

# **Interaktion von Amitriptylin und Histamin am Herz von Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor transgenen Mäusen**

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

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

von Maximilian Benedikt Binter  
geboren am 07.09.1993 in Augsburg  
Betreuer: Prof. Dr. med. Joachim Neumann

Gutachter:  
Prof. R. Seifert (Hannover)  
Prof. S. Dhein (Leipzig)

08.02.2022

26.10.2022

## Referat

Das Monoamin Histamin entfaltet seine Wirkung im menschlichen Körper über vier Rezeptoren: die Histamin-Rezeptoren-H<sub>1-4</sub>. Es nimmt insbesondere über den Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor auch Einfluss auf kontraktile Parameter am Myokard. Das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin bindet neben seiner intendierten Wirkung als Serotonin- und Noradrenalin- Wiederaufnahmememmer auch an mehrere Rezeptoren, unter anderem den Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor. Diese Arbeit untersuchte zum einen nun die Auswirkung dieser agonistischen Bindung von Histamin auf die Schlagfrequenz und Kontraktionskraft von spontan schlagenden rechten und elektrisch stimulierten linken isolierten Vorhofpräparationen von Wildtyp- und transgenen Mäusen, die den menschlichen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor in Herzmuskelzellen überexprimieren (H<sub>2</sub>-TG). Es wurden an diesen Vorhofpräparaten Konzentrationswirkungskurven von Histamin in Abwesenheit oder Anwesenheit verschiedener Amitriptylin-Konzentrationen erhoben. Es zeigte sich anhand der EC<sub>50</sub>-Werte (also der halbmaximal wirksamen Histamin-Konzentrationen) eine konzentrationsabhängige Verschiebung der Kurven für Histamin an diesen Vorhöfen durch Amitriptylin zu höheren Konzentrationen von Histamin. Unter 10 µM Amitriptylin zeigten isolierte elektrisch gereizte Präparate aus dem rechten Vorhof von Patienten der Herzchirurgie, die im Rahmen der Anlage der extrakardialen Zirkulation gewonnen wurden, ebenfalls eine Verschiebung des positiv inotropen Effekts von Histamin zu höheren Konzentrationen von Histamin. Zusammenfassend zeigte sich, wieweit Amitriptylin ein kompetitiver Antagonist am kardialen humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor ist und dadurch konzentrationsabhängig die kontraktile Parameter beeinflusst, welche durch Stimulation dieses H<sub>2</sub>-Histamin Rezeptors erhöht wurden. Eine Analyse des Phosphorylierungszustandes von Phospholamban mittels Western Blot zeigte bei den transgenen Tieren eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung an Serin 16 nach Histamin-Gabe, welche durch 10 µM Amitriptylin antagonisiert wurde. Plasmakonzentrationen von Amitriptylin bei suizidaler Überdosierung bewegen sich im Rahmen der hier untersuchten Konzentrationen, wodurch die Ergebnisse dieser Arbeit zumindest eine klinisch-toxikologische Relevanz aufweisen könnten.

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Historischer Hintergrund.....	1
1.2	Überblick über die Histaminrezeptoren .....	2
1.3	Kardiale Histaminrezeptoren .....	3
1.4	Signalweg des Histamin-H <sub>2</sub> -Rezeptors .....	4
1.5	Amitriptylin im Allgemeinen .....	5
1.6	Amitriptylin und der Histamin-H <sub>2</sub> -Rezeptor .....	8
2.	Zielstellung .....	10
3.	Material und Methodik .....	11
3.1	Tierhaltung .....	11
3.2	Generierung der transgenen Mäuse .....	11
3.3	Genotypisierung .....	12
3.4	Kontraktionsversuche .....	13
3.4.1	Vorbereitung von Organbad und Messanlage .....	13
3.4.2	Organentnahme .....	14
3.4.3	Präparation der Vorhöfe .....	15
3.4.4	Versuche zu Histamin und Amitriptylin an der Maus.....	15
3.4.5	Versuche an humanen Proben .....	16
3.5	Western Blot .....	16
3.6	Lösungen und Puffer .....	18
3.7	Verwendete Geräte.....	20
3.8	Statistische Auswertung.....	21
4.	Ergebnisse .....	22
4.1	Kontraktionsversuche mit 1 µM Amitriptylin.....	22
4.1.1	Kraftentwicklung .....	22
4.1.2	Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit .....	23
4.1.3	Anspannungs- und Erschlaffungszeit .....	25
4.1.4	Herzfrequenz .....	26
4.2	Kontraktionsversuche mit 3 µM Amitriptylin.....	28
4.2.1	Kraftentwicklung .....	28
4.2.2	Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit .....	29
4.2.3	Anspannungs- und Erschlaffungszeit .....	32
4.2.4	Herzfrequenz .....	33

4.3	Kontraktionsversuche mit 10 $\mu$ M Amitriptylin.....	34
4.3.1	Kraftentwicklung .....	34
4.3.2	Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit .....	35
4.3.3	Anspannungs- und Erschlaffungszeit .....	37
4.3.4	Herzfrequenz .....	39
4.4	Kraftentwicklung an menschlichen Präparaten .....	40
4.5	Phospholamban-Phosphorylierung.....	42
5.	Diskussion .....	43
5.1	Diskussion der Methoden .....	43
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	44
5.2.1	Rechte Vorhöfe.....	44
5.2.2	Linke Vorhöfe .....	44
5.2.3	Menschliche Präparate.....	45
5.2.4	Western Blot-Ergebnisse .....	46
5.3	Fazit .....	46
5.4	Klinische Bedeutung und Ausblick .....	47
6.	Zusammenfassung.....	49
7.	Literaturverzeichnis.....	51
8.	Thesen .....	59
9.	Erklärungen .....	VI
9.1	Selbständigkeitserklärung .....	VI
9.2	Erklärung über frühere Promotionsversuche .....	VI
10.	Danksagung .....	VII

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylzyklase
ANOVA	analysis of variance = Varianzanalyse
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ionen
cAMP	Adenosin-3',5'-Monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CSQ	Calsequestrin
Ctr.	Kontrolle
DAO	Diaminoxidase
dH <sub>2</sub> O	demineralisiertes H <sub>2</sub> O
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
f.c.	final concentration
g	Gramm
G <sub>s</sub>	stimulierendes Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HDC	Histidin-Decarboxylase
HNMT	Histamin-N-Methyltransferase
Hz	Hertz
I1	Inhibitor 1 der Proteinphosphatase 1
IE	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
KWK	Konzentrationswirkungskurve
l	Liter
log	Logarithmus
M	Molar
mA	Milliampère
mg	Milligramm

µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
µM	Mikromolar
mN	Millinewton
mN/s	Millinewton pro Sekunde
ms	Millisekunde
n	Stichprobengröße
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
PCE	Positiv chronotroper Effekt
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PP1	Protein-Phosphatase 1
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels
Ser 16	Serin 16 von Phospholamban
SERCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan -Acetat-EDTA-Mischung
H <sub>2</sub> -TG	Transgene Mäusen mit nur kardialer Überexpression des Histamin-H <sub>2</sub> - Rezeptors des Menschen
Tris-HCL	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
V	Volt
WT	Wildtyp-Mäuse
ZNS	zentrales Nervensystem
5-HT	Serotonin; 5-Hydroxytryptamin

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Histamin-H <sub>2</sub> -Rezeptor Pathway .....	5
Abbildung 2: Strukturformeln von Amitriptylin und Nortriptylin .....	6
Abbildung 3: Expressionskassette des Histamin-H <sub>2</sub> -Rezeptors.....	11
Abbildung 4: Versuchsaufbau .....	14
Abbildung 5: Kraftentwicklung unter 1 $\mu$ M Amitriptylin .....	23
Abbildung 6: Kraftanstiegsgeschwindigkeit unter 1 $\mu$ M Amitriptylin.....	24
Abbildung 7: Herzfrequenz unter 1 $\mu$ M Amitriptylin .....	27
Abbildung 8: Kraftentwicklung $\Delta F$ unter 3 $\mu$ M Amitriptylin .....	29
Abbildung 9: Kraftanstiegsgeschwindigkeit unter 3 $\mu$ M Amitriptylin.....	30
Abbildung 10: Kraftabfallsgeschwindigkeit unter 3 $\mu$ M Amitriptylin .....	31
Abbildung 11: Kraftentwicklung $\Delta F$ unter 10 $\mu$ M Amitriptylin .....	35
Abbildung 12: Kraftanstiegsgeschwindigkeit unter 10 $\mu$ M Amitriptylin.....	36
Abbildung 13: Kraftabfallsgeschwindigkeit unter 10 $\mu$ M Amitriptylin .....	37
Abbildung 14: Anspannungszeit unter 10 $\mu$ M Amitriptylin .....	38
Abbildung 15: Kraftentwicklung menschlicher Präparate .....	41
Abbildung 16: Western-Blot .....	42
Abbildung 17: Quotient PLB Ser16/CSQ .....	42
Tabelle 1: PCR-Protokoll.....	12
Tabelle 2: Kontraktile Parameter unter 1 $\mu$ M Amitriptylin .....	28
Tabelle 3: Kontraktile Parameter unter 3 $\mu$ M Amitriptylin .....	33f
Tabelle 4: Kontraktile Parameter unter 10 $\mu$ M Amitriptylin .....	39f

# 1 Einleitung

## 1.1 Historischer Hintergrund

Histamin wurde erstmalig im Jahr 1907 synthetisch erzeugt und daraufhin beschrieben. Es wurde anfangs noch mit seinem chemisch korrekten Namen 2-(1H-Imidazol-4-yl)-Äthanamin bezeichnet (Windhaus und Voigt 1907). Daß es sich bei Histamin um ein natürlich vorkommendes Monoamin handelt, wurde erstmals in Freiburg von Ackermann gezeigt, welcher die Synthese von Histamin aus Histidin durch Bakterien beschrieben (Ackermann 1910). Eine Forschungsgruppe der Wellcome Research Laboratories um Sir Henry Dale konnte Histamin aus Mutterkornpilzen (*Claviceps purpurea*) gewinnen und auch erstmals die positiv inotrope und positiv chronotrope Wirkung von Histamin an Kaninchenherzen nachweisen (Dale und Laidlaw 1910). Dabei waren die kardiovaskulären Effekte von Histamin je nach Spezies und anatomischer Region verschieden. Beispielsweise führt Histamin in den Koronararterien von Kaninchen zu einer Vasokonstriktion. In Versuchen an Katzen, Hunden und Meerschweinchen konnte dagegen eine Vasodilatation der Aorta in Form einer Hypotension gemessen werden (Dale und Laidlaw 1911).

Histamin kann über verschiedene Wege in den menschlichen Körper gelangen. Zum einen wird es über Nahrungsmittel mit hohem Histamin-Gehalt aufgenommen. Dazu zählen beispielsweise Fleisch, fermentiertes Gemüse, Sojaprodukte und alkoholische Getränke (Bodmer et al. 1999, Schirone et al. 2017). Aber auch verschiedene Fischarten können einen hohen Gehalt an Histamin aufweisen. So hoch sogar, daß regelmäßig über Histamin Vergiftungen nach dem Verzehr von Thunfisch, Makrele, Bonito und Speerfisch berichtet wird (Toda et al. 2009, Feng et al. 2016). Diese Vergiftungen ähneln teilweise den Symptomen einer allergischen Reaktion und Patienten weisen Atembeschwerden, Juckreiz, Brechreiz, Fieber und Bluthochdruck auf (Naila et al. 2010). Andererseits wird Histamin im Körper selbst aus der Aminosäure Histidin durch das Enzym Histidin-Decarboxylase (HDC) synthetisiert (Badger-Emeka et al. 2020). Dies geschieht in Mastzellen, basophilen Granulozyten, histaminergen Neuronen und enterochromaffinen Zellen, in welchen Histamin dann intrazellulär in Vesikeln gespeichert und nach Stimulation freigesetzt wird (Thangam et al. 2018).

Der Abbau von Histamin geschieht im Körper, je nach Lokalisation, über zwei verschiedene Wege: zum einen durch Oxidation mittels der Diaminoxidase (DAO, ehemals Histaminase) und zum anderen über Ringmethylierung durch die Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) (Kuefner et al. 2014). Die DAO wird in Membran-assoziierten Vesikeln von epithelialen Zellen gespeichert und daraus nach Stimulation in den Kreislauf sekretiert (Schwelberger et al. 2017).

