. Histamin, Putrescin, Tyramin, Serotonin etc.)

- Sulfite
- Natriumglutamat
- Farb- und Konservierungstoffe.

(Zopf et al. 2009)

Nicht immunologische Formen der Nahrungsmittelunverträglichkeit werden bei ca. 15-20% der Personen in der Bevölkerung angegeben. Die Unverträglichkeit von Histamin und z. T. auch von anderen biogenen Aminen (z.B. Cadaverin, Putrescin, Tyramin usw.) spielt in der Differenzialdiagnose der NMU eine wichtige Rolle und ist streng von immunologisch vermittelten Nahrungsmittelreaktionen (Nahrungsmittelallergien (NMA), 2-5% der Bevölkerung) zu trennen (Weidenhiller et al. 2012).

Obwohl gesagt werden kann, dass Histamin praktisch in jedem Nahrungsmittel enthalten ist, sind doch vor allem solche, die eine länger dauernde Herstellung oder Lagerung durchlaufen, besonders histaminreich. Dazu gehören Rotwein, Käse (Marino et al. 2000), Schokolade, Salami und andere haltbar gemachten Rohwürste, Nüsse, Sauerkraut (Taskila et al. 2005), Spinat und Thunfischkonserven (Emborg et al. 2005). Bei vielen Patienten ist die Unverträglichkeit von Nahrungsmitteln auf den Histamingehalt zurückzuführen (Jarisch et al. 2004).

Für die Darmfunktion bedeutet dies, dass sie sowohl durch exogenes, d.h. aus der Nahrung stammendes, als auch durch endogenes, d.h. aus allergischen Reaktionen herrührendes Histamin beeinflusst wird, so dass dort ein wirksamer Schutz bestehen muss.

Nachfolgend soll zunächst die endogene Synthese von Histamin, dann der Abbau dargestellt werden.

## 1.2 Biosynthese von Histamin

Histamin ist ein biogenes Amin, das zu den Gewebshormonen gerechnet wird. Histamin ist in vielen Organen der menschlichen Körpers zu finden, vor allem in der Haut, in der Lunge, in der Schleimhaut des Magen-Darm-Trakts und im Hypothalamus. Dabei ist es besonders angereichert in Mastzellen, basophilen Granulozyten (Riley und West 1953, O'Donnell et al. 1983), den enterochromafin-ähnlichen Zellen (ECL-Zellen) der Magenschleimhaut (Hakanson et al. 1986) und in Neuronen im Nervensystem (Panula et al. 1984). Histamin konnte sogar in der Tränenflüssigkeit von Menschen nachgewiesen werden (Venza et al. 2004).

Im Zellstoffwechsel entsteht Histamin durch Decarboxylierung der Aminosäure L-Histidin durch das Enzym L-Histidin-Decarboxylase ( Abb.1).

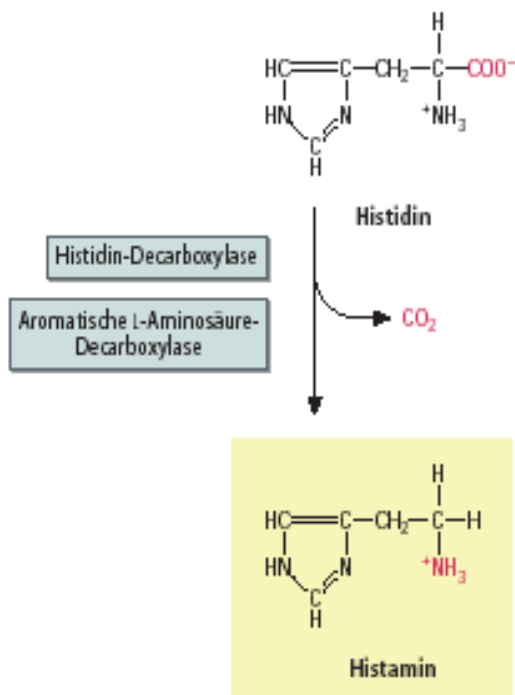


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Biosynthese von Histamin



Zwei Bauelemente setzen Histamin zusammen: Der Imidazolring und die Äthylaminkette, über die jeweils verschiedene Wirkungen im Entzündungsgeschehen vermittelt werden. In Mastzellen und basophilen Granulozyten findet sich Histamin in Granula gespeichert, wo es elektrostatisch an die anionischen Seitenketten von Glykosaminoglykanen gebunden ist. Das entsprechende Glykosaminoglykan in der Mastzelle ist das Heparin, das der basophilen Granulozyten Chondroitin-4-Sulfat. Die Bindung bewirkt eine „Ruhigstellung“ oder Inaktivierung des Histamins. So ist es biologisch unwirksam, aber auch vor Abbau geschützt. Die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen und basophilen Granulozyten erfolgt durch Exozytose der Granula.

Je nach Lokalisation kann das freigesetzte Histamin vielfältige biologische Reaktionen auslösen. Histamin ist ein wichtiger Regulator der Magen-Darm-Funktionen, wie z.B der Produktion von Magensäure, der Darmmotilität und der Ionensekretion von Schleimhäuten. Im Bereich des Gefäßbettes führt Histamin zu Vasodilatation und zu erhöhter Kapilarpermeabilität und damit zu Schwellung und Rötung. Histamin induziert eine vermehrte Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren und sowie die Sekretion von Adrenalin aus dem Nebennierenmark.

Im Gastrointestinaltrakt spielt die Synthese von Histamin eine bedeutende Rolle, doch kann dort dem Körper Histamin auch durch die Nahrung von außen zugeführt werden. Wie schon beschrieben kann vor allem in „gereiften“ oder gelagerten Nahrungsmitteln Histamin in ähnlicher Weise gebildet werden, so dass ein erhöhter Histamingehalt resultiert. Eine dritte Möglichkeit besteht darin, dass mit der Nahrung zugeführte Aminosäuren im Darm durch die intestinale Bakterienflora zu biogenen Aminen decarboxyliert werden. Auf diese Weise entsteht aus Lysin Cadaverin, aus Ornithin Putrescin und aus Histidin Histamin.

### 1.3 Abbau von Histamin

Histamin wird im Körper durch die Enzyme Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) und Diaminoxidase (DAO) über unterschiedliche Wege abgebaut.

HNMT kommt in den meisten Organen vor und ist ein zytosolisches Protein, d.h. das Enzym kann daher auch nur intrazelluläres Histamin abbauen, es hat vor allem den Abbau von körpereigenem Histamin zur Aufgabe. HNMT ist ein monomeres Molekül, das die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf die 1-Position vom Imidazolring von Histamin überträgt (Brown et al. 1959). HNMT kommt besonders in der Magenmucosa, im Lebergewebe, Niere, Ileum, Lunge, Herz und Gehirn vor, je nach Tierart allerdings mit unterschiedlich hoher Aktivität (Brown et al. 1959).

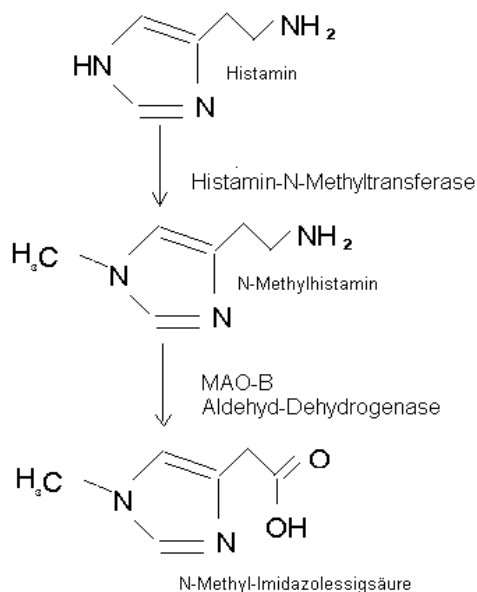


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Histaminabbaus über HNMT

Der zumindest im Gastrointestinaltrakt wichtiger Abbauweg erfolgt durch die DAO (Bieganski et al. 1983; Jarisch et al. 2004). Dieses Enzym wird von den Enterozyten der Darmschleimhaut produziert und ins Blut sezerniert. DAO hat ein Molekulargewicht von ca 90 000 Da und enthält Kupfer. Diaminoxidase ist hauptsächlich im Dünndarm, in der Leber, in den Nieren und im Blut sowie in weißen Blutzellen zu finden.

Die DAO ist als sekretorisches Protein für den Abbau von extrazellulärem Histamin verantwortlich (Schwelberger 2004). Für der Abbau von Histamin im Darm, sei es mit der Nahrung aufgenommen, sei es von der Darmbakterien selbst gebildet, spielt DAO eine zentrale Rolle (Bieganski et al. 1983, Jarisch et al. 2004).

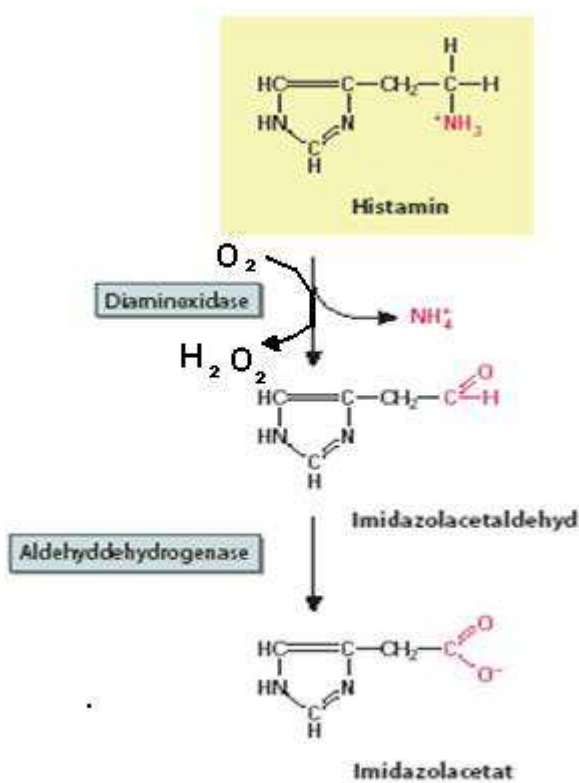


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Histaminabbaus über DAO

DAO ist ein vielfach reguliertes Enzym, das von verschiedenen Substanzen wie anderen biogenen Aminen, Alkohol (Wantke et al. 1998) und seinem Abbauprodukt Acetaldehyd und verschiedenen Medikamenten (Sattler et al. 1988) gehemmt werden kann. Auch durch eine Schädigung der Enterozyten bei gastrointestinalen Erkrankungen kann die Expression vermindert sein (Sattler et al. 1988)

## 1.4 Wirkung von Histamin und Histamin-Rezeptoren

Histamin wird aus den Speicherzellen entweder als Neurotransmitter oder als Gewebshormon freigesetzt und wirkt auf seine Zielzelle über spezifische Rezeptoren, die aufgrund ihrer unterschiedlichen pharmakologischen Hemmbarkeit als H1-H4-Rezeptoren gekennzeichnet werden. Alle Histamin-Rezeptortypen gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren.

- H1-Rezeptoren vermitteln ihre Wirkung über Phospholipase C und kommen in Mastzellen und Nervenzellen vor. Histamin ist in einer biologisch inaktiven Form in den Gewebs- und Blutmastzellen gespeichert, wird bei allergischen Reaktionen freigesetzt und löst über H1-Rezeptoren Vasodilatation, Permeabilitätserhöhung und eine Bronchokonstriktion aus. Daher spielt dieser Rezeptortyp eine wichtige Rolle bei vielen allergischen Erkrankungen (Simons 2004) wie Rhinitis allergica und Asthma bronchiale. Darüber hinaus ist Histamin der klassische Auslöser einer Urticaria und spielt bei Medikamenten-Allergien bzw. Unverträglichkeit eine wichtige Rolle. Die unerwünschten Wirkungen betreffen Kopfschmerzen, Atemwegsobstruktionen, Tachykardie sowie Extrasystolen bis zu massiven Herzproblemen und Magen-Darmbeschwerden, die zu Durchfällen führen können (Jarisch et al. 2004). Durch Stimulation der Rezeptoren auf Endothelzellen kommt es zur Erhöhung der Kapillarpermeabilität. In der Lunge führen H1-Rezeptoren zu Bronchokonstriktion, Vasokonstriktion und Ödematisierung.

- H2-Rezeptoren aktivieren die Adenylatcyclase, fördern somit die Produktion von cAMP und sind regulatorisch an der Produktion der Magensäure beteiligt. In der Magenschleimhaut findet sich Histamin in den sogenannten enterochromaffinartigen Zellen. Ausgehend von diesen Zellen stimuliert Histamin über H2-Rezeptoren die Salzsäure - Produktion der Belegzellen. An glatter Muskulatur wirkt Histamin über den H2-Rezeptor relaxierend, was unter anderem für die Atemwege, den Uterus und die Gefäßmuskulatur gezeigt werden konnte (Foreman et al. 1985, Del Valle und Gantz 1997, Hill et al. 1997). Zudem sind H2-Rezeptoren auch an vielen Funktionen des Immunsystems beteiligt. Eine Stimulation des Rezeptors auf Basophilen und Mastzellen führt zu einer Hemmung der Freisetzung von Histamin (Hill et al. 1997).
- H3-Rezeptoren finden sich im ZNS (Watanabe et al. 1984), wo sie als präsynaptische Autorezeptoren die Freisetzung von Histamin aus histaminergen Neuronen hemmen. Auch in der Peripherie kommen sie vor. Am Herzen, in der Lunge und im Magen konnte die Existenz von H3-Rezeptoren auch gezeigt werden allerdings nur in sehr geringer Dichte (Hill et al. 1997, Coruzzi et al. 2001). In der Lunge werden die Lungenmastzellen aktiviert und im Magen-Darm-Trakt stimulieren H3-Rezeptoren die Magensäuresekretion und die Ileumkontraktion.
- H4-Rezeptoren befinden sich in hoher Dichte im Knochenmark und in peripheren hämatopoetischen Zellen wie Neutrophilen, Eosinophilen, Basophilen, Mastzellen, T-Zellen (Oda et al. 2000, Morse et al. 2001, Zhu et al. 2001) und scheinen bei der Entzündungsreaktionen beteiligt zu sein.

In Tabelle 1 ist eine zusammenfassende Übersicht dargestellt.

H1-Rezeptoren	H2-Rezeptoren	H3-Rezeptoren	H4-Rezeptoren
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Tonus glatter Muskulatur ↑</li> <li>– Darm NO - Freisetzung aus Endothelzellen</li> <li>– Vasodilatation - Öffnung interzellulären Endothellücken</li> <li>– Gefäßpermeabilität ↑</li> <li>– Erregung sensibler Nervenendigungen</li> <li>– Juckreiz</li> <li>– ZNS : Alertheit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Magensäure - Produktion↑</li> <li>– direkte Vasodilatation</li> </ul> <p>(Experimentell):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Herz-Frequenz↑</li> <li>– Kraft↑</li> <li>– Arrhythmogenität↑</li> </ul> <p>(Bedeutung fraglich)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– ZNS: Hemmung der Freisetzung von Histamin (aus histaminergen Neuronen) und von anderen Neurotransmittern</li> </ul>	<p>Lokalisiert auf Mastzellen</p> <p>und</p> <p>Lymphozyten,</p> <p>am Entzündungs-</p> <p>geschehen</p> <p>beteiligt</p>

**Tabelle 1: Durch Rezeptor-Subtypen vermittelte Histamin-Wirkungen ("Pharmakologie und Toxikologie" Lüllmann 2003)**

## 1.5 Histamin und Oxidativer Stress

Oxidativer Stress im chemischen Sinne beschreibt den Zustand der Überflutung mit reaktiven Sauerstoffspezies wie z. B.  $O_2^{\circ-}$ ,  $OH^\circ$  oder  $H_2O_2$ . Heute wird häufig als oxidativer Stress jeder Zustand bezeichnet, der mit entweder einer Erhöhung an Oxidantien oder einem Mangel an Antioxidantien sowohl im Gesamtorganismus als auch in einem Organkompartiment einhergeht. Vom molekularen Sauerstoff ausgehend werden meist durch enzymatische Katalyse hochreaktive Metabolite generiert, die entweder direkt schädigend wirken oder die Bildung von Sekundärreaktionen ermöglichen, die schließlich zu oxidativen Prozessen führen ( Augustin, 2010).

Im Allgemeinen werden die Reaktionen, die zu Verstärkung der radikalischen Wirkungen beitragen, als prooxidative Prozesse bezeichnet. Reaktionen aber, die die radikalischen Wirkungen abschwächen, werden als antioxidative Prozesse zusammengefasst. Ein Ungleichgewicht zwischen den prooxidativen und antioxidativen Prozessen zu Gunsten der prooxidativen Seite und/oder zu Ungunsten der antioxidativen Seite ist typisch für oxidativen Stress (Siems et al. 2005).

Bei praktisch allen degenerativen Erkrankungen sind oxidative Reaktionen der Zellschädigung zu beobachten, sowie Schädigungen der Darmschleimhaut (Boros et al. 1991). Weitere Erkrankungen, die mit erhöhtem oxidativen Stress einhergehen, sind z. B. Atherosklerose, Rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus, Colitis ulcerosa, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson.

Bei der Bearbeitung der Frage, inwieweit in der Darmwand Histamin-induzierte Mechanismen mit oxidativem Stress in Verbindung stehen, wurde zunächst eine eingehende PubMed Recherche durchgeführt, die allerdings vergleichsweise wenige Arbeiten zu diese Thema ergab. Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Histamin und oxidativem Stress in der Darmwand lieferten zwei Dissertationen aus der eigenen Arbeitsgruppe, die zeigen konnten, dass Mastzel-



len (Jandaghi 2011) bzw. Präparate aus der Dünndarmwand durch Histamin zur Radikalproduktion stimuliert werden konnten (Merkel 2010, Jandaghi 2011). Dabei war es bisher bei weiteren Untersuchungen mit Darmwand nicht gelungen, die zelluläre Quelle zu lokalisieren. Dennoch erscheint es denkbar, dass über diese Mechanismen Histamin zu oxidativem Stress in der Darmwand führt und so bei Histaminüberangebot oder allergischer Reaktion zur Pathologie beitragen kann.

## 1.6 Aufbau der Darmwand

Der Dünndarm ( Länge bei Menschen ca. 3 m ) dient der Verdauung und Resorption der Nahrungsstoffe. Er beginnt jenseits des Pylorus, gliedert sich in Duodenum, Jejunum und Ileum. Die Verdauung, also die enzymatische Spaltung der in der Nahrung enthaltenen Makromoleküle zu kleineren Bruchstücken, spielt sich zunächst im Lumen des Dünndarms ab. Die letzten Spaltungsschritte zur Freisetzung der Einzelbausteine sowie deren Resorption laufen an der Oberfläche der Schleimhaut ab. Diese ist durch Falten, Zotten und Mikrovilli enorm vergrößert und wird auf 100 - 200 m<sup>2</sup> geschätzt. Der Dünndarm ist von einschichtigem Zylinderepithel mit Bürstensaum (Enterozyten) und Becherzellen ausgekleidet. Die Wand besteht von innen nach außen aus folgenden Schichten:

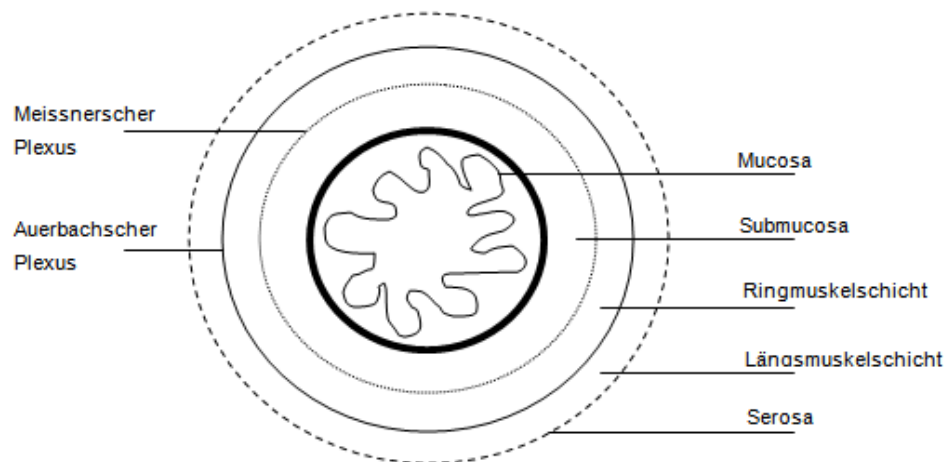


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Dünndarmwand

- **Tunika mucosa** mit den Unterschichten:
  - a. Lamina epithelialis – sie besteht aus einschichtigem Zylinderepithel,
  - b. Lamina propria – sie besteht meist aus zellreichem Bindegewebe mit retikulären Fasern
  - c. Lamina muscularis mucosae – sie besteht aus glatten Muskelzellen und verleiht der Mukosa eine eigene Motilität.

- **Submukosa** (Tela submucosa) - sie besteht aus lockerem Bindegewebe, in ihr befindet sich der Plexus submucosus (Meissnerscher Plexus).
- **Muskularis** (Tela muscularis) – sie besteht aus glatter Muskulatur und ist in Form einer inneren Ringmuskelschicht (Stratum cirkulare) und äußeren Längsmuskelschicht (Stratum longitudinale) angelegt. Zwischen den beiden Muskelschichten befinden sich der Plexus myentericus (Auerbachscher Plexus). Dieser innerviert beide Schichten der Muskulatur.
- **Serosa** (Tunica serosa) mit Subserosa (Tela subserosa) oder Adventitia (Tunica adventitia)

## 1.7 Fragestellung

Vor diesem Hintergrund sollten in der vorgelegten Dissertation weitere Untersuchungen angestellt werden, um den Mechanismus der Histamin-induzierbaren ROS Produktion in der Darmwand durch verschiedene Hemmstoffe zu charakterisieren. Dabei wurde von zwei alternativen Arbeitshypothesen ausgegangen.

Zum einen sollte durch den Einsatz von verschiedenen Histamin-Rezeptor-Blockern untersucht werden, ob die Radikalproduktion durch eine damit hemmbare Rezeptor-vermittelte Zellaktivierung zustande kommt.

Zum anderen sollte aber schon unter der konkreten Annahme, dass an der Reaktion das Enzym Diaminoxidase beteiligt ist, getestet werden, inwieweit Substratspezifität und Hemmwirkungen durch spezifische Inhibitoren für diesen Mechanismus sprechen.

## 2 Materialien

### 2.1 Geräte

Digital-pH-Meter Typ 643-1, Knick, Berlin

Magnetrührer IKAMAG REO, Staufen

Multibiolumat LB 9505C (6 Kanäle), Berthold Technologies, Bad Wildbad

Thermostat Rotilabo-Block-Heater H 250, Roth, Karlsruhe

Waage AC 100, Mettler, Gießen

Waage BP 121 S, Sartorius, Göttingen

### 2.2 Chemikalien

Aminoguanidinehydrochlorid ( $\text{CH}_6\text{N}_4$ ), Sigma-Aldrich, Steinheim

Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ), Roth, Karlsruhe

Cetirizin-Dihydrochlorid (2-[2-[4-[(4-chlorophenyl)-phenyl-methyl]piperazin-1-yl]ethoxy]acetic acid dihydrochlorid), Biotrend Chemicals AG, Wangen/Zürich

Clobenpropitdihydrobromid ( $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{S} \times 2 \text{HBr}$ ), Sigma-Aldrich, Steinheim

Diaminoxidase-Antikörper (DAO-AK), Sigma-Aldrich, Steinheim

$\alpha$ -D-(+)-Glucose-Monohydrat ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \times \text{H}_2\text{O}$ ), Roth, Karlsruhe

Histamin-Dihydrochlorid (2-(4-Imidazolyl) ethylamin-Dihydrochlorid,  $C_5H_9N_3 \times 2$  HCL), Sigma-Aldrich, Steinheim

HEPES-Puffer (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure,  $C_8H_{18}N_2O_4S$ , Roth, Karlsruhe

Kaliumchlorid (KCl), Roth, Karlsruhe

Luminol (5-Aminophthalhydrazid,  $C_8H_7N_3O_2$ ), Merck, Darmstadt

Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $MgSO_4 \times 7 H_2O$ ), Roth, Karlsruhe

Natriumhydroxid (NaOH), Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid (NaCl), Roth, Karlsruhe

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ( $NaH_2PO_4 \times H_2O$ ), Roth, Karlsruhe

Putrescin-Dihydrochlorid (1,4-Diaminobutanedihydrochlorid),  $C_4H_{12}N_2 \times 2HCl$ , Sigma-Aldrich, Steinheim

Ranitidin-Hydrochlorid ( $C_{13}H_{22}N_4O_3S \times HCl$ ), Sigma-Aldrich, Steinheim

Wasserstoffperoxid-Lösung ( $H_2O_2$ ) 30%, Roth, Karlsruhe

## 2.3 Lösungen

### Normal-Tyrode

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1,54 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,19 mM
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2,5 mM
KCl	5 mM
NaCl	118 mM
HEPES	10 mM
Glucose-Monohydrat	5 mM

Die Lösung wurde mit NaOH [10 M] auf pH 7,4 eingestellt.

### Histamin-Stammlösung

Es wurde eine Histamindihydrochlorid-Stammlösung [5 mM] in Tyrode Lösung hergestellt. Weitere Verdünnung erfolgte mit Tyrode-Lösung (auf 50  $\mu\text{M}$ ).

### Luminol-Lösung

Es wurde eine Luminol-Lösung [11,3 mM] in DMSO hergestellt.

### **Putrescin-Stammlösung**

Es wurde eine Putrescindihydrochlorid-Stammlösung [100 mM] in Tyrode Lösung hergestellt. Weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung (100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 1  $\mu$ M).

### **Aminoguanidin-Stammlösung**

Es wurde eine Aminoguanidinhydrochlorid-Stammlösung [110 mM] in Tyrode Lösung hergestellt. Weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode-Lösung (0,55 $\mu$ M; 0,11  $\mu$ M; 0,08  $\mu$ M; 0,055  $\mu$ M und 0,011  $\mu$ M).

### **Clobenpropit-Stammlösung**

Es wurde eine Clobenpropitdihydrobromid-Stammlösung [100 mM] in Tyrode Lösung hergestellt. Weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode Lösung (1000  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 10  $\mu$ M).

### **Ranitidin-Stammlösung**

Es wurde eine Ranitidinhydrochlorid-Stammlösung [100 mM] in Tyrode Lösung hergestellt. Weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode Lösung (1000  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M und 10  $\mu$ M).

### **Cetirizin-Stammlösung**

Es wurde eine Cetirizindihydrochlorid-Stammlösung [100 mM] in Tyrode Lösung hergestellt. Weitere Verdünnungen erfolgten mit Tyrode Lösung (1000  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 10  $\mu$ M).



## **2.4 Biologische Materialien**

Für die Experimente wurde proximales Ileum von Wildtyp-Mäusen verwendet.

Die Mäuse der Zuchtlinie C57Bl6 wurden von Charles River, Sulzfeld bezogen und den gesetzlichen Bestimmungen entsprechend (offene Gemeinschaftskäfige, 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus) in den Tierställen des Physiologischen Instituts Tübingen bei freiem Zugang zu Standardfutter (Nagetierfutter Ssniff, Soest) und Leitungswasser gehalten und weitergezüchtet.

## **3 Methoden**

### **3.1 Gewinnung der Gewebe-Präparate**

Zur Organentnahme, die nach entsprechender Anzeige vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt worden war, wurden 4 bis 24 Monate alte Tiere beider Geschlechter durch CO<sub>2</sub>-Asphyxie und zervikale Dislokation getötet und anschließend die Bauchhöhle durch einen medianen Schnitt geöffnet. Nach Sektion der Bauchdecke wurden 10-15 cm des proximalen Ileums direkt hinter dem Magenausgang entnommen, mit Tyrode Lösung durchspült und von begleitendem Fett- und Bindegewebe befreit.