Es wird vermutet, daß dieses Protein somit für den Abbau von extrazellulärem Histamin verantwortlich ist, beispielsweise nach übermäßiger Aufnahme mit der Nahrung (Gludovacz et al. 2018). Die HNMT wiederum befindet sich im Zytosol und baut somit nur intrazelluläres Histamin ab (Yoshikawa et al. 2019). HNMT zeigt auch eine etwas höhere Affinität zu Histamin als DAO, wobei die beiden Enzyme aufgrund ihrer Verteilung vermutlich nicht um das Substrat konkurrieren (Comas-Basté et al. 2020). Die Verteilung dieser beiden Enzyme im Körper überlappt sich auch teilweise. Die höchste Konzentration von DAO findet sich im Dünndarm, dem Colon ascendens, den Nieren und der Plazenta (Maintz und Novak 2007, Comas-Basté et al. 2020) wohingegen HNMT in vielen verschiedenen Geweben exprimiert wird. Die größten Konzentrationen finden sich in Leber und Nieren, gefolgt von Milz, Colon, Prostata, Ovarien und dem Rückenmark (Kovacova-Hanusikova et al. 2015). HNMT wird als entscheidend für den Histamin Abbau im Bronchialtrakt angesehen und findet sich auch im Epithel der Trachea und der Bronchien (Tongsook et al. 2017).

## 1.2 Überblick über die Histaminrezeptoren

Seine Wirkung übt Histamin nach aktuellem Kenntnisstand über vier Rezeptoren aus: die Histamin-Rezeptoren-H<sub>1-4</sub> (Jutel et al., 2009). Heinz Schild stellte 1947 den pA<sub>2</sub> Wert als neue Methode zur Beschreibung von antagonistischen pharmakologischen Effekten vor (Schild 1947). Gleichzeitig zeigte er, daß Mepyramin bei der Antagonisierung des positiv chronotropen Effekts von Histamin am Herzen von Meerschweinchen einen anderen pA<sub>2</sub> Wert aufweist als bei den Kontraktionen im isolierten Ileum der Tiere, was erste Hinweise auf die Existenz mehrerer Histaminrezeptoren gab (Übersicht: Parsons und Ganellin 2006). Folkow et al. formulierten 1948 erstmals die Theorie aus, wonach es mehr als einen Histaminrezeptor geben müsse. Sie zeigten an narkotisierten Katzen, daß nur niedrige Dosen Histamins von Diphenhydramin antagonisiert werden konnten, jedoch hohe Dosen von Histamin weiterhin eine Vasodilatation bewirkten. Somit schien es mindestens zwei Arten von Histaminrezeptoren zu geben, von denen nur einer durch Benadryl blockiert wurde (Parsons und Ganellin 2006). Der Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptor wurde als solcher erstmals 1966 von Ash und Schild in Versuchen an dem Ileum von Meerschweinchen und dem Uterus von Ratten beschrieben (Ash und Schild 1966). Der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor und seine Wirkung wurden durch Einsatz des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor Antagonisten Cimetidin entdeckt und 1972 durch Black et al. erstmalig beschrieben (Black et al. 1972). Die Entdeckung des Histamin-H<sub>3</sub>-Rezeptors folgte im Jahr 1987 durch Schwartz et al. als sie feststellten, daß Histamin über diesen präsynaptischen Rezeptor im

zentralen Nervensystem (ZNS) seine eigene Synthese und Freisetzung inhibiert (Schwartz 2011). Der Histamin-H<sub>4</sub>-Rezeptor wurde erst durch die Analyse des menschlichen Genoms von mehreren Arbeitsgruppen parallel im Jahr 2000 entdeckt und auch erstmalig beschrieben. Er wird von verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert und ist beteiligt an der Chemotaxis und auch der Kontrolle der IL-16 Freisetzung (Parson, 2006).

### 1.3 Kardiale Histaminrezeptoren

Es finden sich in Bezug auf die kardiale Verteilung der Histaminrezeptoren speziesabhängige Unterschiede. Bei Kaninchen finden sich beispielsweise im Ventrikel deutlich mehr Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptoren als im Vorhof, jedoch wird der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor überwiegend im Atrium und weniger im Ventrikel exprimiert. Diese Verteilung dreht sich nun bei Meerschweinchen aber um. Bei diesen Tieren wird der Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptor stärker im rechten Vorhof und der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor überwiegend im Ventrikel exprimiert. Bei der Ratte sind Vorhöfe und Ventrikeln sehr ähnlich bezüglich der Expression von Histamin-H<sub>1</sub> und H<sub>2</sub>-Rezeptoren. An menschlichen Präparaten findet sich eine deutlich schwächere Expression der Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptoren als bei anderen Spezies und es finden sich deutlich mehr Histamin-H<sub>2</sub> als H<sub>1</sub>-Rezeptoren. Auch bestehen wieder unterschiedliche Rezeptordichten je nach Lokalisation: Die Dichte an Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptoren ist beim Menschen im Ventrikel höher als im Vorhof, während es sich bei den Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren umgekehrt verhält mit einer höheren Dichte von Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren im Vorhof als im Ventrikel (Matsuda et al. 2004).

Auch die Wirkung der Histaminrezeptoren ist abhängig von ihrer regionalen Verteilung. Im linken Vorhof des adulten Meerschweinchens wird der Histamin-vermittelte positiv inotrope Effekt über Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptoren vermittelt und geht mit einem Anstieg an Inositoltrisphosphat einher, wohingegen im Ventrikel des Meerschweinchens überwiegend Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren und ein intrazellulärer Anstieg an cAMP beobachtet werden. Im rechten Vorhof des Meerschweinchens wird der positiv chronotrope Effekt von Histamin ebenfalls über Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelt (Steinburg und Holland 1975, Hescheler et al. 1987, Hattori et al. 1994, Agata et al. 2010). Interessanterweise ist der Wirkmechanismus auch altersabhängig. Im neonatalen Meerschweinchensherzen wird der positiv inotrope Effekt am linken Vorhof durch Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelt (Agata et al. 2010). Bei Kaninchen wiederum wird der positiv inotrope Effekt im linken Vorhof über den Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt und im Ventrikel vor allem über Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptoren (Hattori et al. 1988, 1990, 1994).

Bei humanen Vorhofpräparaten wurde ein negativ inotroper Effekt beschrieben, welcher über den Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt wurde. Der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor jedoch vermittelt an kardialen humanen Proben einen positiv inotropen Effekt. Histamin-H<sub>3</sub> und H<sub>4</sub>-Rezeptoren finden sich beim Menschen sowie auch bei Mäusen nur auf kardialen Neuronen und wirken vermutlich kardioprotektiv, indem sie nach Stimulation die Freisetzung von Noradrenalin hemmen. Bei Herzen von Mäusen sind zwar alle Histaminrezeptoren auf RNA und/oder auf Proteinebene beschrieben worden, jedoch gibt es bei diesen Tieren keinen über Histaminrezeptoren vermittelten positiv inotropen oder chronotropen Effekt (Gergs et al. 2019a).

#### 1.4 Signalweg des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors

Bei dem Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Nach Bindung des Histamins kommt es durch Vermittlung über ein stimulierendes G-Protein (G<sub>s</sub>) zur Aktivierung der Adenylatzyklase (AC). Durch den konsekutiv erhöhten Gehalt an intrazellulärem 3',5'-zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) wird die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) gesteigert, welche multiple Proteine in der Zelle phosphoryliert. Zu diesen Zielproteinen gehört auch das Phospholamban (PLB). Phospholamban bindet im nicht phosphorylierten Zustand an die Ca<sup>2+</sup>-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) und hemmt deren Aktivität. Durch die Phosphorylierung wird das PLB nicht mehr an die SERCA gebunden, wodurch die Hemmwirkung aufgehoben wird und sich der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in das sarkoplasmatische Retikulum erhöht. Dort wird Ca<sup>2+</sup> überwiegend an Calsequestrin (CSQ) gebunden (Gergs et al. 2019a). Die physiologische Aufhebung dieser Signalkaskade ist ein vielschichtiger Prozess und noch nicht vollends verstanden. Eine wichtige Rolle dabei spielen wohl Serin-Threonin-Phosphatasen, insbesondere die Proteinphosphatase 1 (PP1) (Herzig und Neumann 2000, Heijman et al. 2013). Der Inhibitor 1 (I1) wird im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus durch die PKA phosphoryliert. Unphosphoryliert sorgt der I1 für eine Hemmung der PP1 (Bertolotti 2018). Durch den Wegfall dieser Hemmung führt die Aktivierung von PP1 nun zu einer Dephosphorylierung des PLB und der damit verbundenen Bindung an die SERCA und deren Hemmung (Haghighi et al. 2014, Abb. 1). Jedoch spielen noch weitere Proteine, wie die Proteinphosphatasen 2A, 2B, 2C, 5 und 6 eine Rolle (Gergs et al. 2019a, Gergs et al. 2019b).

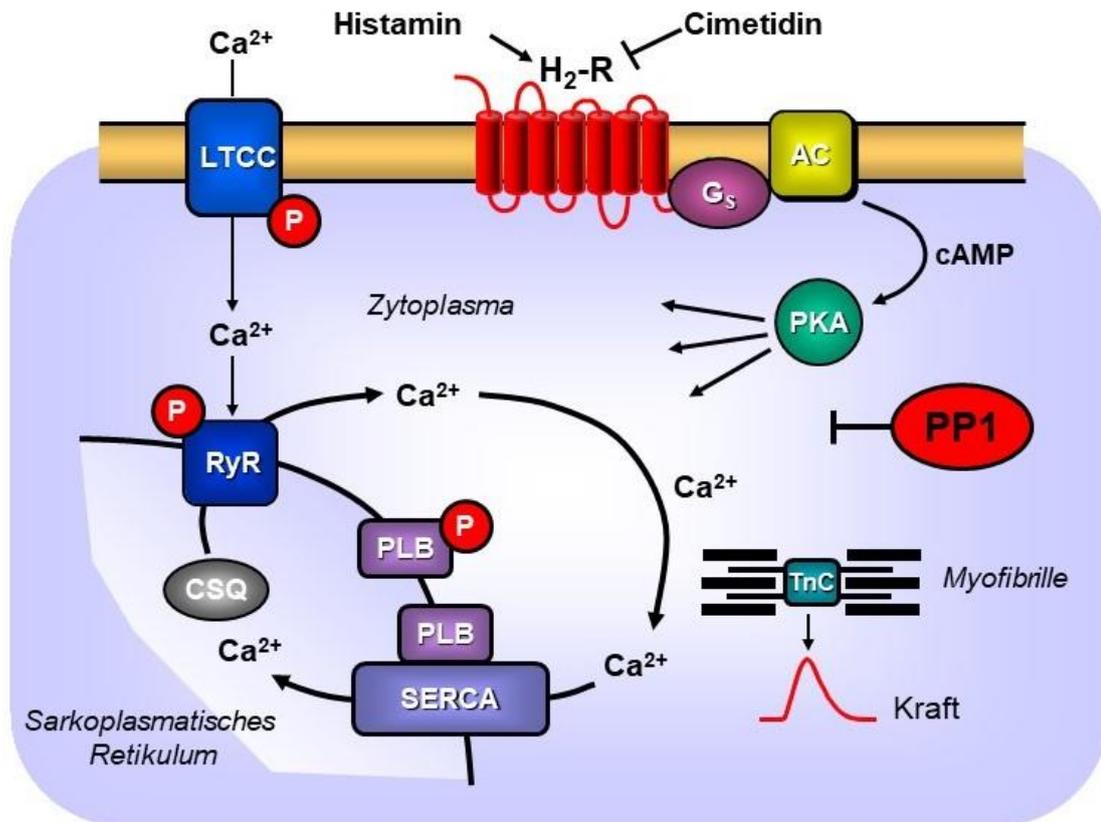


Abb. 1 Vereinfachte schematische Darstellung des intrazellulären Signalweges des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors. AC: Adenylylzyklase; H<sub>2</sub>-R: Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor; CSQ: Calsequestrin; G<sub>s</sub>: Stimulierendes G-Protein; LTCC: L-Typ Calciumkanal; P: Phosphorylierung; PKA: Proteinkinase A; PLB: Phospholamban; PP1 Proteinphosphatase 1; RyR: Ryanodinrezeptor; SERCA: Ca<sup>2+</sup>-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums; TnC: Troponin C.

### 1.5 Amitriptylin im Allgemeinen

Bei Amitriptylin handelt es sich um ein Pharmakon aus der Gruppe der trizyklischen Antidepressiva und es wird primär in der medikamentösen Therapie von Depressionen verwendet (Melin et al. 2021). Der Effekt über den Amitriptylin seine antidepressive Wirkung entfaltet ist noch nicht abschließend verstanden. Die Hauptwirkung wird nach aktuellem Wissen über die Blockade von neuronalen Serotonin- (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) und teilweise auch Noradrenalin-Transportern vermittelt, wodurch es zu einer Wiederaufnahmehemmung der entsprechenden Neurotransmitter im synaptischen Spalt kommt (McClure und Daniels 2021). Die Inzidenz und auch die Intensität von Nebenwirkungen ist bei Amitriptylin und sämtlichen trizyklischen Antidepressiva im Vergleich zu selektiven Serotoninwiederaufnahme-Hemmern höher, weshalb trizyklische Antidepressiva wie Amitriptylin als führende Antidepressiva abgelöst wurden (McClure und Daniels 2021). Jedoch besteht noch eine intensive Diskussion bezüglich der Frage, ob Serotoninwiederaufnahme-

Hemmer den trizyklischen Antidepressiva in der Wirksamkeit überlegen sind (Richelson 2001, Barbui und Hotopf 2001). Weiterhin ist Amitriptylin ein funktioneller Inhibitor der sauren Sphingomyelinase, worin ein weiterer Wirkmechanismus bestehen könnte (Živanović et al. 2019). Neuere Studien zeigen einen Hinweis auf den Zusammenhang einer Enzymüberaktivität der Sphingomyelinase mit einer schweren Depression (Kornhuber et al. 2011). Darüber hinaus kann Amitriptylin antagonistische Effekte auch an weiteren Rezeptoren bedingen: Dazu gehören der Histamin-H<sub>1</sub> und Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor, viele weitere G-Protein gekoppelte Rezeptoren, wie  $\alpha$ -Adrenozeptoren oder  $\beta$ -Adrenozeptoren und muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren (Matthaei et al. 2021). Diese antagonistische Wirkung an neuronalen Muskarinrezeptoren üben viele Antidepressiva aus, jedoch ist Amitriptylin von allen der potenteste (Uno et al. 2017). Weiterhin zeigt Amitriptylin antagonistische Effekte an Natrium-, Kalium- und Kalzium-Kanälen (Stanton et al. 1993, Owens et al. 1993, Nicholson et al. 2002, Punke und Friedrich 2007, McClure und Daniels 2021).

Neben seiner bekannten antidepressiven Wirkung wird Amitriptylin auch für andere Indikationen verwendet. Dazu zählen Migräne und anderweitige Kopfschmerzen, neuropathische Schmerzen, chronische Schmerzen des unteren Rückens, Fibromyalgie oder chronisch disseminierter Schmerz, Reizdarmsyndrom, zyklisches Erbrechenssyndrom, interstitielle Zystitis, Nykturie, chronic pelvic pain syndrome (CPPS) und Insomnie. Unter bestimmten Umständen wird Amitriptylin zudem als Sedativum eingesetzt (Schneider et al. 2019).

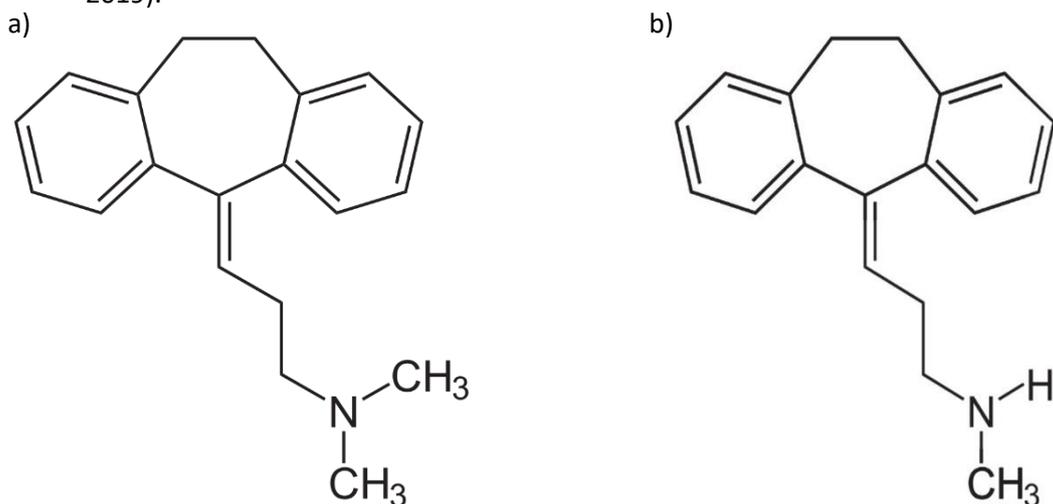


Abb. 2  
Strukturformeln von Amitriptylin (a) und Nortriptylin (b)

Nach oraler Einnahme wird Amitriptylin (Abb. 2a) über die Darmschleimhaut aufgenommen und erreicht die höchste Plasmakonzentration nach 2 bis 6 Stunden (Rudorfer und Potter

1999). Die Halbwertszeit von Amitriptylin variiert stark in der Literatur mit Werten zwischen 12 und 41 Stunden, wobei ein Mittelwert von 24 Stunden angegeben wird (Kondratenko et al. 2019, Zhai et al. 2020). Aufgrund seiner hohen Lipophilie bindet es mit bis zu 95% stark an Plasmaproteine und zeigt ein großes Verteilungsvolumen (McClure und Daniels 2021). Nach der Absorption unterliegt es in der Leber einem ausgeprägtem First-Pass Effekt, wodurch die Bioverfügbarkeit von ungefähr 50% zu erklären ist (Rudorfer und Potter 1999). In der Leber erfolgen multiple Biotransformationen überwiegend über das Cytochrom P450 2D6, jedoch auch über CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 und CYP3A5 (Samer et al. 2013). Durch N-Demethylierung entsteht das sekundäre Amin und der aktive Metabolit Nortriptylin (Abb. 2b), welches ebenfalls eine antidepressive Wirkung besitzt (Hicks et al. 2017). Bei seinem Wirkmechanismus überwiegt die Wiederaufnahmehemmung des Noradrenalins im Vergleich zur Wiederaufnahmehemmung von Serotonin und es verhält sich somit in diesem Bezug umgekehrt zu Amitriptylin (Sanchez und Hyttel 1997).

Anschließend werden sowohl Amitriptylin als auch Nortriptylin hydroxyliert (McClure und Daniels 2021). Beide dieser 10-Hydroxy-Metaboliten existieren in zwei chiralen Isomeren, einer E (trans) und Z (cis) Version und daher existieren auch zwei Enantiomere: (+) und (-) (Di Pietro et al. 2020). Während der Therapie mit Amitriptylin oder Nortriptylin ist die Konzentration von E-10-OH-Nortriptylin im Plasma und Liquor cerebrospinalis höher als die von Amitriptylin, Nortriptylin, E-10-OH-Amitriptylin, Z-10-OH-Amitriptylin oder Z-10-OH-Nortriptylin (Rudorfer und Potter 1999). Die hydroxylierten Metabolite werden nun durch Glucuronidierung wasserlöslicher und können renal eliminiert werden, jedoch wird auch ein Teil in unkonjugierter Form ausgeschieden und im Urin lassen sich auch Spuren von nicht metabolisiertem Amitriptylin nachweisen (McClure und Daniels 2021). Die glucuronidierten Metabolite sind jedoch nicht mehr in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und werden als inaktiv betrachtet (Rudorfer und Potter 1999). Die hepatische Elimination von Amitriptylin wird zwischen 17 und 61.5 l/h angegeben und die renale Elimination liegt im Bereich zwischen 18.8 und 30.6 l/h (Koh et al. 2019).

Aufgrund seiner Toxizität und seines ausgeprägten Nebenwirkungsprofils wurde Amitriptylin von seiner alten Rolle als Antidepressivum der ersten Wahl abgelöst (Richelson 2001, Bruch 2019). Diese unerwünschten Effekte sind vielfältig. Zu den kardiovaskulären Symptomen zählen orthostatische Hypotension, Tachykardie, Synkopen, AV-Blöcke, QT-Streckenverlängerung und infolgedessen Arrhythmien (Teschemacher et al. 1999, Wu et al. 2020). In Fällen von Überdosierungen wurden auch ST-Streckenhebungen vom Brugada-Typ beobachtet (Brahmi et al. 2007). Durch die anticholinerge Wirkung kommt es unter der Therapie zu

Nebenwirkungen wie einem trockenen Mund, Verstopfungen, Sehbeschwerden, Harnverhalt, akuten Glaukomanfällen und Gedächtnisproblemen. Weiterhin wurden unter anderem von einem erhöhten Risiko für Frakturen, sexueller Dysfunktion, einer Zunahme von Angststörungen und Tremor berichtet (Richelson 2001, Wu et al. 2020).

Amitriptylin erhält auch eine toxikologische Relevanz dadurch, daß dieses Medikament in suizidaler Absicht öfters überdosiert eingenommen wird (Koski et al. 2005). Der direkte toxische Effekt wird vor allem durch die zentrale Wiederaufnahmehemmung des Noradrenalins, die Blockade von  $\alpha$ -Adrenozeptoren, die kardiale membranstabilisierende Eigenschaft und anticholinerge Wirkung erreicht. Die Studienlage bezüglich Plasmakonzentrationen von Amitriptylin in Fällen von Suiziden ist sehr gering, vor allem da oft aktive Metabolite nicht mituntersucht wurden (Kerr et al. 2001). Bei Studien, welche Fälle von teils letalen Intoxikationen mit Amitriptylin untersuchten, befand sich der Median der Plasmakonzentration zwischen 3,2 und 4,3 mg / l (King 1982, Stead und Moffat 1983, Druid und Holmgren 1997, Koski et al. 2005).

#### 1.6 Amitriptylin und der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor

Eine Studie an homogenisierten Kortex- und Hippocampus-Proben von Meerschweinchen zeigte eine antagonistische Wirkung von Amitriptylin am Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor. Die Aktivität der Adenylatzyklase wurde nach der Zugabe von Histamin beziehungsweise dem für den Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor spezifischeren Agonisten Dimaprit gemessen. Dabei wurde die Histamin-stimulierte Aktivität der Adenylatzyklase konzentrationsabhängig durch Amitriptylin gehemmt mit einem pA<sub>2</sub>-Wert von 7,23 (SEM: 0,27) für Histamin und 7,47 (SEM: 0,55) für Dimaprit (Green und Maayani 1977). Eine andere Studie führte an linken und rechten Vorhofpräparaten von Meerschweinchen Konzentrationswirkungskurven (KWK) von Histamin unter zwei verschiedenen Konzentrationen von Amitriptylin, nämlich 10  $\mu$ M und 32  $\mu$ M, durch. Hier konnte Amitriptylin interessanterweise die Frequenz der spontan schlagenden rechten Vorhöfe nicht reduzieren. Jedoch bewirkte Amitriptylin eine konzentrationsabhängige negativ inotrope Wirkung auf die präparierten Papillarmuskeln mit einem pA<sub>2</sub>-Wert von 6,01 (SEM: 0,5). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Wirkung von Amitriptylin am Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor in Abhängigkeit von der anatomischen Region steht und sich zwischen Vorhof und Ventrikel unterscheidet (Angus und Black 1980). Dieser regionsspezifische Effekt zeigt sich auch in einer anderen Arbeit über die Untersuchung der Auswirkungen von Amitriptylin auf Histaminrezeptoren an Ileum-Präparaten von Meerschweinchen. Amitriptylin zeigte in einem

Konzentrationsbereich von 0,01  $\mu\text{M}$  bis 5,0  $\mu\text{M}$  eine konzentrationsabhängige Verschiebung der Konzentrationswirkungskurve von Histamin zu höheren Konzentrationen an Mukosa und Muskel, jedoch war dieser Effekt auf die Muskulatur deutlich stärker ausgeprägt als auf die Mukosa (Kachur et al. 1988). Im Gegensatz zu der Studie von Angus und Black aus dem Jahr 1980 konnte jedoch eine andere Arbeit an Vorhofpräparaten von Meerschweinchen und Kaninchen mit 3,6  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  Amitriptylin durchaus einen konzentrationsabhängigen negativ chronotropen Effekt zeigen (Hughes und Coret 1974).