Es wurden drei Methoden für die Präparation des Dünndarms auf ihre Eignung für die geplanten Versuche zum Nachweis der Histamin-induzierten Radikalproduktion und ihrer pharmakologische Bedeutung getestet.

#### **3.1.1 Präparation von intakten Ileum Ringpräparaten**

Nach Öffnung der Bauchdecke wurden ca. 10 cm des proximalen Ileums entnommen und vorsichtig mit Tyrode-Lösung durchgespült. Anschließend wurde der Darm in ca. 5mm lange Ringpräparate disseziert, die dann direkt für die Messung der histaminstimulierten Radikalproduktion verwendet wurden.

#### **3.1.2 Präparation von homogenisiertem Ileum**

Ein ca. 3 cm langer Darmabschnitt wurde in einem Glas-Pistil-Homogenisator in 0,5ml Tyrode homogenisiert. Das Homogenat wurde für die Messung der Radikalproduktion mittels Luminol-verstärkter Chemilumineszenz verwendet.

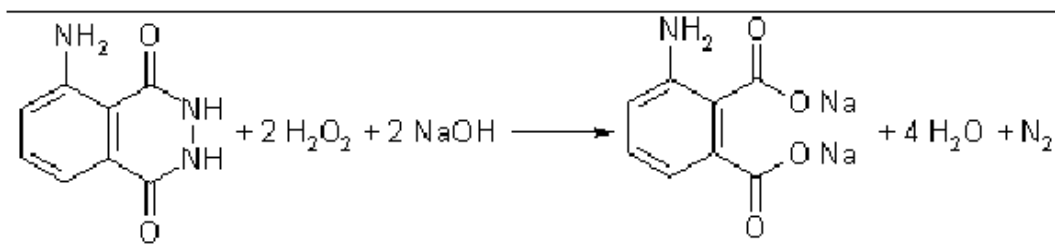
### 3.1.3 Präparation der Submucosa

Ein 3-4 cm langer Darmabschnitt wurde disseziert, anschließend wurde mit einer stumpfen Pinzette die Mucosa samt Chymusresten herausgestrichen und die komplette Tela muscularis ebenfalls mit der stumpfen Pinzette entfernt. Die verbliebene Tela submucosa wurde in ca. 5 mm große Ringpräparate geschnitten und mittels Luminol-verstärkter Chemilumineszenz gemessen (Merkel, 2010).

## 3.2 Luminol-verstärkte Chemilumineszenz

Die Methode der Luminol-Chemilumineszenz wird in der biochemischen und medizinischen Analytik zum Nachweis von Reaktiven-Sauerstoffspezies (ROS) verwendet.

Die Besonderheit der Luminol-Reaktion ist es, dass Luminol im alkalischen Milieu (in diesem Beispiel Wasserstoffperoxid) durch ROS oxidiert wird, wobei die Reaktionsenergie in Form von Licht der Wellenlänge 425nm freigesetzt wird.



**Abbildung 5: Gleichung der Luminol-Reaktion**

Diese Photonen wurden mit einem 6-Kanal-Multibiolumat registriert, die Intensität wurde zeitabhängig in "counts per minute" (cpm) über den Bildschirm graphisch und über den Rechner als Excel-Datei angegeben.

### 3.3 Histamin-induzierte Reaktive-Sauerstoffspezies (ROS)-Produktion

Für jeden Messdurchgang wurden sechs Küvetten mit je 490  $\mu$ l Tyrode und 5  $\mu$ l Luminollösung vorbereitet und jeweils ein ca. 5 mm langer, wie unter 3.1.3 beschrieben präparierter Darmabschnitt dazugegeben und die Chemilumineszenz über den Zeitraum von 10 min gemessen (s. Tabelle 2).

Nach 10 min erfolgte die Zugabe von 5  $\mu$ l Histamin [50  $\mu$ M], die Auswirkung auf die Radikalproduktion wurde für weitere 10 min gemessen.

<b>Lösung</b>	<b>Pipettiervolumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
Tyrode-Lösung	490 $\mu$ l	
Luminol-Lösung [11,3mM]	5 $\mu$ l	113 $\mu$ M
Histamin-Lösung [5 mM]	5 $\mu$ l	50 $\mu$ M
Gewebepräparat		

**Tabelle 2: Reaktionsansatz für die Histamin-induzierte Radikalmessung**

### 3.4 Putrescin-induzierte Reaktive-Sauerstoffspezies (ROS)-Produktion

Für jeden Messdurchgang wurden sechs Küvetten mit je 490  $\mu$ l Tyrode und 5  $\mu$ l Luminol vorbereitet und die präparierten Darmabschnitte zugesetzt. Es wurde 10 min lang im Multibioluminat gemessen, dann 5  $\mu$ l Putrescin in verschiedenen Konzentrationen [100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M] zugefügt, anschließend wurde die Radikalbildung für weitere 10 min gemessen. Der Pipettieransatz ist in Tabelle 3 dargestellt.

<b>Lösung</b>	<b>Pipettiervolumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
Tyrode-Lösung	490 $\mu$ l	
Luminol-Lösung [11,3mM]	5 $\mu$ l	113 $\mu$ M
Putrescin-Lösung [5mM]	5 $\mu$ l	100, 50,10,5 und $\mu$ M
Gewebepräparat		

**Tabelle 3: Reaktionsansatz für die Radikalmessung mit Putrescin**

### 3.5 Hemmung der Reaktive-Sauerstoffspezies (ROS)-Produktion

Ausgehend von der Hypothese, dass die Histamin-induzierte Radikalbildung durch spezifische Rezeptoren vermittelt wird, sollten mit dieser Methode Histaminrezeptor-Antagonisten getestet werden. Der typischer Reaktionsansatz für die nachfolgenden Versuche ist in Tabelle 4 dargestellt:

Lösung	Pipettiervolumen	Endkonzentration
Tyrode-Lösung	485 $\mu$ l	
Luminol-Lösung [11,3mM]	5 $\mu$ l	113 $\mu$ M
Histamin-Lösung [5mM]	5 $\mu$ l	50 $\mu$ M
Hemmstoff-Lösung	5 $\mu$ l	0,01 $\mu$ M – 1000 $\mu$ M je nach Antagonist
Gewebepräparat		

**Tabelle 4: Reaktionsansatz zur Hemmung der Histamin-induzierten Radikalbildung**

Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte insgesamt über 20 min, wobei die Histamin-abhängige Reaktion nach 10 min durch Zupipettieren von Histamin gestartet wurde.

### 3.5.1 Hemmung der ROS durch Histaminrezeptor Antagonisten

- Cetirizin ist ein H1-Antagonist. Cetirizin wurde in den folgenden Versuchen in den Konzentrationen 1000  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Es wurden drei Küvetten mit 485  $\mu\text{l}$  Tyrode, 5  $\mu\text{l}$  Luminol, 5 $\mu\text{l}$  Citirizin und den präparierten Darmabschnitten, und drei mit 490 $\mu\text{l}$  Tyrode, 5  $\mu\text{l}$  Luminol und Darm vorbereitet. Es wurde 10 min lang im Multibiolumat gemessen, dann wurden 5  $\mu\text{l}$  Histamin [50  $\mu\text{M}$ ] zugefügt und weitere 10 min gemessen.
- Ranitidin ist ein H2-Antagonist. Ranitidin wurde in den nachfolgenden Versuchen in verschiedenen Konzentrationen verwendet (1000  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ).
- Clobenpropit ist ein H3-Antagonist. Es wurden Küvetten vorbereitet mit 5  $\mu\text{l}$  Clobenpropit und ohne Hemmstoff. Es wurde 10 min lang im Multibiolumat gemessen, dann wurden 5  $\mu\text{l}$  Histamin [50  $\mu\text{M}$ ] zugefügt und weitere 10 min gemessen. Clobenpropit wurde in den nachfolgenden Versuchen in verschiedenen Konzentrationen verwendet: 1 $\mu\text{M}$ , 0,1 $\mu\text{M}$  und 0,01 $\mu\text{M}$ .

### 3.5.2 Hemmung der ROS-Produktion durch Aminoguanidin

Da als mögliche Radikalquelle auch das Enzym Diaminoxidase in Betracht zu ziehen ist, wurde auch Aminoguanidin als ein Hemmstoff der DAO eingesetzt.

Aminoguanidin wurde in den nachfolgenden Versuchen in verschiedenen Konzentrationen verwendet (0,011 $\mu\text{M}$ , 0,055 $\mu\text{M}$ , 0,11 $\mu\text{M}$  und 0,55 $\mu\text{M}$ ).

### 3.5.3 Einfluss der DAO-Antikörper auf die Histamin-induzierte Radikalproduktion

Da die Versuche mit Putrescin als Substrat und Aminoguanidin darauf hinweisen, dass DAO für die Radikalproduktion entscheidend ist, wurden auch Antikörper für spezifische Hemmversuche eingesetzt.

Die Submucosa-Darmpräparate wurden für 40 min mit DAO-AK (10µg/ml) bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Dafür wurden drei Darmpräparate mit je 196µl Ampuwa und 4µl DAO-AK(0,5µg/ml) vorbereitet. Als Kontrolle wurden auch Präparate ohne DAO-AK für 40min bei 37°C in 200µl Ampuwa inkubiert.

Für die Messung der Radikalproduktion wurden Küvetten mit 490 µl Tyrode, 5 µl Luminol und den mit AK-inkubierten Darmabschnitten vorbereitet. Wie beschrieben, wurde 10 min lang die basal Reaktion in Multiblumat gemessen, dann wurden 5 µl Histamin [50 µM] zur Stimulation hinzugefügt und für weitere 10 min gemessen.

## 3.6 Untersuchungen am humanen Ileumgewebe

Im Rahmen eines Projektes am humanen Darm, das von der Ethikkommission genehmigt worden war, standen einige dissezierte Proben aus normalem Ileum nach OP zur Verfügung, an denen in Vorversuchen folgende vergleichbare Methoden angewandt wurden.

- Nachweis der Histamin-induzierten ROS Produktion
- Substratspezifität der Reaktion
- Hemmung durch H3-Blocker und Antikörper



Da diese Fragestellung in der vorliegende Dissertation aber nicht weiter verfolgt wurde, werden die vorläufigen Ergebnisse hier in 4.4 mit dargestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss der Substrat Konzentration auf ROS Produktion

#### 4.1.1 Einfluss der Histamin Konzentration auf ROS Produktion

In Abb.6 ist ein typischer Verlauf der Chemilumineszenz-Messung der durch Histamin-stimulierten Radikalproduktion dargestellt. Der Reaktionsverlauf zeigt, dass ohne Histamin keine basale Radikalproduktion des Darmgewebes nachgewiesen werden kann. Erst nach der Zugabe von Histamin erfolgte ein starker Anstieg der Chemilumineszenz.

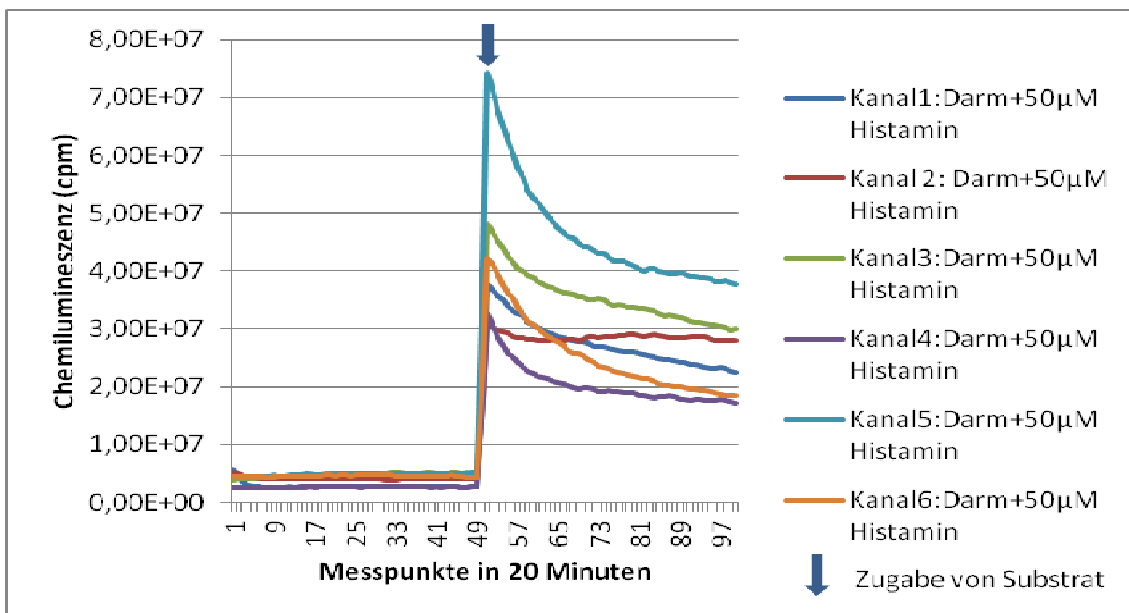
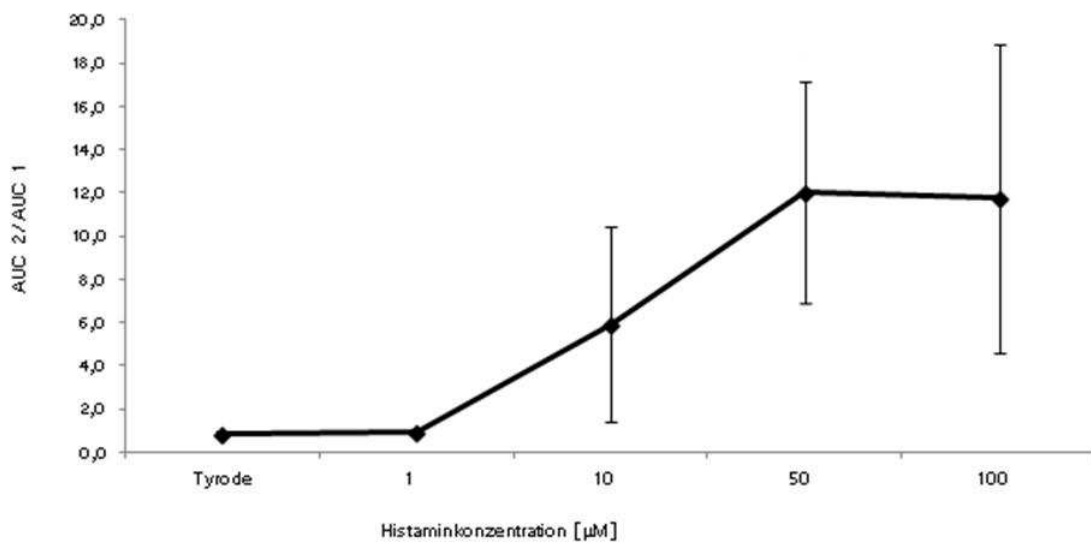


Abbildung 6: Radikalbildung in Submucosa durch Histamin-Stimulation. Dargestellt ist eine typische Originalregistrierung der Chemilumineszenzmessung im 6-Kanal Bioluminat bei einer Histamin Konzentration von 50µM. Die Gewebepreparate stammen von einem exzidierten Darmabschnitt.



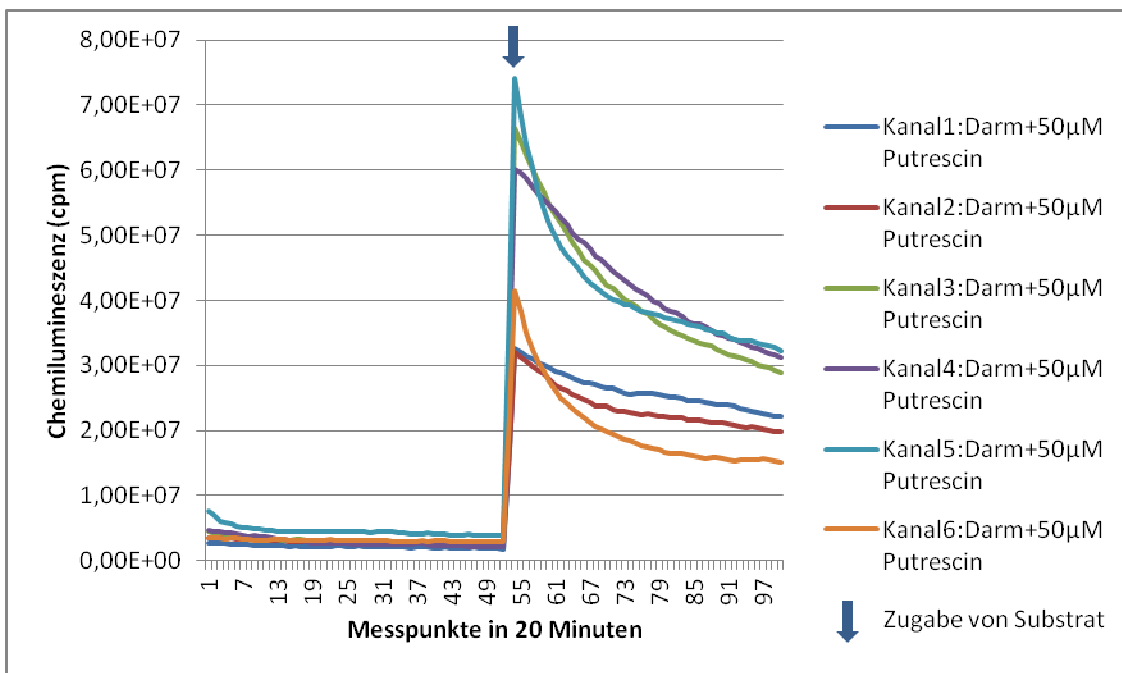
**Abbildung 7: Dosis-Wirkungskurve von Histamin. MW $\pm$ SD, n=10 pro Konzentration (Merkel 2010)**

Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurve wurden Histaminkonzentrationen bis zu 100µM eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abb.7 dargestellt und zeigt eine Sättigung ab einer Histaminkonzentration von 50 µM, während bei 1µM praktisch keine Reaktion messbar war.

Anhand dieser Ergebnisse wurde für alle weiteren Versuche die Konzentration von 50µM als Standardkonzentration von Histamin gewählt.

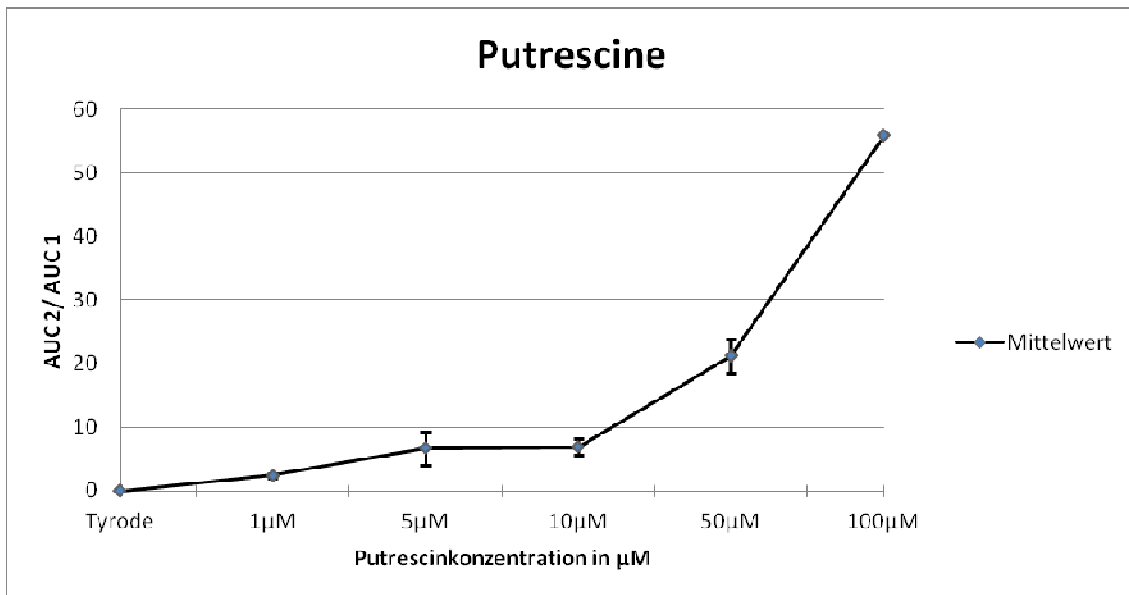
#### 4.1.2 Einfluss der Putrescin Konzentration auf ROS Produktion

Parallel zur Bestimmung des Effekts von Histamin auf die Radikalproduktion wurde auch die Wirkung von Putrescin untersucht. Ein typischer Verlauf der Chemilumineszenz-Messung durch Putrescin-stimulierte Radikalproduktion ist in Abb.8 dargestellt. Auch hier zeigt sich, dass vor der Zugabe des Substrats keine Radikalproduktion auftritt. Die Chemilumineszenz steigt erst nach der Zugabe von Putrescin sehr stark an, sie verläuft sehr ähnlich wie bei der Stimulation mit Histamin.



**Abbildung 8: Radikalbildung in der Submucosa durch Putrescin-Stimulation. Dargestellt ist eine typische Originalregistrierung der Chemilumineszenzmessung im 6-Kanal Bioluminat bei einer Putrescin Konzentration von 50µM. Die Gewebepräparate stammen von einem exzidierten Darm.**

Zur Erstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung wurden Putrescinkonzentrationen bis zu 100µM eingesetzt. Das Ergebnis ist in Abb.9 dargestellt.



**Abbildung 9: Dosis-Wirkungskurve von Putrescin.** Dargestellt ist die aus der Chemilumineszenzmessung ermittelte Stimulierbarkeit. Die Symbole stellen MW +/- SD von jeweils 18 Messungen aus Darmproben von drei Tieren dar.

Das Ergebnis zeigt, dass bei Putrescin im Vergleich zu Histamin selbst bei 100µM noch keine Sättigung erreicht ist, während bei 1µM praktisch keine Reaktion messbar ist.

## 4.2 Einfluss der Histamin-Rezeptor Antagonisten auf die Histamin-induzierte Radikalproduktion

### 4.2.1 Einfluss des H3-Rezeptor Antagonisten Clobenpropit auf die Histamin-induzierte Radikalproduktion

Der H3-Blocker Clobenpropit wurde in Konzentrationen von 0.01 $\mu$ M, 0.1 $\mu$ M und 1 $\mu$ M auf die Histamin-stimulierte Radikalproduktion getestet. Ein typischer Messdurchgang, bei dem die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz gemessen wurde, ist in Abb.10 (Konzentration von Clobenpropit ist 0,1  $\mu$ M) dargestellt. In den Kanälen 1-3, bei denen die Messung in Gegenwart von Clobenpropit erfolgte, ist die Hemmung der Radikalproduktion deutlich zu beobachten.

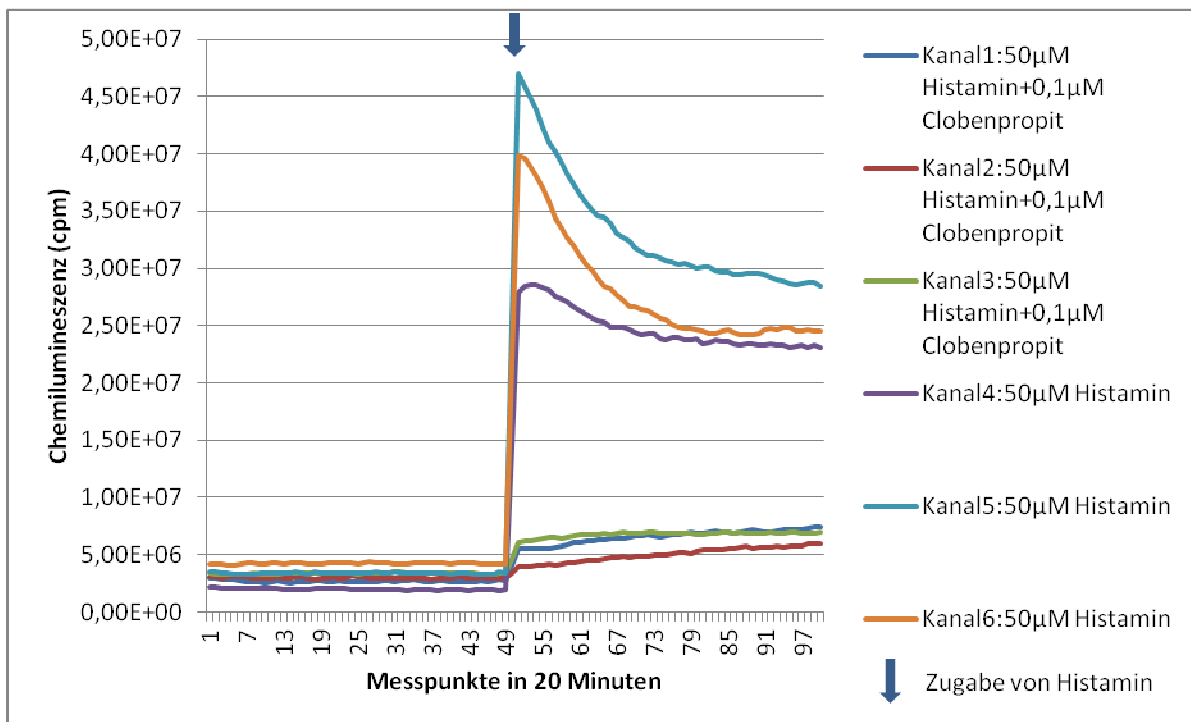
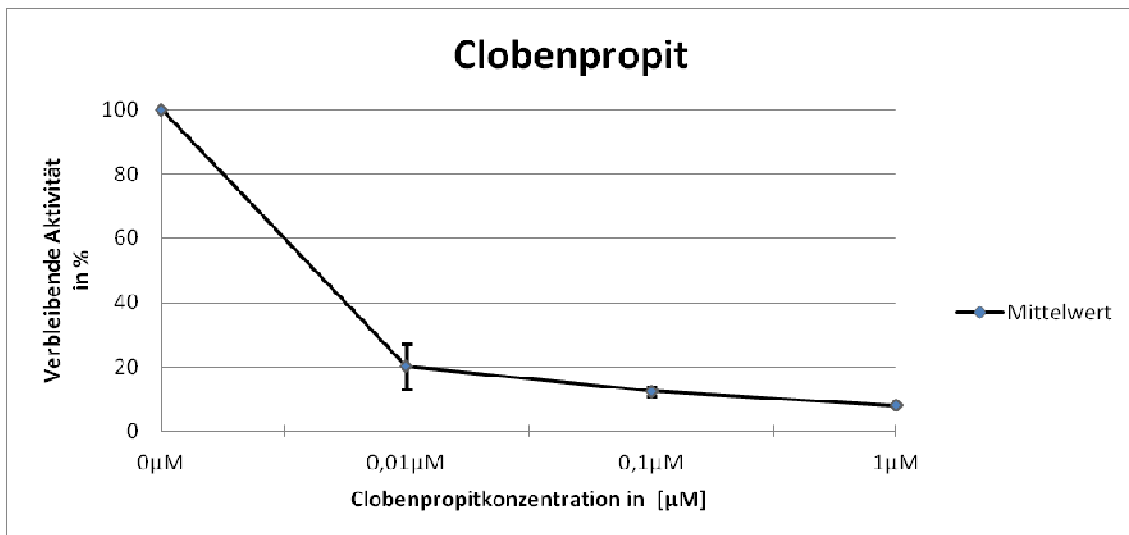


Abbildung 10: Hemmung der ROS-Bildung durch H3-Rezeptor-Antagonist Clobenpropit. Dargestellt ist die Originalregistrierung eines typischen Messdurchgangs für 0,1 $\mu$ M Clobenpropit.