Studien zur Auswirkung von Amitriptylin auf kardiale Parameter bei Mäusen lagen zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht vor und werden in dieser Arbeit erstmals beschrieben.

In einer Studie an einer Insekten-Zellkultur (Sf9), welche rekombinante humane Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren mit Hilfe eines Baculovirus-Systems exprimierten, konnte gezeigt werden, daß mehrere Psychopharmaka einschließlich Amitriptylin an dem humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor eine antagonistische Wirkung entfalten. Mittels einer radioaktiven Ligandenstudie zeigte sich Amitriptylin als der potenteste Antagonist der untersuchten Psychopharmaka mit einem pKi Wert von 7,18 (Appl et al. 2012). Es konnte zudem bereits auch an humanen Cerebrum-Proben gezeigt werden, daß Amitriptylin eine antagonistische Wirkung an Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren entfaltet (Traiffort et al. 1992). Aufgrund dieser ausgeprägten antagonistischen Wirkung wurde Amitriptylin und seine Wirkung auf den humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor in dieser Arbeit weiter untersucht. Die gewöhnliche therapeutische Plasmakonzentration von Amitriptylin liegt zwischen 255 nM und 637 nM (Baumann et al. 2004). Somit kann durchaus angenommen werden, daß die antagonistische Wirkung von Amitriptylin am Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors eine klinisch relevante Beeinflussung der kardialen Funktion verursachen kann.

## 2 Zielstellung

In der Einleitung wurde die Wirkung und Wirkweise von Histamin über die verschiedenen Rezeptoren auf das Herz aufgezeigt. Ebenfalls wurde dargelegt, daß Amitriptylin an Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren eine antagonistische Wirkung entfaltet.

In dieser Arbeit soll geklärt werden, inwiefern diese antagonistische Wirkung von Amitriptylin Einfluss auf verschiedene Parameter der Herzfunktion ausübt. Zu diesem Zweck wurden elektrisch stimulierte linke und spontan schlagende rechte Vorhofpräparate von Mäusen mit überexprimiertem Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor in einem Organbad untersucht. Die kontraktile Parameter wurden unter Histamin ohne Amitriptylin und in Anwesenheit der Amitriptylin-Konzentrationen 1 µM, 3 µM und 10 µM gemessen. In einem translationalen Ansatz wurden die Ergebnisse auch mit Untersuchungen an humanen Proben verglichen. Anschließend erfolgte die Messung des an Serin 16 phosphorylierten Phospholambans mittels Western Blot, um den intrazellulären Signalweg etwas genauer zu untersuchen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Tierhaltung

Die Haltung und Verwendung der Mäuse erfolgte gemäß den gesetzlichen Vorgaben nach Anzeige durch die Core Facility Tierhaltung der Universitätsmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und entsprach sämtlichen Anforderungen des Tierschutzgesetzes, der Tierschutz-Versuchstierordnung, der Meldeordnung für Versuchstiere und der Richtlinie des Europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere 2010/63/EU.

#### 3.2 Generierung der transgenen Mäuse

Es wurden transgene Versuchstiere verwendet, welche eine Überexpression des humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors aufwiesen. Das Plasmid, welches die entsprechende cDNA des Rezeptors (GeneBank Accession Number AY136744) enthielt, wurde freundlicherweise von Professor Dr. R. Seifert (Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die cDNA wurde zusammen mit einem C-terminalen Polyhistidin-Tag durch Restriktionsendonukleasen Hind III und XbaI aus dem Plasmid geschnitten. Mit Hilfe des Klenow-Enzyms wurden die Enden des DNA-Doppelstrangs geglättet und es erfolgte das Einbringen in eine Expressionskassette. Als Promoterkassette diente die kardiale  $\alpha$ -Form der schweren Kette des Myosins der Maus und die Terminierungssequenz bestand aus einer Poly-A-Sequenz des Simian-Virus 40. Dieses Konstrukt (Abb. 3) wurde nun in die Pronuclei der murinen Embryos im Einzellstadium eingebracht. Die entstandenen transgenen Tiere wurden daraufhin in einen CD1 Hintergrund eingekreuzt (Gergs et al. 2019a).



Abb. 3

Die Expressionskassette mit der cDNA des humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors und einem c-terminalen Polyhistidin-Tag (6x Histidin).

### 3.3 Genotypisierung

Um den Genotyp der Tiere bestimmen zu können, wurde ihnen im Alter von vier Wochen ein Teil (ca. 2 Millimeter) der Schwanzspitze entfernt und es wurde eine permanente Ohrmarkierung zur späteren Identifizierung angebracht. Es erfolgte eine Genotypisierung mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Dazu wurde eine Extraktions-Lösung aus 250 µl 1 M NaOH, 100 µl 10 mM EDTA (pH 8.0) und 10 ml dH<sub>2</sub>O hergestellt. Weiterhin wurde ein PCR-Mastermix angesetzt. Dieser bestand aus 8 µl dH<sub>2</sub>O, 10 µl des 2-Fach Super Master Mix (Biotool, Houston, TX, USA), 0,5 µl des Vorwärtsprimers 5'-ACCCTTACCCACATAGACC-3' und 0,5 µl des Rückwärtsprimers 5'-AGCAGGTCAGTGATAGCCAA-3'. Zunächst wurden die Schwanzstücke über Nacht schüttelnd bei 55 °C unter Zugabe von 250 µl der Extraktions-Lösung inkubiert. Nachdem mittels 250 µl Tris-HCl 0,23 g / 50 ml die Neutralisierung erfolgt war, wurden 19 µl des PCR-Mastermix und 1 µl der DNA-Probe hinzugegeben. In einem Eppendorf Mastercycler gradient Gerät (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde das Programm zur Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Genotypisierung (Tab. 1) gestartet. Anschließend erfolgte eine Auftrennung in einem 1%igen Agarosegel nach Größe durch die Agarose-Gelelektrophorese. Es wurde 1 g Agarose je 100 ml TAE-Puffer erhitzt und anschließend 10 µl Red-Safe-Farbstoff hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde in die Gelkammer gefüllt, die Kämme wurden eingesetzt und es folgte eine 30-minütige Polymerisierung. Die Kämme wurden anschließend entfernt und das Gel in die Gelkammer gegeben. In der ersten Tasche lief eine DNA-Leiter als Referenz mit und in die restlichen Taschen wurden die PCR-Produkte pipettiert. In einem XCell4 SureLock™ Midi-Cell System (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) wurden 100 mA Stromstärke angelegt für 20 bis 30 Minuten, bis eine adäquate Auftrennung erfolgt war. Anschließend erfolgte eine Fotodokumentation zur Auswertung.

Tab. 1

PCR-Programm für die Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor-Genotypisierung

	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
Denaturierung	94 °C	2 min	1 Zyklus
Denaturierung	94 °C	45 s	40 Zyklen
Primerhybridisierung	50-65 °C	15 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Elongation	72 °C	10 min	1 Zyklus

### 3.4 Kontraktionsversuche

#### 3.4.1 Vorbereitung von Organbad und Messanlage

Zu Beginn der Versuche wurde eine Tyrodelösung hergestellt. Diese stellt für die Vorhofpräparate ein geeignetes Milieu dar, da sie physiologische Elektrolyt- und Glucosespiegel bietet (Gergs et al. 2020). Die Lösung wurde in einem Messzylinder angesetzt, welcher sich in einem Wasserbad mit dem Laborthermostat Lauda E100 (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) befand und wurde so auf 37 °C erwärmt. Die Herstellung der Lösung erfolgte aus 40 ml vorbereiteter Stammlösung I aus 175 g NaCl, 10,05 g KCl und 5,6 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  in 1000 ml, 38 ml von Stammlösung II aus 50 g  $\text{NaHCO}_3$  in 1000 ml und 20 ml von Stammlösung III aus 1,45  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  in 500 ml. Anschließend wurde die Lösung 10 Minuten mit Carbogen (95%  $\text{O}_2$  und 5%  $\text{CO}_2$ ) begast, damit es zu einer Stabilisierung des pH-Werts bei pH 7,4 kommt. Daraufhin wurden 0,8 ml einer Calciumchlorid-Lösung (33,2 g  $\text{CaCl}_2/100 \text{ ml dH}_2\text{O}$ ), sowie 1 g Glucose, 49,9 mg Ascorbinsäure und 19 mg  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  hinzugegeben und mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 1000 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Somit enthielt die Lösung eine Endkonzentration von 119,9 mmol/l NaCl, 5,4 mmol/l KCl, 1,8 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ , 1,10 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 0,42 mmol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 22,6 mmol/l  $\text{NaHCO}_3$ , 0,05 mmol/l  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0,28 mmol/l Ascorbinsäure und 5,05 mmol/l Glucose. Die Lösung wurde konstant mit einem Gasgemisch aus 5%  $\text{CO}_2$  und 95%  $\text{O}_2$  (Carbogen) begast und auf 37 °C gehalten.

Die Versuche wurden in Doppelwandgefäßen (Abb. 4) durchgeführt. Der äußere Raum wurde konstant mit 37 °C warmem Wasser durchspült, um konstant ein physiologisches Versuchsmilieu zu erhalten. Der innere Raum wurde vor Versuchsbeginn mit Wasser dreimal gründlich gespült. Anschließend wurde er mit 10 ml Tyrodelösung gefüllt und konstant mit Carbogen über eine Zufuhr am Boden des inneren Gefäßes begast. Weiterhin befanden sich im inneren Gefäß zwei starre Metalldrähte, an welchen die das Präparat haltenden Haken eingespannt werden konnten. Der obere Draht war mit einem isometrischen Kraftaufnehmer verbunden, dessen Signal über einen Brückenverstärker an einen Computer weitergeleitet wurde. Am PC erfolgte die grafische Darstellung mittels der Software LabChart 5 (ADInstruments, Oxford, England). Vor jedem Versuch wurde der Kraftmesser kalibriert. Dazu wurde erst ein Nullabgleich am frei hängenden Draht durchgeführt. Anschließend wurde zur Referenz der Wandler mit 500 mg belastet, indem ein entsprechend schweres Gewicht angebracht wurde. Für die elektrische Stimulation der linken Vorhofpräparate befand sich in der Apparatur ein Takt und Impulsgenerator TIG 7000 (ELV Elektronik AG, Leer, Deutschland).

Als Einstellungen wurden eine Reizung mit 1 Hz über eine Dauer von 5 ms gewählt. Daraus ergibt sich ein Grundrhythmus von 995 ms mit 60 Schlägen pro Minute (Gergs et al. 2019a).