Die Zusammenfassung aller Messergebnisse im gesamten untersuchten Dosis-Wirkungsbereich ist in Abb.11 dargestellt.



**Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Wirkung von Clobenpropit auf die Stimulation der Radikalbildung durch Histamin. Dargestellt ist die aus der Chemilumineszenzmessung ermittelte Stimulierbarkeit, wobei die Kontrollansätze ohne Hemmstoff als 100% gesetzt wurden. Die Messpunkte stellen Mittelwerte +/- SD von jeweils 18 Messungen mit Gewebepreparaten von drei Tieren dar.**

Schon bei einer Konzentration von 0.01 µM Clobenpropit ist eine Hemmung der Radikalbildung von ca. 80% zu finden, allerdings mit einer im Vergleich zu den anderen Konzentrationen großen Standardabweichung. Bei Konzentrationen von 0,1 µM bis 1µM Clobenpropit beträgt die Hemmung der Radikalbildung über 90%, wobei die Standardabweichung sehr gering ausfällt. Es ist ersichtlich, dass dieser Antagonist eine starke Hemmung ausübt und zwar bereits in einem Konzentrationbereich unter 0.01µM.

#### 4.2.2 Einfluss des H2-Rezeptor Antagonisten Ranitidin auf die Histamin-induzierte Radikalproduktion

Ranitidin, ein H2-Rezeptor Antagonist, wurde in Konzentrationen von 10µM, 100µM und 1000µM auf die Histamin-stimulierte Radikalproduktion getestet. Ein typischer Ablauf der Reaktionsansätze mit 10µM des Hemmstoffes, bei denen die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz gemessen wurde, ist in Abb.12 dargestellt.

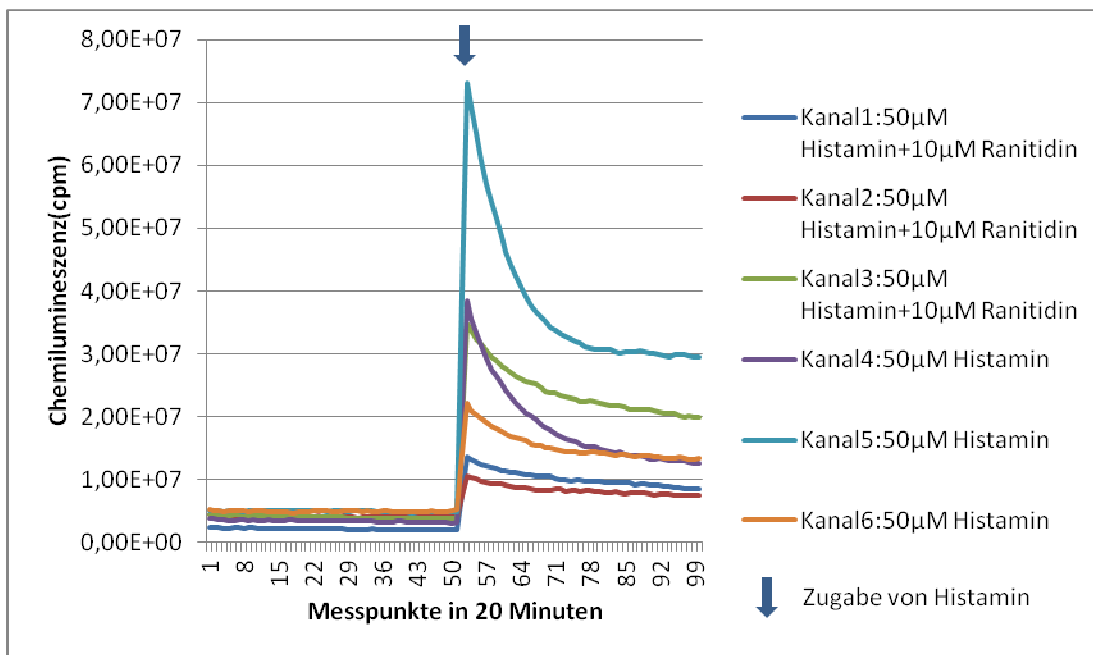
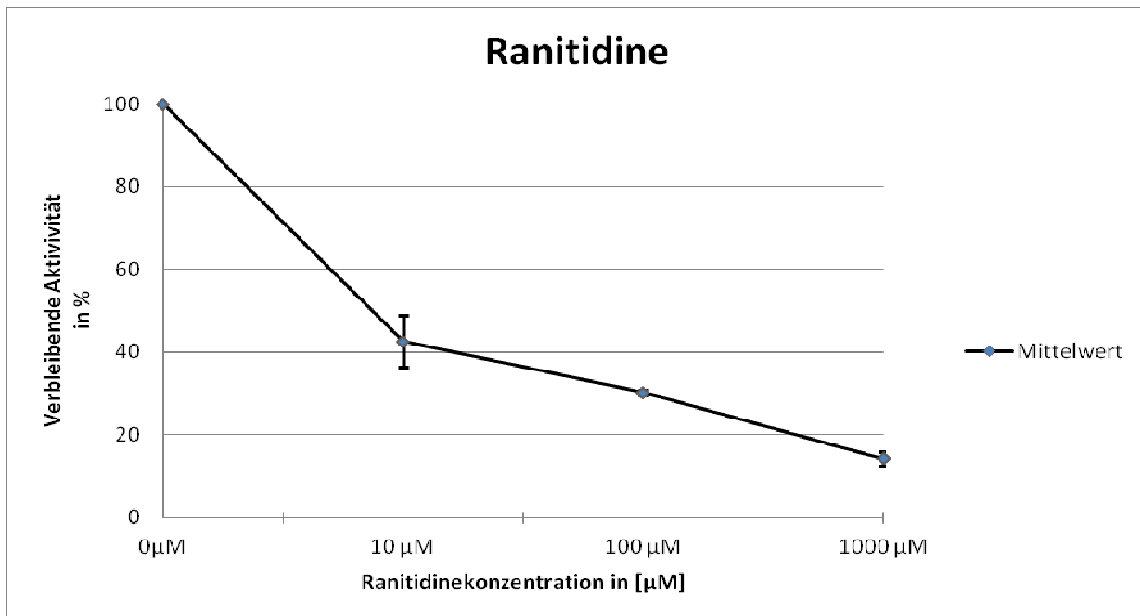


Abbildung 12: Hemmung der ROS-Bildung durch H2-Rezeptor-Antagonist Ranitidin. Dargestellt ist die Originalregistrierung eines typischen Messdurchgangs für 10µM Ranitidin

Die Zusammenfassung der Untersuchungen im gesamten Dosis-Wirkungsbereich ist in Abb.13 dargestellt. Die Radikalproduktion konnte durch



den H<sub>2</sub>-Blocker Ranitidin gehemmt werden, allerdings im Vergleich zu Clobenpropit erst bei deutlich höheren Konzentrationen. Bei 10  $\mu$ M beträgt die Hemmung etwa 60%, bei 100  $\mu$ M wird eine 70% Hemmung erreicht. Die Konzentration von 1 mM dürfte pharmakologisch nicht mehr von Interesse sein.



**Abbildung 13: Konzentrationsabhängige Wirkung von Ranitidin auf die Stimulation der Radikalbildung durch Histamin. Dargestellt ist die aus der Chemilumineszenzmessung ermittelte Stimulierbarkeit, wobei die Kontrollansätze ohne Hemmstoff als 100% gesetzt wurden. Die Messpunkte stellen MW +/-SD von jeweils 18 Messungen mit Gewebepräparaten von drei Tieren dar.**

#### 4.2.3 Einfluss des H1-Rezeptor Antagonisten Cetirizin auf die Histamin-induzierte Radikalproduktion

Beim H1-Blocker Cetirizin wurden Konzentrationen von 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M und 1000 $\mu$ M auf Histamin-stimulierte Radikalproduktion getestet. Ein typischer Ablauf der Reaktionsansätze, bei denen Luminol-verstärkte Chemilumineszenz gemessen wurde, ist in Abb.14 dargestellt. Die Konzentration von Cetirizin ist 100 $\mu$ M.

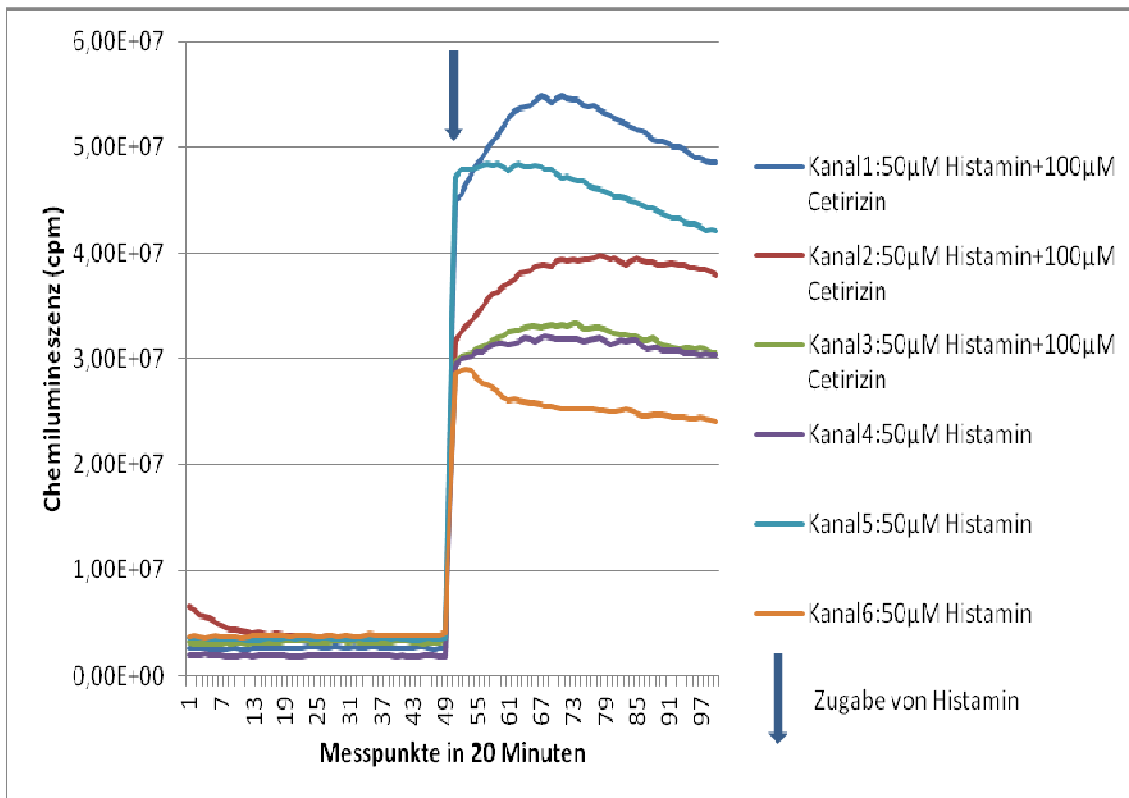
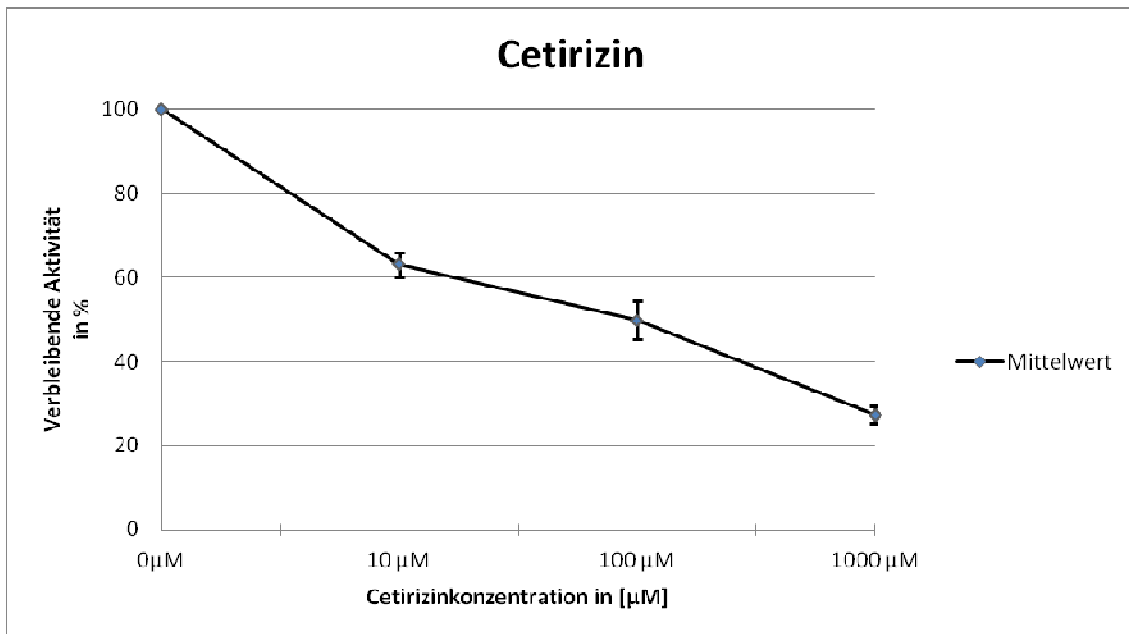


Abbildung 14: Hemmung der ROS-Bildung durch H1-Antagonist Cetirizin. Dargestellt ist die Originalregistrierung eines typischen Durchgangs für 100 $\mu$ M Cetirizin

Die Zusammenfassung des gesamten Dosis-Wirkungsbereichs erfolgt in Abb.15.



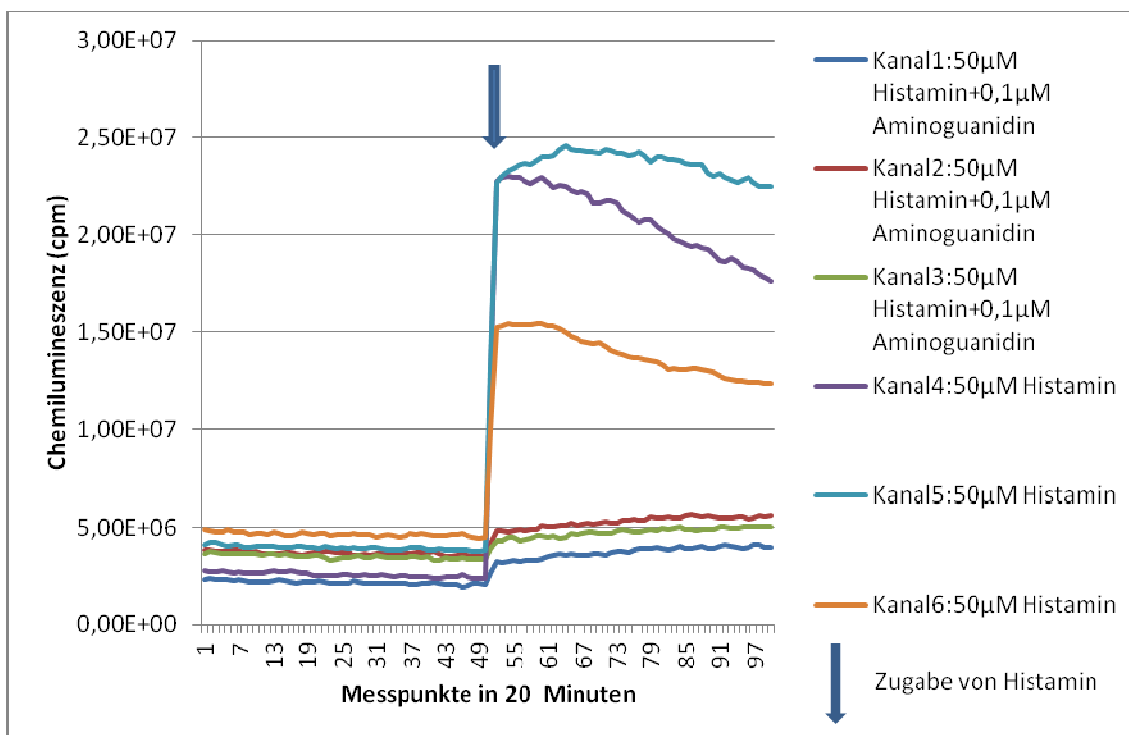
**Abbildung 15: Konzentrationsabhängige Wirkung von Cetirizin auf die Stimulation der Radikalbildung durch Histamin. Dargestellt ist die aus der Chemilumineszenzmessung ermittelte Stimulierbarkeit, wobei die Kontrollansätze ohne Hemmstoff als 100% gesetzt wurden. Die Messpunkte stellen MW +/- SD von jeweils 18 Messungen mit Gewebepräparaten von drei Tieren dar.**

Die Radikalbildung konnte durch den H1-Antagonisten Cetirizin gehemmt werden, allerdings im Vergleich zu Clobenpropit und Ranitidin erst bei deutlich höheren Konzentrationen.

Bei einer Konzentration von 10µM beträgt die Hemmung etwa 40%, bei 100µM wird etwa 50% Hemmung erreicht. Bei einer Konzentration von 1000µM beträgt die Hemmung ungefähr 70%, aber das dürfte pharmakologisch nicht mehr von Interesse sein.

### 4.3 Einfluss von Aminoguanidin auf Histamin-induzierte Radikalproduktion

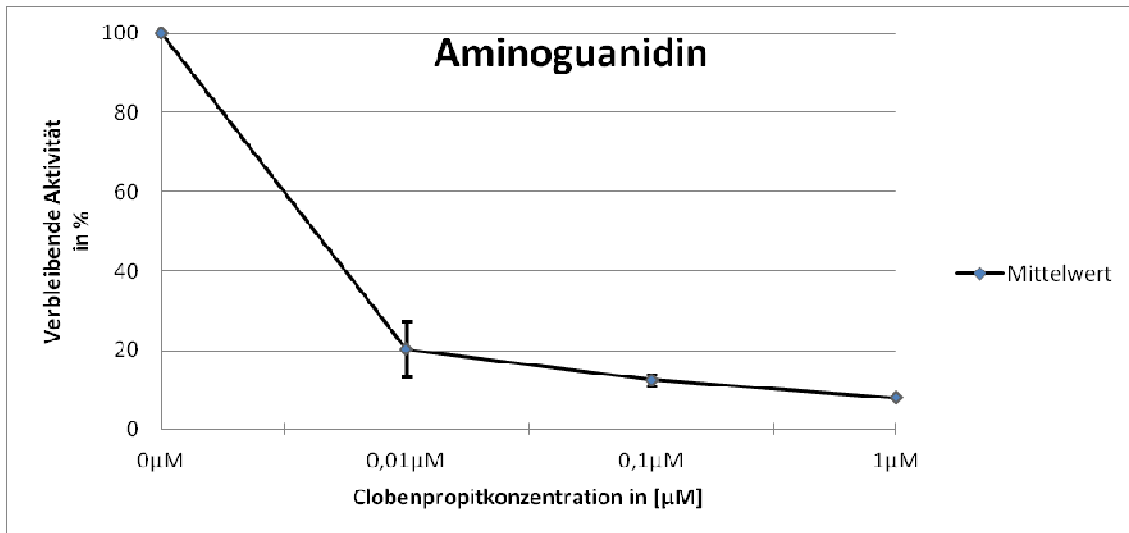
Aminoguanidin, das als Hemmstoff der DAO beschrieben ist, wurde in den Konzentrationen 0,01µM, 0,1µM und 1µM getestet. Ein typischer Verlauf eines Messdurchgangs bei einer Konzentration von Aminoguanidin von 0,1µM ist in Abb.16 dargestellt.



**Abbildung 16: Hemmung der ROS-Produktion durch den DAO-Hemmstoff Aminoguanidin. Dargestellt ist die Originalregistrierung eines typischen Messdurchgangs für 0,1µM Aminoguanidin**

Es ist zu sehen, dass nach Zugabe von Histamin die Kanäle 1-3, bei denen die Messung in Gegenwart von Aminoguanidin erfolgte, eine deutliche Hemmung der Chemilumineszenz auftrat. Die Kanäle 4-6, bei denen Aminoguanidin fehlte, zeigten einen sehr starken Anstieg der Chemilumineszenz.

Die Zusammenfassung aller Messergebnisse im gesamten untersuchten Dosis-Wirkungsbereich erfolgt in Abb. 17.



**Abbildung 17: Konzentrationsabhängige Wirkung von Aminoguanidin auf die Stimulation der Radikalbildung durch Histamin.** Dargestellt ist die aus der Chemilumineszenzmessung ermittelte Stimulierbarkeit, wobei die Kontrollansätze ohne Hemmstoff als 100% gesetzt wurden. Die Messpunkte stellen MW +/- SD von jeweils 18 Messungen mit Gewebepreparaten von drei Tieren dar.

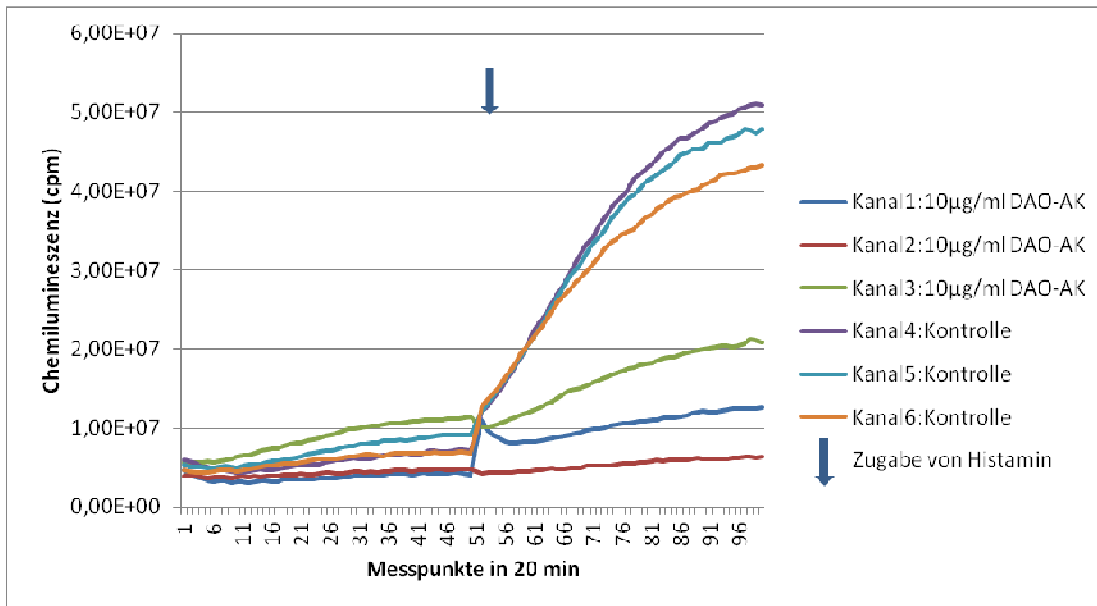
Die Histamin-stimulierte Radikalproduktion konnte durch den DAO-Hemmstoff Aminoguanidin bereits bei einer Konzentration von 0,01 µM um ca. 80% gehemmt werden, allerdings mit einer im Vergleich zu den anderen Konzentrationen großen Standardabweichung. Bei Konzentrationen von 1 µM beträgt die Hemmung der Radikalbildung über 90%.

## **4.4 Ergebnisse von Vorversuchen an humanen Darmpräparaten**

### **4.4.1 Einfluss der Diaminoxidase-Antikörper ( DAO-AK) auf Histamin-induzierte Radikalproduktion**

In diesem Ergebnisteil werden Resultate von Vorversuchen dargestellt, die im Rahmen eines von der Ethikkommission genehmigten Vorhabens an humanem OP-Material durchgeführt wurden. Die humanen Darmpräparate wurden von der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie als frisches Gewebe direkt nach der Entnahme zur Verfügung gestellt, wobei der Datenschutz eingehalten und die Proben in anonymisierter Form übergeben wurden.

In diesem Versuch wurden die Submucosapräparate wie beim Mäusedarm beschrieben mit Antikörpern (AK) für 40 min bei 37°C inkubiert. Typische Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt.



**Abbildung 18: Hemmung der Histamin-induzierten Radikalproduktion im humanen Dünndarmpräparat durch DAO-AK. Dargestellt ist eine typische Originalregistrierung der Chemilumineszenzmessung im 6-Kanal Bioluminat. Die Gewebepräparate stammen von einem exzidierten Darmabschnitt.**

Aus der Grafik in Abb. 18 können mehrere wichtige Befunde abgeleitet werden:

- Schon bevor das Substrat Histamin zugefügt wird, zeigen die humanen Darmpräparate eine mehr oder weniger deutliche spontane Radikalbildung.
- Durch Zusatz von Histamin wird die Radikalbildung deutlich gesteigert, ähnlich wie bei Gewebe aus Mäusedarm.
- Und, ebenso wie bei der Maus, wird diese Radikalbildung durch Stimulation mit Antikörpern, die gegen DAO gerichtet sind, gehemmt.

#### 4.4.2 Einfluss von Putrescin auf die ROS-Produktion beim humanen Dünndarmpräparat

Bei diesen Versuchen wurde die Wirkung von Putrescin an humanem Dünndarmpräparat untersucht. Die angewandte Methodik wurde analog zu der in den vorangegangenen Versuchen mit Mäusedarm gewählt.

Die Originalregistrierung in Abb. 19 zeigt, dass Putrescin eine ähnliche Wirkung auf humane Dünndarmpräparate aufweist, wie sie auch an die Präparaten aus Mäuseileum gefunden wurden.