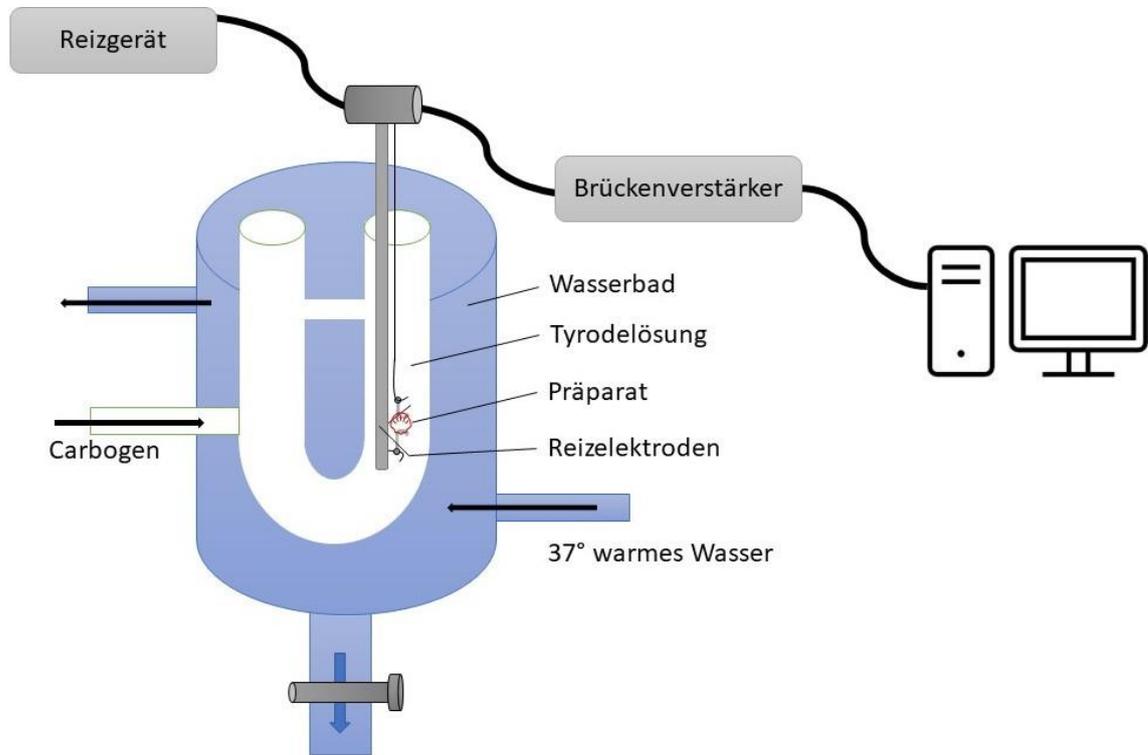


Abb. 4

*Doppelwandgefäß: außen warmes Wasser und innen mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begaste Tyrodelösung sowie ein Vorhofpräparat zwischen zwei Reizelektroden. Ein Kraftaufnehmer registriert das Signal, welches über einen Brückenverstärker anschließend digitalisiert wird.*

### 3.4.2 Organentnahme

Bis zu Beginn der Versuche hatten die Tiere ungehinderten Zugang zu Wasser und Nahrung, sowie die Möglichkeit sich zu bewegen. Die Mäuse wurden gewogen und anschließend Narkotisiert und Heparinisiert. Dazu erfolgte eine Injektion einer Lösung Heparin von 10000 IE und einer Lösung Pentobarbital gewichtsadaptiert (50-75 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal in den linken Unterbauch. Die sedierten Mäuse wurden in einer Präparationsschale fixiert. Es erfolgte die Eröffnung des Fells, der Haut und anschließend des Abdomens. Nun wurde das Diaphragma samt Pleura durch zwei parallel zu den Rippen nach dorsal verlaufende Schnitte durchtrennt. Es folgte axial eine Weiterführung der Schnitte nach kranial mit Durchtrennung der Rippen. Nun konnte das Sternum mit einer Klemme gefasst und nach kranial umgeschlagen werden, wodurch die intrathorakalen Organe freilagen. Nach

Durchtrennung der Aorta und der Vena cava wurde das Präparat in ein vorbereitetes Becherglas mit begaster Tyrodelösung überführt. Dort wurde das Herz leicht ausgedrückt, um eine Thrombenbildung zu vermeiden. Das Präparat wurde anschließend gewogen und in ein neues Becherglas mit begaster Tyrodelösung überführt (Gergs et al. 2019a).

#### 3.4.3 Präparation der Vorhöfe

Das Präparat wurde in eine bereitstehende Präparationsschale überführt, welche mit Tyrodelösung gefüllt war und konstant mit Carbogen begast wurde. Es wurde fixiert und die Lungenflügel, Fett, Thymus und großen Gefäße wurden entfernt. Anschließend wurde das Herzohr des linken Vorhofs mit einem Schnitt entfernt und es wurden zwei Präparationshäkchen an gegenüberliegenden Enden befestigt. Daraufhin wurde der Vorgang am noch spontan schlagenden Herzohr des rechten Vorhofs wiederholt mit besonderem Augenmerk darauf den Sinusknoten bei der Präparation nicht zu beschädigen. Die Vorhofpräparate wurden nun zwischen den Drähten der Messanlage eingespannt und in den inneren Raum des Doppelwandgefäßes getaucht. Das spontan schlagende rechte und elektrisch stimulierte linke Vorhofpräparat wurden auf 5 mN vorgespannt. Zur Äquilibration der Präparate wurde die Tyrodelösung dreimal alle 10 Minuten erneuert. Weiterhin war meist ein Nachspannen der Präparate nötig zur Erhaltung der Ausgangslage von 5 mN, dies erfolgte zuletzt spätestens 10 Minuten vor Beginn der Versuchsreihe. Parallel dazu wurde die Schwanzspitze der Maus abgetrennt, in ein beschriftetes Eppendorf Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff (liquid nitrogen) gefroren. Das bei der Präparation der Vorhöfe entfernte Gewebe wurde getrennt gewogen. Das restliche Herzgewebe wurde mittels einer in flüssigem Stickstoff gekühlten Zange gefroren und ebenfalls in ein beschriftetes Eppendorf Gefäß überführt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff für die Dauer der Versuche aufbewahrt und dann bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert (Gergs et al. 2019a).

#### 3.4.4 Versuche zu Histamin und Amitriptylin an der Maus

Nach der oben beschriebenen Phase der Äquilibration wurde eine kumulative Konzentrationswirkungskurve (KWK) für Histamin von 10 nM bis 10 µM in Dreier-Schritten durchgeführt. Nach jeder Applikation wurde mindestens 5 Minuten gewartet, damit die Wirkung ein Plateau erreichen konnte. Am Ende der KWK erfolgte zum Auswaschen des Histamins ein dreimaliger Wechsel der Tyrode mit frischer Tyrodelösung, jeweils im Abstand

von 10 Minuten. Dann wurde Amitriptylin in verschiedenen Konzentrationen in das Organbad pipettiert und man ließ Amitriptylin 30 Minuten einwirken. Für die Versuchsreihen wurden 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Amitriptylin verwendet. Daraufhin wurde die KWK für Histamin wie zu Beginn wiederholt. Zuletzt wurden 10  $\mu\text{M}$  Isoprenalin in das Organbad pipettiert. Dies geschah bei den Wildtierpräparaten zum Nachweis, daß bei diesen überhaupt eine positiv chronotrope und inotrope Wirkung möglich ist. Bei den transgenen Präparaten konnte so gezeigt werden, daß die Präparate keine weitere cAMP Empfindlichkeit aufweisen (Gergs et al. 2019a). Der Versuchsablauf wurde an Wildtyp Mäusen (WT) und an transgenen Mäusen mit überexprimiertem humanen Histamin- $\text{H}_2$ -Rezeptoren ( $\text{H}_2$ -TG) durchgeführt. Am Ende des Versuches wurden die Vorhofpräparate mittels einer in flüssigem Stickstoff gekühlten Zange gefroren, in ein beschriftetes Eppendorf Gefäß überführt und mit den anderen gefrorenen Proben bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 3.4.5 Versuche an humanen Proben

Die Kontraktionsversuche wurden anschließend an Muskelstreifen von menschlichen rechten Vorhöfen wiederholt, welche während herzchirurgischen Operationen entfernt und von den Patienten für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt wurden. Dies diente im Rahmen eines translationalen Ansatzes dazu, die Übertragbarkeit der Ergebnisse von den Experimenten an Proben der Maus auf den Menschen beispielhaft an der Kraftentwicklung zu überprüfen. Die Proben wurden postoperativ schnellstmöglich in das Institut für Pharmakologie transportiert und in die bereits beschriebenen Doppelwandgefäße eingespannt. Das Versuchsprotokoll ähnelte dem der linken Vorhöfe mit 10  $\mu\text{M}$  Amitriptylin und die Präparate wurden ebenfalls elektrisch stimuliert. Die beiden Konzentrationswirkungskurven mit Histamin wurden jedoch von 1 nM bis 10  $\mu\text{M}$  in Dreier-Schritten durchgeführt und am Ende der Versuche erfolgte die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  Isoprenalin. Nach den Versuchen wurden die Proben ebenfalls mittels flüssigem Stickstoff eingefroren und in Eppendorf Gefäßen bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  verwahrt.

#### 3.5 Western Blot

Um die ursächliche intrazelluläre Signaltransduktion zu untersuchen, wurde der Phosphorylierungszustand des regulatorisch wichtigen Proteins Phospholamban an Serin-16 (PLB Ser16) untersucht. Zunächst wurden die gefrorenen Proben homogenisiert. Dazu wurden

die gefrorenen Proben in einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Behälter zusammen mit einer Stahlkugel und 100 µl eines Homogenisationspuffers aus 10 mM NaHCO<sub>3</sub>-Puffer und 5% f.c. Natriumdodecylsulfat (SDS, NaC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SO<sub>4</sub>) gegeben. Das Gewebe wurde dann in einem Mikrodismembrator (Mikro-Dismembrator S, Sartorius, Göttingen, Deutschland) bei 2700 rpm für 60 Sekunden pulverisiert. Das Pulver wurde mit einem Spatel in ein Eppendorf Gefäß überführt. Es wurden 100 µl SDS-Homogenisationspuffer hinzugegeben und das Gefäß wurde auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung mittels einer Ultraschall-Homogenisation. Das Eppendorf Gefäß wurde im Ultraschallreiniger Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Berlin, Deutschland) während der 3 Zyklen mit jeweils 30 Sekunden bei 75% Leistung konstant von Eis umgeben. Die Proben wurden anschließend 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 30 Minuten bei 20 °C mit 14000 rpm in der Zentrifuge 5424 R zentrifugiert (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand, das Homogenat, wurde in neue Eppendorf Gefäße überführt, eingefroren und bei -80°C gelagert bis zur weiteren Verwendung.

Es folgte die Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry (Lowry et al. 1951, Gergs et al. 2004). Dazu wurden die Homogenate und Proteinstandards (Rinderserumalbumin) mit Wasser auf 1 ml verdünnt. Es wurde ein Mix aus 49 ml 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (in 0,1 M NaOH), 0,5 ml 1% K-Na-Tartrat 4H<sub>2</sub>O und 0,5 ml 0,5% CuSO<sub>4</sub> angesetzt. Davon wurden der Probe 500 µl hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde 0,1 ml eines Folin-Ciocalteu-Reagenzes dazugegeben. Es folgten erneut 15 Minuten Inkubationszeit und im Anschluss daran wurden die Probelösungen und Standardlösungen in Küvetten überführt. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm wurde in einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg) bestimmt. Anhand der mitgeführten Standardkurve und einer Excel-Tabelle wurde nun der Proteingehalt berechnet inklusive der nötigen Probenmenge für eine 1 µg Protein / µl Endvolumen Verdünnung.

Für die Elektrophorese wurden Novex™ 4-12% Tris-Glycin Plus Midi-Gele, 26-Well (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Pro Bahn liefen Aliquots mit je 20 µg Protein und in nicht genutzte Taschen wurden Probenpuffer pipettiert, um so eine Verzerrung der Spuren zu vermeiden. Es wurde ein NuPAGE™ MES SDS (Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid) Laufpuffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) in einem XCell4 SureLock™ Midi-Cell System (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Die beladenen Gele befanden sich in einer 4 °C gekühlten Elektrophoresekammer und liefen für ca. 70 Minuten bei 120V bis die Bromphenolblau-Front an das Ende des Trenngels reichte. Die Proteine wurden anschließend

auf die Nitrocellulose Blottingmembran-Matrix Amersham™ Protran elektrisch überführt (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) über 2 Stunden bei 4 °C und 2 A. Die Inkubation mit Antikörpern gegen an Serin 16 phosphoryliertes Phospholamban (Verdünnung 1:5000, Katalognummer: A010-12AP, PLB Ser16; Badrilla, Leeds, Vereinigtes Königreich), sowie mit Calsequestrin-Antikörpern zur Beladungskontrolle erfolgte über Nacht bei 4 °C. Es wurde CSQ 2 als Ladungskontrolle gewählt, da es sich hier um die herzspezifische Isoform des im sarkoplasmatischen Retikulum vorkommenden Proteins handelt (Wang and Michalak 2020). Die Darstellung der Banden der analysierten Proteine erfolgte über verstärkte Chemifluoreszenz mit dem ECF™ Substrat für Western Blots (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) und einen Typhoon 9410 Scanner (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA). Die Quantifizierung erfolgte mittels des ImageQuant TL Bild Analysesystems (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA).

### 3.6 Lösungen und Puffer

Sämtliche Chemikalien wurden in *pro analysi*-Qualität erworben, beziehungsweise im höchsten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad. Bei dem verwendeten Wasser handelt es sich um Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage. Die Substanzen wurde alle durch das Institut für Pharmakologie und Toxikologie Halle (Saale) erworben.

Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts, Philadelphia, USA
Amitriptylin	Sigma-Aldrich, Steinheim
L (+) - Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumine	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
CuSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
DNA-Ladder GeneRuler™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt

HCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Heparin	Biochrom AG, Berlin
Histamin	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Isoprenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	Roth, Karlsruhe
K <sup>+</sup> -Na <sup>+</sup> -Tartrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	TSI GmbH, Zeven
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS; NaC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> -EDTA	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Pentobarbital	Spofa, Prag, Tschechien
Red-Safe-Farbstoff iNTRON, Super-PCR-Mastermix	Seongnam, Südkorea Biotool GmbH, Oberasbach
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan	Fluka AG, Buchs, Schweiz

### 3.7 Verwendete Geräte

BioPhotometer	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland
Bio-Rad System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Elektrophorese-Einheit SE 600	Hoefer, San Francisco, USA
Gefäße 1 ml, 2 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland
ImageQuant TL Bild Analysesystems	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
Injektionszubehör	B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Laborthermostat Lauda E100	Lauda Dr. R. Wobser GbbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Mikro-Dismembrator S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
PCR-Gerät: Mastercycler gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland
pH-Meter STH 600	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Präparationsbesteck Aesculap	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Rütteltisch: Kreistrüttler 3015	GFL GmbH, Hannover, Deutschland
Stromstärkegeber Standard	Biometra GmbH, Göttingen, Powerpack p25 Deutschland
Takt und Impulsgenerator TIG 7000	ELV Elektronik AG, Leer, Deutschland
Transfer-Einheit TE 62	Hoefer, San Francisco, USA
Typhoon 9410 Scanner	GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA
Ultraschallreiniger Sonopuls HD 2070	Bandelin, Berlin, Deutschland
UV-Betrachter	PEQLAB GmbH, Erlangen, Deutschland
Vortex Shaker Eppendorf Mixer 5432	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland

Waage Typ AT261 DeltaRange	Mettler Instruments GmbH, Gießen, Deutschland
Waage Typ XS205 Teldeo Dualrange	Mettler Instruments GmbH, Gießen, Deutschland
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland

### 3.8 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der Daten wurden Microsoft Office Excel (Version 2010) und GraphPad Prism (Version 5.0) für Windows verwendet. Sämtliche Werte sind als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) angegeben. Als „n“ wird die Stichprobengröße bezeichnet. Für die Berechnung des p-Werts wurden der t-Test nach Student, sowie die Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni Korrektur verwendet. Ein p-Wert unter 0,05 wird als signifikant angesehen. Unter der mittleren effektiven Konzentration ( $EC_{50}$ -Wert) wird die Konzentration eines Wirkstoffs verstanden, bei welcher der Stoff die Hälfte seiner maximalen Wirkung entwickelt. Es wurde für jede sigmoidale Konzentrations-Wirkungskurve der jeweilige  $EC_{50}$ -Wert bestimmt und anschließend daraus das arithmetische Mittel berechnet.

Die ausgewerteten Gruppengrößen der WT und H<sub>2</sub>-TG betragen für die Versuche mit 1  $\mu$ M Amitriptylin je Gruppe 5 Tiere, bei den Versuchen mit 3  $\mu$ M Amitriptylin je 8 Tiere und für die Versuche mit 10  $\mu$ M Amitriptylin ebenfalls je 8 Tiere.

## 4 Ergebnisse

Histamin wirkte in dem transgenen Mausmodell (H<sub>2</sub>-TG) an den spontan schlagenden rechten Vorhofpräparaten zum einem konzentrationsabhängig positiv chronotrop, was sich bei den Wildtyp Präparaten (WT) nicht zeigte. An linken Vorhofpräparate zeigte sich unter Histamin bei den H<sub>2</sub>-TG eine konzentrationsabhängige Zunahme der entwickelten Kraft, eine Zunahme des Kraftanstiegs, eine Verkürzung der Dauer bis zur maximalen Kontraktion und eine Verkürzung der Dauer der Relaxation. Diese Effekte blieben bei den WT aus (Gergs et al. 2019a). In der vorliegenden Arbeit geht es nun um die Veränderungen dieser Histamin-bedingten Effekte durch Amitriptylin.

Am Ende jedes Unterkapitels für eine Amitriptylin-Konzentration werden die Werte in Form einer Tabelle erneut aufgeführt (Tab. 2, Tab. 3, Tab. 4).

### 4.1 Kontraktionsversuche mit 1 µM Amitriptylin

#### 4.1.1 Kraftentwicklung

Bei den transgenen Tieren betrug die Ausgangslage der Kraft bei den elektrisch stimulierten linken Vorhofpräparaten ohne Amitriptylin  $3,48 \pm 0,79$  mN (n=5). Nach Gabe von 1 µM Amitriptylin und einer 30-minütigen Äquibrierungsphase betrug die Ausgangslage ohne Histamin nur noch  $2,06 \pm 0,54$  mN (n=5). Die maximale Kraftentwicklung am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungskurve betrug ohne Amitriptylin  $7,34 \pm 1,13$  mN (n=5) und veränderte sich unter 1 µM Amitriptylin mit  $7,20 \pm 1,11$  mN (n=5) nicht. Neben dem Kraftabfall nach Gabe von Amitriptylin zeigte sich eine Verschiebung der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu höheren Konzentrationen (Abb. 5). Der pEC<sub>50</sub>-Wert der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve ohne Amitriptylin betrug  $-7,27 \pm 0,07$  (n=5) und verschob sich in Anwesenheit von 1 µM Amitriptylin auf  $-6,98 \pm 0,07$  (n=5, p<0,05).

Bei der Wildtyp-Kontrollgruppe betrug die Kraftentwicklung in der Ausgangslage  $5,39 \pm 0,67$  mN (n=5) und nach Gabe von 1 µM Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrierungsphase noch  $4,18 \pm 0,92$  mN (n=5). Am Ende der KWK von Histamin zeigte sich mit  $4,87 \pm 0,67$  mN (n=5) beziehungsweise unter 1 µM Amitriptylin mit  $3,28 \pm 0,90$  mN (n=5) kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der β-adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels 10 µM Isoprenalin, wodurch die Kraftentwicklung auf  $8,88 \pm 0,99$  mN (n=5) stieg.

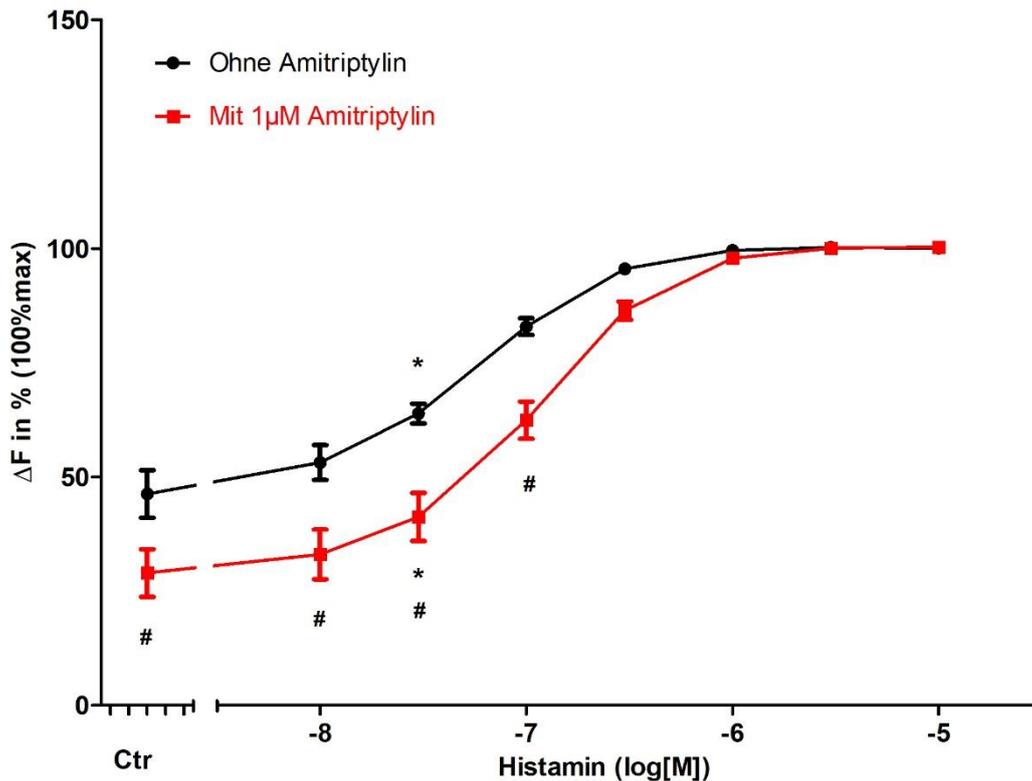


Abb. 5  
Kraftentwicklung von linken  $H_2$ -TG-Vorhofpräparaten ( $n=5$ ) unter einer Histamin KWK ohne und mit  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin.  
#  $p < 0,05$  vs. WT; \*  $p < 0,05$  vs. Ctr.

#### 4.1.2 Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit

Die Kraftanstiegsgeschwindigkeit der elektrisch stimulierten  $H_2$ -TG linken Vorhofpräparate betrug in der Ausgangslage ohne Amitriptylin  $270,65 \pm 59,45$  mN/s ( $n=5$ ). Nach Gabe von  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin und einer 30-minütigen Äquibrierungsphase betrug die Ausgangslage ohne Histamin nur noch  $160,04 \pm 41,03$  mN/s ( $n=5$ ). Die maximale Kraftanstiegsgeschwindigkeit nach der Histamin KWK betrug ohne Amitriptylin  $600,20 \pm 91,51$  mN/s ( $n=5$ ) und war unter  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin mit  $583,49 \pm 89,48$  mN/s ( $n=5$ ) nicht unterschiedlich (Abb. 6). Der  $pEC_{50}$ -Wert der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve ohne Amitriptylin betrug  $-7,22 \pm 0,09$  ( $n=5$ ) und fiel in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin auf  $-6,98 \pm 0,08$  ( $n=5$ ) ab. Amitriptylin bewirkte somit auch hier neben einem Abfall der Anstiegsgeschwindigkeit eine Verschiebung der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu höheren Konzentrationen ( $p < 0,05$ ).