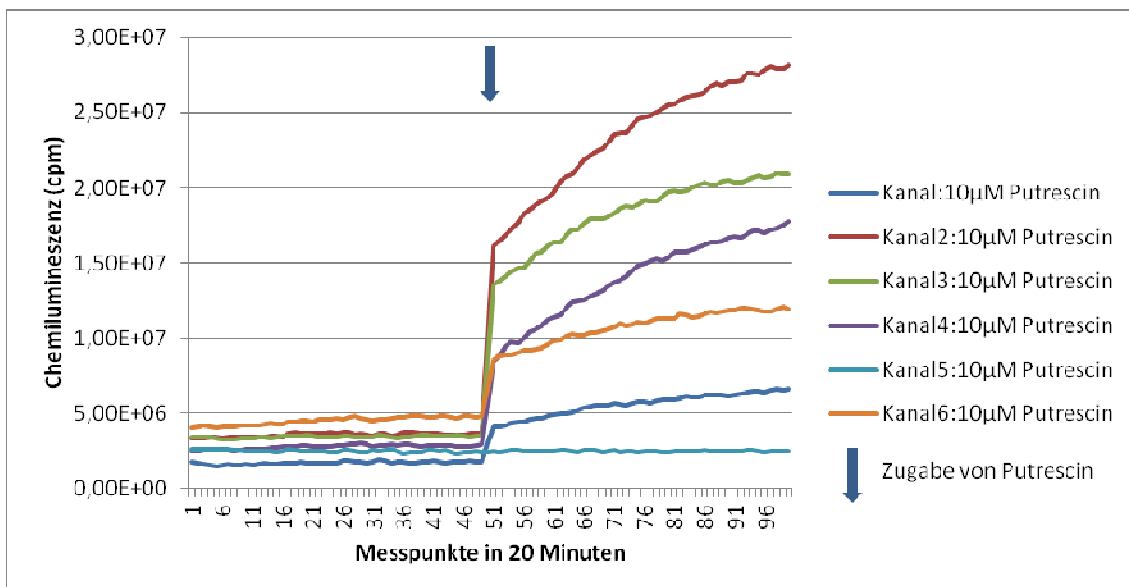


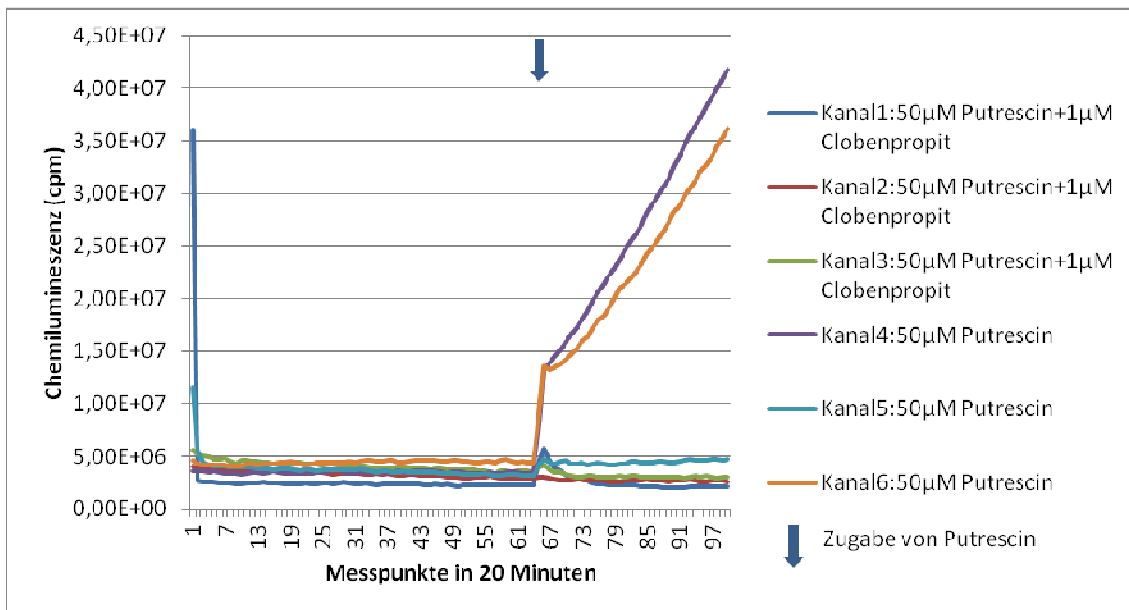
Abbildung 19: Radikalproduktion im humanen Dünndarmpräparat durch Putrescin Stimulation. Dargestellt ist eine typische Originalregistrierung der Chemilumineszenzmessung im 6-Kanal Bioluminat bei einer Putrescin Konzentration von 10µM. Die Gewebepreparate stammen von einem exzidierten Darmabschnitt.



#### 4.4.3 Einfluss des H3-Rezeptor Antagonisten Clobenpropit auf Putrescin-induzierte Radikalproduktion am humanen Dünndarmpräparat

Im folgenden Versuch wurde die Wirkung des H3-Rezeptor Antagonisten Clobenpropit auf die Putrescin-induzierte Radikalproduktion am humanen Dünndarmpräparat untersucht.

Wie in Abb. 20 zu sehen ist, weist Clobenpropit ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die Radikalbildung auf. Das Ausmaß der Hemmung ist bei einer Konzentration von 1µM vergleichbar mit den Effekten, die bei den Versuchen mit den Maus-Dünndarmpräparaten gefunden wurden.



**Abbildung 20: Hemmung der Putrescin-induzierten Radikalproduktion durch Clobenpropit am humanen Dünndarmpräparat. Dargestellt ist eine typische Originalregistrierung der Chemilumineszenzmessung. Die Gewebepräparate stammen von einem exziierten Darmabschnitt.**

Diese wenigen Vorversuche mit humanen Darmpräparaten lassen erkennen, dass auch hier eine Histamin-abhängige ROS-Produktion vorhanden ist, deren Eigenschaften sich ähnlich wie beim Mäusedarm verhalten.

## 5 Diskussion

### 5.1 Rolle von Histamin im Darm und oxidativer Stress

Histamin, das über die Nahrung aufgenommen, von Darmbakterien produziert oder von Zellen der Darmwand selbst sezerniert werden kann, spielt für die Funktion des Darmes eine bedeutende Rolle, die sowohl in den physiologischen Regulationen als auch in vielen pathophysiologischen Prozessen zu finden ist. Besonders bei Nahrungsmittelunverträglichkeit und allergisch-entzündlichen Reaktionen ist Histamin involviert, so dass die Frage nach seinem Metabolismus, speziell seinem Abbau, gestellt werden muss.

Obwohl die Diaminoxidase als Histamin-abbauendes Enzym schon vor ca. vier Jahrzehnten im Darm nachgewiesen und charakterisiert wurde, ist die Bedeutung dieses Enzyms als Radikalquelle und Ursache für oxidativen Stress in der Darmwand wenig erforscht. Eine Recherche über den Literaturdienst von PubMed ergab nur wenige entsprechende Zitate.

Von Sattler et al. wurde ein Krankheitskonzept der „food induced or enteral histaminosis“ eingeführt. Dabei wurde angenommen, dass die Pathogenese durch große Mengen an intestinalem Histamin bedingt ist, das entweder aus der Nahrung oder aus einer gastrointestinalen Blutung stammen soll (Sattler et al. 1989).

Sessa et al. haben Untersuchungen zur Morphologie und funktionellen Bedeutung der DAO in der Dünndarmschleimhaut angestellt. Vor allem bei Patienten mit Darmerkrankungen, die mit einer Verminderung der Enterozyten einhergehen, wie Zöliakie, Morbus Crohn und intestinale Schleimhautatrophie konnten sie beobachten, dass im aktiven Krankheitsstadium eine Abnahme der DAO-Aktivität und eine Erhöhung der Histaminausschüttung im Darm auftreten (Sessa et al. 1994).

Schmidt et al. konnten zeigen, dass intestinale Schleimhautproben von Morbus Crohn Patienten eine deutlich niedrigere DAO-Aktivität aufweisen, als solche aus gesundem Gewebe. Insofern wurde zu dieser Zeit in der DAO eher ein Schutzmechanismus gesehen, was auch dadurch unterstrichen wird, dass dieses Enzym zur Therapie der Histaminunverträglichkeit empfohlen wurde (Schmidt et al. 1990).

Dass durch Histamin auch oxidativer Stress in der Darmwand ausgelöst werden kann, rückte erst durch zwei in unserer Arbeitsgruppe am Physiologischen Institut erstellte Dissertationen ins Blickfeld. In diesen wurde gezeigt, dass einerseits Mastzellen durch Histamin zur ROS Produktion stimuliert werden können (Jan-daghi, 2011), und dass andererseits im Mäusedarm eine Histamin-abhängige Quelle für Radikale existiert. Allerdings hatten die dazu durchgeführten histologischen Untersuchungen der Gewebepräparate keine klaren Zusammenhänge zur zellulären Lokalisation der Radikalbildung ergeben (Merkel, 2010).

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorgelegten Arbeit durch Untersuchung der Substratspezifität und der Hemmbarkeit durch pharmakologische Wirkstoffe und spezifische Antikörper die Radikalquelle weiter charakterisiert werden.

## 5.2 Substratspezifität

Schon unter dem Verdacht, dass die Histamin-induzierte ROS Bildung durch ein individuelles Enzym mit Oxidaseaktivität katalysiert werden könnte, wurde untersucht, inwieweit das Substrat Histamin auch durch Putrescin ersetzt werden kann. Diese Ergebnisse sollen zunächst diskutiert werden, im Anschluss daran die der pharmakologischen Hemmversuche die parallel dazu mit den H-Rezeptor Antagonisten durchgeführt wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass Histamin und Putrescin etwa in der gleichen Dosis-Wirkungs-Relation als Substrate für die Reaktion eingesetzt werden können. Damit ist von den möglichen Enzymen, die als direkte, histaminabhängige Radikalquelle in Betracht kommen, vor allem das Enzym DAO von Interesse.

Kusche et al. haben die Fähigkeit des Darms, verschiedene Amine durch oxidative Desaminierung zu inaktivieren, untersucht. Sie konnten zeigen, dass die DAO die Substrate Putrescin und Histamin desaminiert, Serotonin dagegen nicht. DAO wurde von Aminoguanidin gehemmt, nicht aber von Pargylin. Die lösliche Monoaminoxidase (MAO) inaktivierte Serotonin, nicht aber Histamin und Putrescin. MAO wurde von Pargylin gehemmt, nicht aber von Aminoguanidin. Dadurch haben Kusche und Kollegen festgestellt, dass in Hunde- sowie in Kaninchendünndarm nur Diaminoxidase in der Lage war, Histamin und Putrescin durch oxidative Desaminierung zu inaktivieren (Kusche et al. 1975).

Bieganski et al. haben in ihrer Studie am menschlichen Darm die Substrat- und Inhibitor-Spezifität von DAO getestet. Dabei haben sie festgestellt, dass Putrescin das beste Substrat für die menschliche DAO ist, und dass mit Histamin etwa 50% der Reaktionsgeschwindigkeit von Putrescin erreicht wurde (Bieganski et al. 1980).

Bei der Histaminintoleranz wird das Missverhältnis zwischen Rezeptorfunktion und Histaminabbau meistens auf einen Mangel an Enzym DAO zurückgeführt,

was u.a. zu einer lokalen oder systemischen Erhöhung der Histaminkonzentrationen führen kann (Weidenhiller et al. 2012).

Diese Befunde können zumindest als Hinweise dafür aufgefasst werden, dass bei den Versuchen am Ileum von Maus und Mensch DAO als radikalbildendes Enzym beteiligt ist. Allerdings scheinen die publizierten  $K_m$ -Werte von DAO für Histamin(=20mM) (Maintz und Novak 2007) nicht mit den hier gefundenen Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Histamin bzw. Putrescin übereinzustimmen.

### **5.3 Hemmbarkeit der Histamin-induzierten Radikalproduktion durch Histamin-Rezeptor-Blocker**

Trotz der ersten, in 5.2 beschriebene Schlussfolgerungen, wurden die Versuche mit den Rezeptorblockern durchgeführt, die für sich interessante Ergebnisse ergaben.

Obwohl vier Typen von Histamin-Rezeptoren H1 bis H4, die sich in Vorkommen, Regulation und Funktion unterscheiden, beschrieben sind, wurden nur Antagonisten gegen H1-H3 eingesetzt. Während für H1 und H2 ein großes Spektrum an Blockern zur Verfügung steht, aus dem Cetirizin (H1-Antihistaminikum) und Ranitidin (H2-Antihistaminikum) ausgewählt wurden, sind H3-Antagonisten noch eher in der Erprobungsphase. Hier wurde das häufig zur Verfügung stehenden Clobenpropit verwendet. H4 Antagonisten haben gerade die erste Schwelle vom Labor zur Klinik überwunden und sind noch nicht im Handel.

Die erhaltenen Dosis-Wirkungskurven zeigen, dass der H3-Rezeptor-Antagonist Clobenpropit die beste Hemmung der Radikalbildung aufweist und schon bei einer Konzentration von 1 $\mu$ M die Reaktion um 90% hemmen konnte. Geringer ist die Hemmwirkung von den H1- und den H2-Antihistaminika, die erst bei Konzentrationen von 10 $\mu$ M und höher einen deutlichen Effekt zeigten. Um diese Befunde richtig bewerten zu können, muss die Frage nach Vorkommen und Bedeutung der Histamin Rezeptoren im Magen-Darm-Trakt nochmals genauer angesehen werden, wobei offensichtlich vor allem der H3-Rezeptor von Interesse ist. Auf H1- und H2-Rezeptoren wurde schon in der Einleitung (1.4) eingegangen. Die Existenz eines H3-Rezeptors wurde in viele Studien am Meerschweinchen-Darm-Modell (Lui et al. 2000; Blandizzi et al. 2000; Frieling et al. 1993; Tamura et al. 1988) belegt. Auch an Schweine-Dünndarm konnte er nachgewiesen werden; z.B wurde eine hemmende Wirkung von H3-Rezeptor-Stimulation auf die Serotonin-Freisetzung aus enterochromaffinen Zellen in Streifen von Schweine-Dünndarm beobachtet (Schwörer et al. 1994).

Im Unterschied zu tierischen Modellen scheint die Situation beim Menschen anders zu sein. Sander et al. fanden an humanem Darmgewebe heraus, dass H1-, H2- und H4-Rezeptoren im gesamten Magen-Darm-Trakt zu finden sind, während H3-Rezeptoren fehlen. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Histaminrezeptoren innerhalb der verschiedenen gastrointestinalen Abschnitte (Duodenum, Ileum, Kolon, Sigma und Rektum). Immunfärbungen von Neuronen und Nervenfasern zeigten, dass der H3-Rezeptor im menschlichen enteralen Nervensystem nicht nachweisbar ist. H1- und H2-Rezeptoren wurden in Ganglienzellen des Plexus myentericus, in der Muskularis und im Mukosaepithel gefunden (Sander et al. 2006).

Während in vielen Tiermodellen durch verschiedene Methoden H1-H3 und H4 Rezeptoren nachgewiesen wurden (Lui et al. 2000; Blandizzi et al. 2000; Frieling et al. 1993; Tamura et al. 1988) scheint der H3 Rezeptor beim menschlichen Darm zu fehlen. Wood hat die Abwesenheit des H3-Rezeptors im menschlichen Darm durch die drei gängigen Methoden (Immunhistochemie, Western Blot und Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) gezeigt (Wood 2006).

Damit stellt sich die Frage nach der Interpretation der hier vorgelegten Befunde, dass der Histamin H3-Blocker zwar bei Mäuse- und humanem Darm die Radikalproduktion spezifisch hemmen kann, aber der Rezeptor zumindest in humanen Gewebe wohl nicht vorhanden ist.

Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass Clobenpropit in einer Art „Kreuzreaktion“ auch an DAO binden und das Enzym hemmen kann, so dass die ROS-Bildung inhibiert wird. Diese Hypothese müsste durch weitere Versuche überprüft werden.



#### **5.4 Weitere Hemmstoffe der Histamin-induzierten Radikalproduktion**

Mit diesen Versuchen sollte letztlich bewiesen werden, dass das Enzym DAO sowohl bei der Maus als auch im humanen Darm verantwortlich für die Histamin-induzierte ROS Produktion ist.