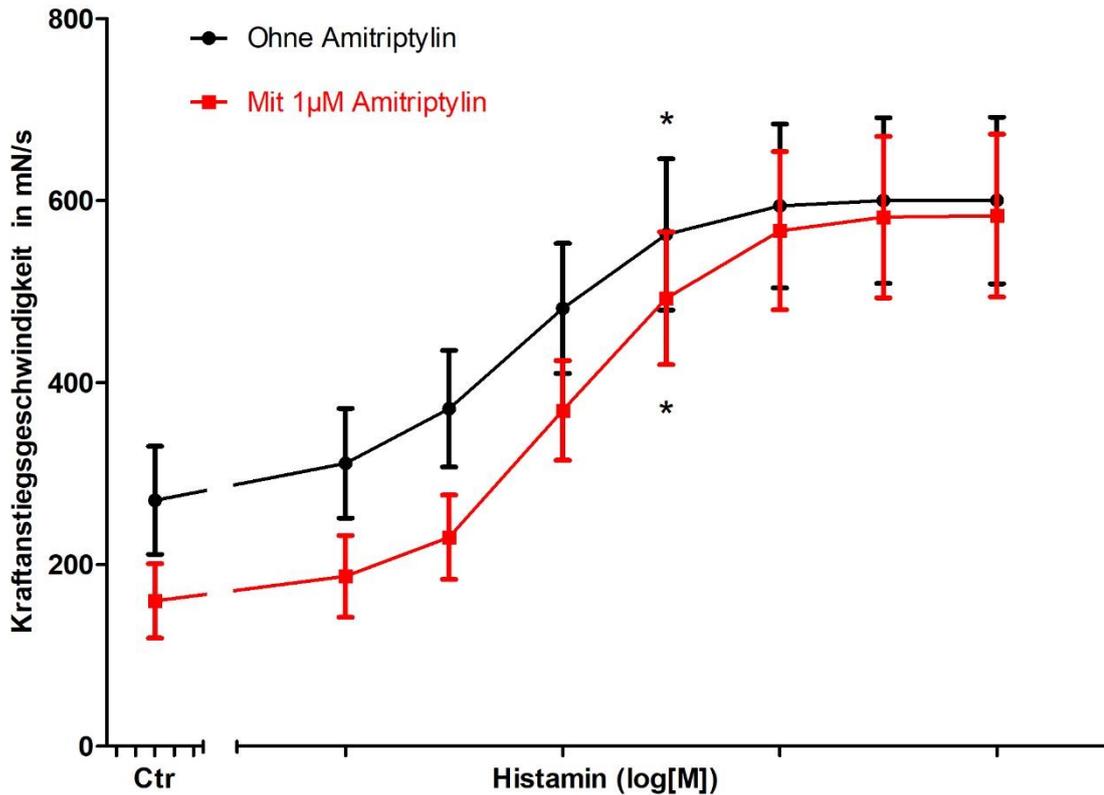


Abb. 6

Kraftanstiegsgeschwindigkeit von linken  $H_2$ -TG-Vorhofpräparaten ( $n=5$ ) unter einer Histamin KWK ohne und mit  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin. \*:  $p < 0,05$  vs. Ctr

Bei Kontrollgruppe der WT betrug die Kraftanstiegsgeschwindigkeit in der Ausgangslage  $436,51 \pm 63,84$  mN/s ( $n=5$ ) und nach Gabe von  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrierungsphase noch  $337,80 \pm 82,44$  mN/s ( $n=5$ ). Am Ende der Histamin-KWK zeigte sich mit  $389,71 \pm 57,52$  mN/s ( $n=5$ ) beziehungsweise unter  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin mit  $280,17 \pm 63,76$  mN/s ( $n=5$ ) kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels  $10 \mu\text{M}$  Isoprenalin, wodurch die Kraftanstiegsgeschwindigkeit auf  $746,65 \pm 88,34$  mN/s ( $n=5$ ) stieg.

Die Ausgangslage der Relaxationsgeschwindigkeit der elektrisch stimulierten linken Vorhofpräparate von  $H_2$ -TG betrug ohne Amitriptylin  $-144,08 \pm 29,32$  mN/s ( $n=5$ ). Unter  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin und nach Abwarten der Äquibrierung betrug diese  $-96,77 \pm 26,71$  mN/s ( $n=5$ ). Am Ende der Histamin KWK betrug die Geschwindigkeit ohne Amitriptylin  $-415,33 \pm 86,57$  mN/s ( $n=5$ ) und unter  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin  $-424,82 \pm 90,93$  mN/s ( $n=5$ ). Der  $p\text{EC}_{50}$ -Wert der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve ohne Amitriptylin betrug  $-7,01 \pm 0,12$  ( $n=5$ ) und in

Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Amitriptylin  $-6,97 \pm 0,09$  (n=5). Es zeigte sich bei diesem Parameter keine Verschiebung der Kurve zu höheren Konzentrationen ( $p > 0,05$ ).

Bei der WT-Kontrollgruppe betrug die Kraftabfallsgeschwindigkeit in der Ausgangslage  $-233,45 \pm 37,24$  mN/s (n=5) und nach Gabe von 1  $\mu\text{M}$  Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrilierungsphase noch  $-217,00 \pm 59,28$  mN/s (n=5). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich mit  $-214,88 \pm 40,64$  mN/s (n=5) beziehungsweise unter 1  $\mu\text{M}$  Amitriptylin mit  $-194,42 \pm 52,67$  mN/s (n=5) kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels 10  $\mu\text{M}$  Isoprenalin, wodurch die Kraftabfallsgeschwindigkeit auf  $-457,73 \pm 62,66$  mN/s (n=5) stieg.

#### 4.1.3 Anspannungs- und Erschlaffungszeit

Die Zeit bis zur maximalen Kraftentwicklung einer Muskelkontraktion bei den elektrisch stimulierten H<sub>2</sub>-TG linken Vorhofpräparaten betrug ohne Amitriptylin  $12,34 \pm 0,18$  ms (n=5). Am Ende der Histamin KWK lag sie nur noch bei  $11,14 \pm 0,16$  (n=5). Unter 1  $\mu\text{M}$  Amitriptylin und nach Abwarten der Äquibrilierung zeigte sich eine Anstiegszeit von  $12,51 \pm 0,21$  ms (n=5) und nach der Histamin Konzentrations-Wirkungskurve noch  $11,25 \pm 0,17$  ms (n=5). Der pEC<sub>50</sub>-Wert der Wirkungskurve ohne Amitriptylin lag bei  $-6,81 \pm 0,10$  (n=5) und stieg unter 1  $\mu\text{M}$  Amitriptylin auf  $-6,70 \pm 0,13$  (n=5,  $p < 0,05$ ).

Bei der WT-Kontrollgruppe war die Zeit bis zur maximalen Kraftentwicklung einer Muskelkontraktion in der Ausgangslage  $12,50 \pm 0,05$  ms (n=5) und nach Gabe von 1  $\mu\text{M}$  Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrilierungsphase noch  $12,69 \pm 0,06$  ms (n=5). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich kein Unterschied zur Ausgangslage bei  $12,78 \pm 0,12$  ms (n=5) beziehungsweise bei  $12,66 \pm 0,13$  ms (n=5) unter 1  $\mu\text{M}$  Amitriptylin. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels 10  $\mu\text{M}$  Isoprenalin, wodurch die Anstiegszeit auf  $11,55 \pm 0,16$  ms (n=5) fiel.

Die Erschlaffungszeit der Präparate der elektrisch stimulierten linken H<sub>2</sub>-TG Vorhöfe betrug ohne Amitriptylin  $40,59 \pm 3,75$  ms (n=5) und fiel am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungskurve auf  $25,83 \pm 0,50$  ms (n=5) ab. Nach Gabe von 1  $\mu\text{M}$  Amitriptylin und einer 30-minütigen Äquibrilierung betrug die Erschlaffungszeit  $31,41 \pm 2,26$  ms (n=5) und fiel am Ende der Histamin KWK auf  $25,68 \pm 0,66$  ms (n=5). Der pEC<sub>50</sub>-Wert der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve ohne Amitriptylin betrug  $-6,82 \pm 0,11$  (n=5) und war unter 1  $\mu\text{M}$  Amitriptylin mit  $-6,83 \pm 0,34$  (n=5) nicht unterschiedlich ( $p > 0,05$ ).

Bei der WT Kontrollgruppe betrug die Erschlaffungszeit der Präparate in der Ausgangslage  $35,83 \pm 2,22$  ms (n=5) und fiel nach Gabe von  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrierungsphase auf  $28,56 \pm 1,82$  ms (n=5). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich mit  $36,11 \pm 2,24$  ms (n=5) beziehungsweise unter  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin mit  $24,30 \pm 1,73$  ms (n=5) kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels  $10 \mu\text{M}$  Isoprenalin, worunter die Erschlaffungszeit  $24,50 \pm 1,13$  ms (n=5) betrug.

#### 4.1.4 Herzfrequenz

Die Frequenz der spontan schlagenden H<sub>2</sub>-TG rechten Vorhofpräparate in der Ausgangslage ohne Amitriptylin betrug  $409,07 \pm 17,16$  bpm (n=5). Nach Applikation von  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin und Abwarten der 30-minütigen Äquibrierung betrug die Frequenz in Ruhe nur noch  $312,37 \pm 10,46$  bpm (n=4). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungskurve ohne Amitriptylin betrug die Frequenz  $560,02 \pm 31,49$  bpm (n=5). Unter  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin und nach der Äquibrierungszeit betrug die Frequenz  $567,37 \pm 9,15$  bpm (n=4). Der pEC<sub>50</sub>-Wert der Histamin KWK ohne Amitriptylin betrug  $-7,40 \pm 0,23$  (n=5) und unter  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin  $-6,65 \pm 0,18$  (n=4). Somit zeigte sich hier eine Abnahme der Herzfrequenz in der Ausgangslage unter Amitriptylin und eine Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu höheren Konzentrationen von Histamin (Abb. 7).

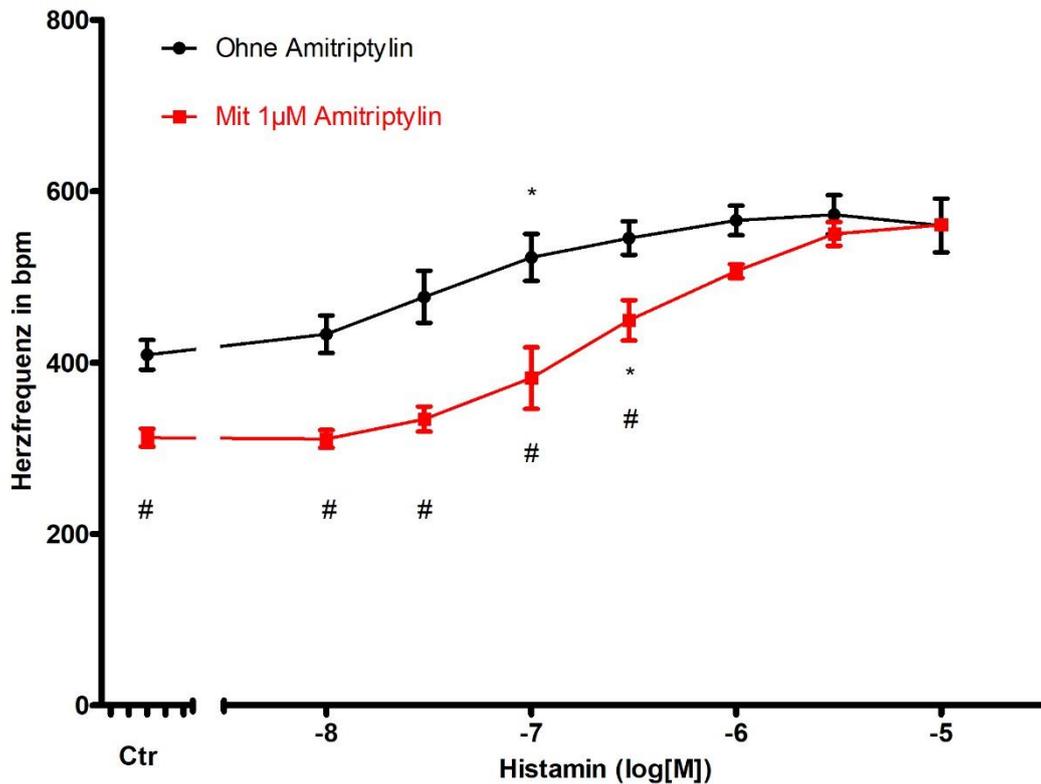


Abb. 7

Herzfrequenz der rechten  $H_2$ -TG-Vorhofpräparate ( $n=5$ , nach Amitriptylin  $n=4$ ) unter einer Histamin KWK ohne und mit  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin. #:  $p < 0,05$  vs. WT; \*:  $p < 0,05$  vs. Ctr

Bei der Wildtyp Kontrollgruppe betrug die Herzfrequenz in der Ausgangslage  $412,58 \pm 29,77$  bpm ( $n=5$ ). Diese fiel nach Gabe von  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin und einer 30-minütigen Äquibrierungsphase auf  $347,43 \pm 20,58$  bpm ( $n=5$ ) ab. Am Ende der Histamin KWK zeigte sich mit  $428,55 \pm 25,68$  bpm ( $n=5$ ) beziehungsweise mit  $362,09 \pm 23,97$  bpm ( $n=5$ ) unter  $1 \mu\text{M}$  Amitriptylin kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels  $10 \mu\text{M}$  Isoprenalin, wodurch die Frequenz auf  $545,40 \pm 26,18$  bpm ( $n=5$ ) stieg.