Zunächst wurde der Hemmstoff Aminoguanidin eingesetzt, von dem bekannt ist, dass er DAO mit einer  $K_i=0,011\mu\text{M}$  sehr stark hemmt (Bieganski et al. 1983).

In unseren Versuchen haben wir nach Histaminstimulation AG in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und herausgefunden, dass bei einer Konzentration von  $0,1\mu\text{M}$  eine deutliche Hemmung der Radikalproduktion stattfindet. Durch das Einsetzen dieses DAO-Hemmstoffes konnten wir unsere These, dass DAO eine entscheidende Rolle für die Radikalproduktion spielt belegen.

Die Hemmung von DAO durch Aminoguanidin ist für die Resorption von Histamin, das in bestimmten Nahrungsmitteln in höherer Konzentration vorkommt, vom intestinalen Lumen in den Kreislauf bestimmend (Sessa et al. 1994).

Es konnte anhand von Untersuchungen am Dünndarm der Ratte gezeigt werden, dass das Darmepithel bei der Histaminverstoffwechslung eine Rolle spielt und durch Einsetzen von Aminoguanidin eine Hemmung der DAO erreicht werden kann (Nilsson et al. 1996).

Ein weiterer, entscheidender Nachweis, dass die Histamin-induzierte ROS Produktion durch das Enzym DAO erfolgt, gelang in der vorliegenden Arbeit durch die Hemmung mit spezifischen Antikörpern gegen DAO. Diese Hemmung war im Darmpräparaten sowohl von Mäusen als auch von Menschen zu beobachten, so dass man annehmen kann, dass der Radikalbildung in beiden Species derselbe Mechanismus zugrunde liegt. Derselbe Antikörper wurde auch zur immunhistochemischen Lokalisation der DAO im Mäusedünndarm verwendet (Gabriel 2014).

Insgesamt kann also festgestellt werden, dass durch die Verwertbarkeit sowohl von Histamin als auch Putrescin als Substrat, durch die Hemmung der Radikalproduktion durch den spezifischen Hemmstoff Aminoguanidin und die gegen DAO gerichteten Antikörper drei Argumente geliefert wurden, die für das Enzym DAO als die gesuchte Radikalquelle sprechen.

## **5.5 Mögliche Therapie der Histaminunverträglichkeit durch DAO**

Die vorgelegten Untersuchungen zeigen, dass durch die Zugabe von Histamin die Produktion von Sauerstoff Radikalen in der Darmwand gesteigert wird, und dass durch verschiedene Hemmstoffe wie z.B einen H3-Rezeptor-Antagonisten oder den DAO-Hemmstoff Aminoguanidin die Radikalproduktion gesenkt werden kann.

Allerdings war diese Steigung nur in speziellen Submucosa Präparaten nachweisbar, nicht in der vollständigen Darmwand. Wie in einer weiteren Dissertation von unserer Arbeitsgruppe zusätzlich gezeigt wird (Gabriel 2013), spricht dieser Befund für eine große antioxidative Kapazität der Darmmucosa, so dass unter physiologischen Bedingungen eine zusätzliche Radikalproduktion durch therapeutisch verabreichte DAO wahrscheinlich noch nicht zu oxidativem Stress führt. Ob dies allerdings für entzündliche Gewebe auch zutrifft, sollte durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

## 6 Zusammenfassung

Histamin spielt eine kausale Rolle bei Nahrungsmittelunverträglichkeiten und allergisch-entzündlichen Reaktionen. Eine Intoleranz gegenüber histaminhaltigen Nahrungsmitteln beruht vermutlich auf einem Mangel an intestinalem Enzym Diaminoxidase (DAO), das zu ungenügender Katabolisierung des Histamins führt.

Allerdings kann Histamin, wie kürzlich in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, auch oxidativen Stress in der Darmwand auslösen, einerseits in Mastzellen dadurch, dass sie durch Histamin zur ROS Produktion stimuliert werden können, andererseits dadurch, dass im Mäusedarm eine histaminabhängige Quelle für Sauerstoffradikale existiert.

In der vorgelegten Arbeit sollte diese Radikalquelle, die mittels der Luminolverstärkten Chemilumineszenzreaktion quantifizierbar ist, durch weitgehende Experimente an murinen und humanen Darmproben charakterisiert werden. Diese umfassten Untersuchungen zur Substratspezifität der radikalbildenden Reaktion und zur Hemmbarkeit mit pharmakologischen Wirkstoffen sowie mit spezifischen Antikörpern gegen DAO.

Es konnte gezeigt werden, dass Histamin und Putrescin etwa in der gleichen Dosis-Wirkungs-Relation als Substrate für diese Reaktion eingesetzt werden können. Bei den zur Hemmung eingesetzten Wirkstoffen waren Aminoguanidin, ein spezifischer DAO-Hemmer, und der H3-Antagonist Clobenpropit schon in Konzentrationen von 1 $\mu$ M, andere Antihistaminika erst in deutlich höheren Konzentrationen wirksam. Auch die eingesetzten Antikörper hemmten die Radikalproduktion effektiv.

Trotz des bemerkenswerten Effektes von Clobenpropit sprechen diese Befunde insgesamt dafür, dass die Histamin-stimulierbare Radikalquelle in der Aktivität der DAO begründet ist. Bezüglich des Antagonisten gegen H3-Rezeptoren kann gesagt werden, dass deren Funktion im Darm unklar ist, im menschlichen Dünndarm sind solche H3-Rezeptoren definitiv nicht nachweisbar, so dass die beobachtete Hemmung wohl eher auf eine unspezifische Nebenwirkung zurückzufinden ist.

Aufgrund dieser Befunde sollte in weiteren Studien untersucht werden, ob DAO im Darm neben protektiven auch schädigende Funktionen ausübt, die durch Induktion von oxidativem Stress hervorgerufen werden.

## Literaturverzeichnis

Augustin A. J.; " Was ist oxidativer Stress? Oxidative Tissue Damage" Klin Monbl Augenheilkd; 2010; 227(2): 90-98

Bieganski T, Kusche J, Feussner KD, Hesterberg R, Richter H, Lorenz W: Human intestinal diamine oxidase: substrate specificity and comparative inhibitor study. Agents Actions. 1980; 10:108-110

Bieganski T, Kusche J, Lorenz W, Hesterberg R, Stahlknecht CD, Feussner KD: Distribution and properties of human intestinal diamine oxidase and its relevance for the histamine catabolism. Biochim Biophys Acta 1983;756:196-203.

Blandizzi C, Tognetti M, Colucci R, Del Tacca M: Histamine H3 receptors mediate inhibition of noradrenaline release from intestinal sympathetic nerves; Br J Pharmacol 2000; 129:1387-1396

Boros M, Kaszaki J, Nagy S: Histamine release during intestinal ischemia-reperfusion: role of iron ions and hydrogen peroxide. Circ Shock. 1991;35(3):174-180

Brown D, Tomchick R, Axelrod J. The distribution and properties of a histamine-methylating enzyme; J. Biol. Chem. 1959, 234: 2948-2950

Coruzzi G, Morini G, Adami M, Grandi D. Role of histamine H3 receptors in the regulation of gastric functions. J. Physiol Pharmacol 2001; 52:539-553

Del Valle J, Gantz I. Novel insights into histamine H2 receptor biology. Am. J. Physiol 1997; 273:987-996

Emborg J, Laursen BG, Dalgaard P. Significant histamine formation in tuna at 2°C-effect of vacuum- und modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *Jnt J Food Microbiol.* 2005; 101: 263-279

Foreman JC, Rising TJ, Webber SE. A study of the histamine H<sub>2</sub>-receptor mediating relaxation of the parenchymal lung strip preparation of the guinea pig. *Br. J. Pharmacol* 1985; 86:465-473

Frieling T, Cooke HJ, Wood JD: Histamine receptors on submucosal neurons in guinea pig colon. *Am J Physiol* 1993; 264:74-80

Hakanson R, Bötcher G, Ekblad E, Panula P, Simonsson M, Dohlsten M, Hallberg T, Sunder F. Histamine in endocrine cells in the stomach: A survey of several species using a panel of histamine antibodies. *Histochemistry* 1986; 86:5-17

Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwarz JC, Shankley NP, Young YM, Schunack W, Levi R, Haas HL. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 1997; 49:253-278

Jarisch R, Götz M, Hemmer W, Missbichler A, Raithel M, Wantke F: Histamin-Intoleranz. *Histamin und Seekrankheit*. 2ed. Stuttgart. New York: Georg Thieme Verlag 2004

Jandaghi D: Oxidativer Stress und Mastzellen: Ansatzmöglichkeiten bei der Phytotherapie des Reizdarmsyndroms? 2011

Klocker J, Matzler SA, Huetz GN, Drasche A, Kolbitsch C, Schwelberger HG. Expression von Histaminabbauende Enzym in Schweine-Gewebe. *Inflamm Res* 2005; 54(Suppl): S54-57

Kusche J, Lorenz W, Schmidt J: Oxidative deamination of biogenic amines by intestinal amine oxidases: histamine is specifically inactivated by diamine oxidase. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1975; 356(10):1485-1486

Kufner MA, Ulrich P, Reithel M, Schwelberger HG. Determination von Histamin-Abbau-Kapazität in extrem kleinen Proben menschlichen Dickdarm. *Inflamm. Res* 2001; 50 (Suppl): S 96-97

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

Lüllmann H, Mohr K, Wehling M. *Pharmakologie und Toxikologie*; Stuttgart. New York Georg Thieme Verlag 2003

MacGlashan D: Histamine: A mediator of inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:53-59

Maintz L, Novak N. „Histamin und Histamin-Intoleranz“ *The American Journal of Clinical Nutrition* 2007: 1185-1196

Marino M, Maifreni M, Moret S, Roudinini G. The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheeses. *Lett Appl Microbiol.* 2000; 31:169-173

Merkel K, *Wirkungen von pflanzlichen Extrakten auf murines Ileum: Untersuchungen zum Reizdarmsyndrom an in vitro Modellen*, Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen 2010

Morse KL, Behan J, Laz TM, West RE, Greenfeder SA, Anthes JC, Umland S, Wan Y, Hipkiu RW, Gonsiorek W, Schin N, Gustafson EL, Qiao X, Wang S, Hedrick JA, Greene J, Bayne M, Monsma FJ. Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2001; 296:1058-1066

Nilsson BO, Kockum I, Rosengren E. Inhibition of diamine oxidase promotes uptake of putrescine from rat small intestine. *Inflamm Res.* 1996; 45:513-518



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

O'Donnell MC, Ackerman SJ, Gleich GJ, Thomas LL. Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. *J Exp Med*.1983; 157:1981-1991.

Panula P, Yang H-YT, Costa E. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:2572-2576

Riley JF, West GB. The presluce of histamine in tissue mast cells. *J Physiol*. 1953; 120:528-537

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

Sattler J, Hafner D, Klotter HJ, Lorenz W, Wagner PK: Food-inuced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase. *Agents and Actions* 1988;23:361-365

Sattler J, Lorenz W, Kubo K, Schmal A, Sauer S, Lüben L: Food induced histaminosis under diamine oxidase blockade in pigs: further evidence of key role of elevated plasma histamine levels as demonstrated by successful prophylaxis with antihistamines. *Agents and Actions*, 1989; 27: 212-214

Schmidt WU, Sattler J, Hesterberg R, Röher HD, Zoedler T, Sitter H, Lorenz W: Human intestinal diamine oxidase (DAO) activity in Crohn's disease: a new marker for disease assessment? *Agents and Actions* 1990; 30(1-2):267-270

Schwelberger HG. Diamins oxidase (DAO) enzyme and gene. In Falus A (ed). Histamine: Biology und Medical Aspects. Spring Med Publisching, Budapest, 2004: 43-52

Sessa A, Desiderio MA, Perin A: Diamin oxidase in relation to diamine and polyamine metabolism; Agents and Actions 1994; 43:69-77

Siems W, Krämer K, Grune T. 2005, Oxidativer Stress und Pharmaka. Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn.

Simons FE. Advances in H1-antihistamines. N. Engl.J.Med. 2004;351:2203-2217

Schwörer H, Reimann A, Ramadori G, Racke K. Characterization of histamine H3 receptors inhibiting 5-HT release from porcine enterochromaffin cells: further evidence for H3 receptor heterogeneity. Pharmacol. 1994; 350: 375-379

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

Taskila K, Saarinen JV, Harvima JT, Harvima RJ. Histamine and LTC4 in stinging nettleinduced urticaria. Allergy. 2000; 55:680-681

Venza J, Visalli M, Ceci G, Teti D. Quantitative determination of histamine in tears during conjunctivitis by a novel HPLC method. Ophthalmic Res. 2004; 36:62-69

Wantke F, Proud D, Siekiersky E, Kagey-Sobotka A: Daily variations of serum diamine oxidase and the influence of H1 and H2 blockers: a critical approach to routine diamine oxidase assessment. Inflamm Res 1998;47:396-400

Watanabe T, Taguchi Y, Schiosaka S, Tanaka J, Kubota H, Terano Y, Tohyama M, Wada H. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res* 1984; 295:13-25

Weidenhiller M, Layritz C, Hagel A F, Kuefner M, Zopf Y, Reithel M: Histaminintoleranz-Syndrom (HIS): Vielfalt der Mechanismen von physiologischer pathophysiologischer und toxischer Wirkung und deren Unterscheidung; *Z Gastroenterol* 2012; 50(12):1302-1309

Wood JD: Histamine, mast cells, and the enteric nervous system in the irritable bowel syndrome, enteritis, and food allergies. *Gut*. 2006; 55(4):445-447

Zhu Y, Michalovich D, Wu H, Tan KB, Dytko GM, Mannan IJ, Boyce R, Alston J, Tierney LA, Li X, Herrity NC, Vawter L, Saran HM, Ames RS, Davenport CM, Hieble JP, Wilson S, Bergsma DJ, Fitzgerald LR. Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol. Pharmacol* 2001; 59:434-441

Zopf Y, Baenkler HW, Silbermann A, Hahn E, Raithel M: Differentialdiagnose von Nahrungsmittelunverträglichkeit. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106(21):359-370