Tab. 2

Zusammenfassung der kontraktiven Parameter von H<sub>2</sub>-TG-Vorhofpräparaten unter 1 µM Amitriptylin

\*: p < 0,05 vs. ohne Amitriptylin; #: p < 0,05 Verschiebung des EC<sub>50</sub>-Werts

	Kontrolle	10 µM Histamin	1 µM Amitriptylin	10 µM Histamin + 1 µM Amitriptylin
Kontraktionskraft (mN, n=5) <sup>#</sup>	3,48 ± 0,79	7,34 ± 1,13	2,06 ± 0,54*	7,20 ± 1,11
Kraftanstiegs- geschwindigkeit (mN/s, n=5) <sup>#</sup>	270,65 ± 59,45	600,20 ± 91,51	160,04 ± 41,03*	583,49 ± 89,48
Relaxations-geschwindigkeit (mN/s, n=5)	-144,08 ± 29,32	-415,33 ± 86,57	-96,77 ± 26,71*	-424,82 ± 90,93
Anspannungszeit (ms, n=5)	12,34 ± 0,18	11,14 ± 0,16	12,51 ± 0,21	11,25 ± 0,17
Erschlaffungszeit (ms, n=5)	40,59 ± 3,75	25,83 ± 0,50	31,41 ± 2,26*	25,68 ± 0,66
Herzfrequenz (bpm, n=4-5) <sup>#</sup>	409,07 ± 17,16	560,02 ± 31,49	312,37 ± 10,46*	567,37 ± 9,15

## 4.2 Kontraktionsversuche mit 3 µM Amitriptylin

### 4.2.1 Kraftentwicklung

Die Ausgangslage der Kraft bei den elektrisch stimulierten H<sub>2</sub>-TG linken Vorhofpräparaten betrug ohne Amitriptylin 4,26 ± 0,73 mN (n=7). Nach Gabe von 3 µM Amitriptylin und einer 30-minütigen Äquibrierungsphase betrug die Ausgangslage ohne Histamin nur noch 2,75 ± 0,68 mN (n=7). Die maximale Kraftentwicklung am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungskurve betrug ohne Amitriptylin 8,80 ± 0,96 mN (n=7) und war unter 3 µM Amitriptylin mit 8,16 ± 0,85 mN (n=7) nicht verändert. Neben dem Kraftabfall nach Amitriptylingabe zeigte sich auch eine Verschiebung der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu höheren Konzentrationen von Histamin (Abb. 8). Der pEC<sub>50</sub>-Wert der Histamin KWK ohne Amitriptylin betrug -7,56 ± 0,13 (n=7) und verschob sich in Anwesenheit von 3 µM Amitriptylin auf -7,22 ± 0,10 (n=7, p < 0,05).

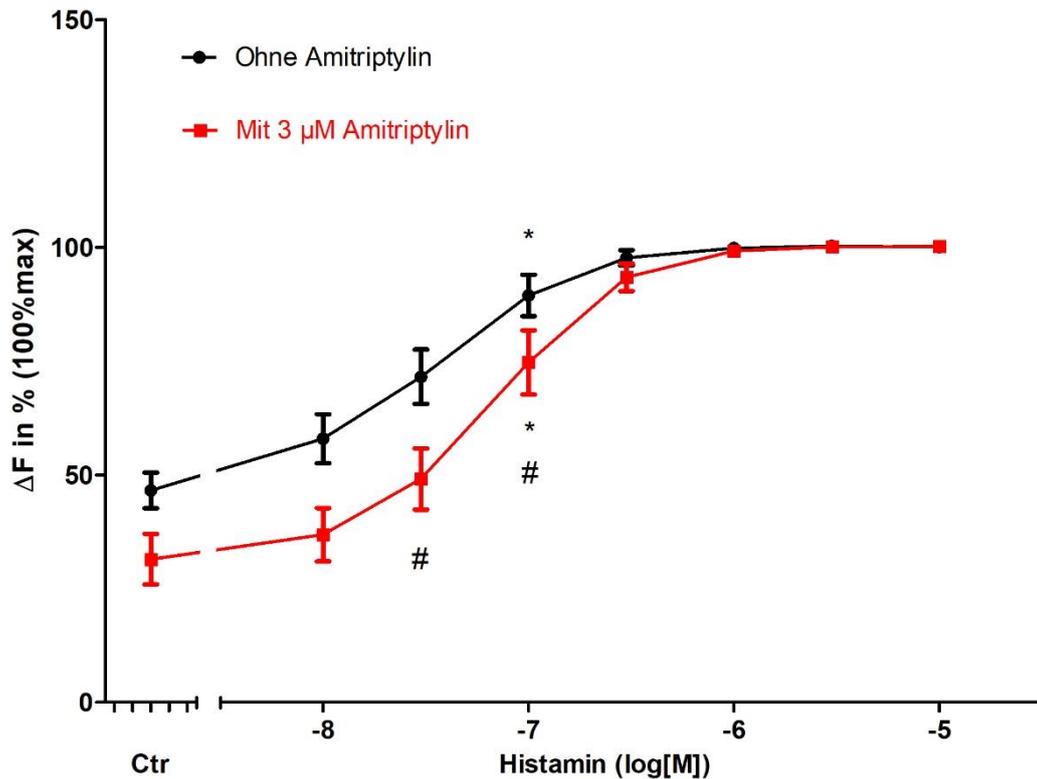


Abb. 8  
Kraftentwicklung linker  $H_2$ -TG-Vorhofpräparate (n=7) unter einer Histamin KWK ohne und mit 3  $\mu$ M Amitriptylin.  
#:  $p < 0,05$  vs. WT; \*:  $p < 0,05$  vs. Ctr.

Bei der Wildtyp Kontrollgruppe betrug die Kraftentwicklung in der Ausgangslage  $5,10 \pm 0,50$  mN (n=8) und nach Gabe von 3  $\mu$ M Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrierungsphase  $5,43 \pm 0,93$  mN (n=8). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich mit  $4,26 \pm 0,53$  mN (n=8) beziehungsweise unter 3  $\mu$ M Amitriptylin mit  $4,63 \pm 0,81$  mN (n=8) kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels 10  $\mu$ M Isoprenalin, wodurch die Kraftentwicklung auf  $9,55 \pm 0,92$  mN (n=8) stieg.

#### 4.2.2 Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit

Die Ausgangslage der Kraftanstiegsgeschwindigkeit der elektrisch stimulierten  $H_2$ -TG linken Vorhofpräparate betrug ohne Amitriptylin  $370,02 \pm 51,07$  mN/s (n=8). Nach Gabe von 3  $\mu$ M Amitriptylin und einer 30-minütigen Äquibrierungsphase lag die Ausgangslage ohne Histamin nur noch bei  $191,61 \pm 38,76$  mN/s (n=8). Der maximale Kraftanstieg nach der Histamin KWK betrug ohne Amitriptylin  $645,10 \pm 56,59$  mN/s (n=8) und unterschied sich unter 3  $\mu$ M

Amitriptylin mit  $602,18 \pm 51,66$  mN/s ( $n=8$ ) nicht. Es zeigte sich somit auch hier neben einem Abfall der Anstiegsgeschwindigkeit eine Verschiebung der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve unter  $3 \mu\text{M}$  Amitriptylin zu höheren Konzentrationen (Abb. 9). Der  $\text{pEC}_{50}$ -Wert der Histamin KWK ohne Amitriptylin betrug  $-7,52 \pm 0,11$  mN/s ( $n=8$ ) und stieg in Anwesenheit von  $3 \mu\text{M}$  Amitriptylin auf  $-7,21 \pm 0,08$  mN/s ( $n=8$ ) an ( $p < 0,05$ ).

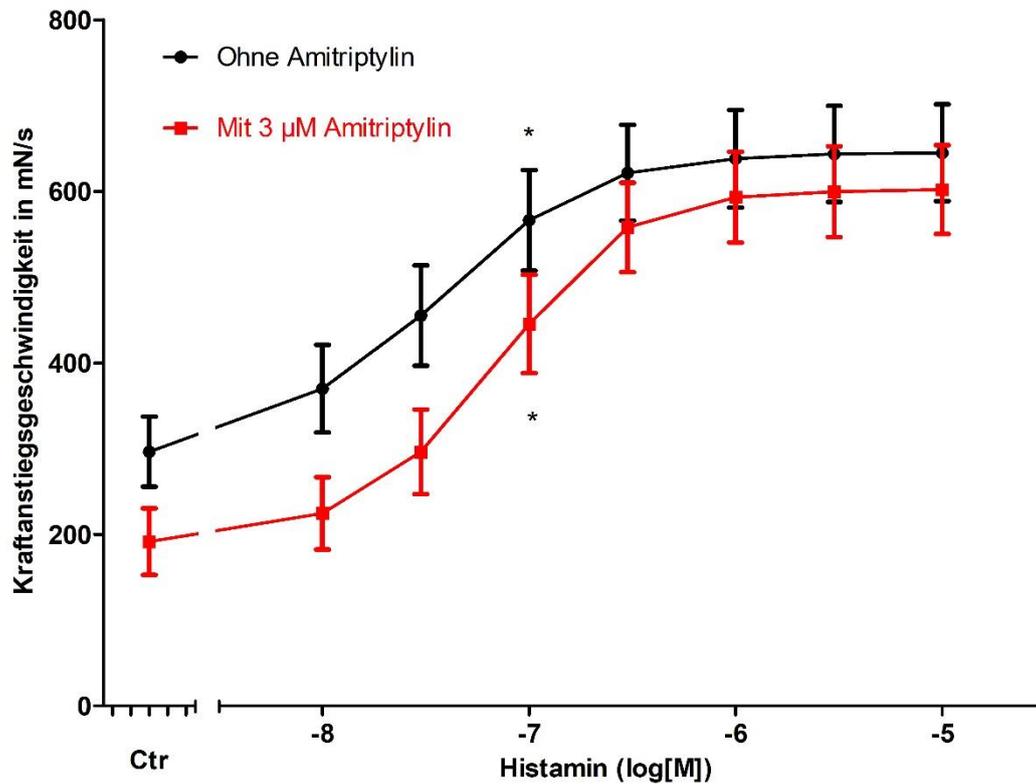


Abb. 9

Kraftanstiegsgeschwindigkeit linker  $\text{H}_2$ -TG-Vorhofpräparate ( $n=8$ ) unter einer Histamin KWK ohne und mit  $3 \mu\text{M}$  Amitriptylin. \*:  $p < 0,05$  vs. Ctr.

Bei der WT-Kontrollgruppe betrug die Kraftanstiegsgeschwindigkeit in der Ausgangslage  $349,76 \pm 31,87$  mN/s ( $n=8$ ) und nach Gabe von  $3 \mu\text{M}$  Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrierungsphase  $371,25 \pm 60,55$  mN/s ( $n=8$ ). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich mit  $284,49 \pm 32,92$  mN/s ( $n=8$ ) beziehungsweise  $319,68 \pm 54,60$  mN/s ( $n=8$ ) unter  $3 \mu\text{M}$  Amitriptylin kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels  $10 \mu\text{M}$  Isoprenalin, wodurch die Kraftanstiegsgeschwindigkeit auf  $686,60 \pm 57,35$  mN/s ( $n=8$ ) stieg.

Die Ausgangslage der Kraftabfallsgeschwindigkeit der elektrisch stimulierten H<sub>2</sub>-TG linken Vorhofpräparate betrug ohne Amitriptylin  $-161,50 \pm 16,47$  mN/s (n=8). Unter 3  $\mu$ M Amitriptylin und nach Abwarten der Äquibrierungsphase betrug diese  $-119,66 \pm 18,16$  mN/s (n=8). Am Ende der Histamin KWK betrug die Geschwindigkeit ohne Amitriptylin  $-342,36 \pm 26,63$  mN/s (n=8) und mit 3  $\mu$ M Amitriptylin  $-337,46 \pm 29,39$  mN/s (n=8). Der pEC<sub>50</sub>-Wert der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve ohne Amitriptylin betrug  $-7,44 \pm 0,10$  mN/s (n=8) und sank in Anwesenheit von 3  $\mu$ M Amitriptylin auf  $-7,28 \pm 0,08$  mN/s (n=8,  $p < 0,05$ , Abb. 10).

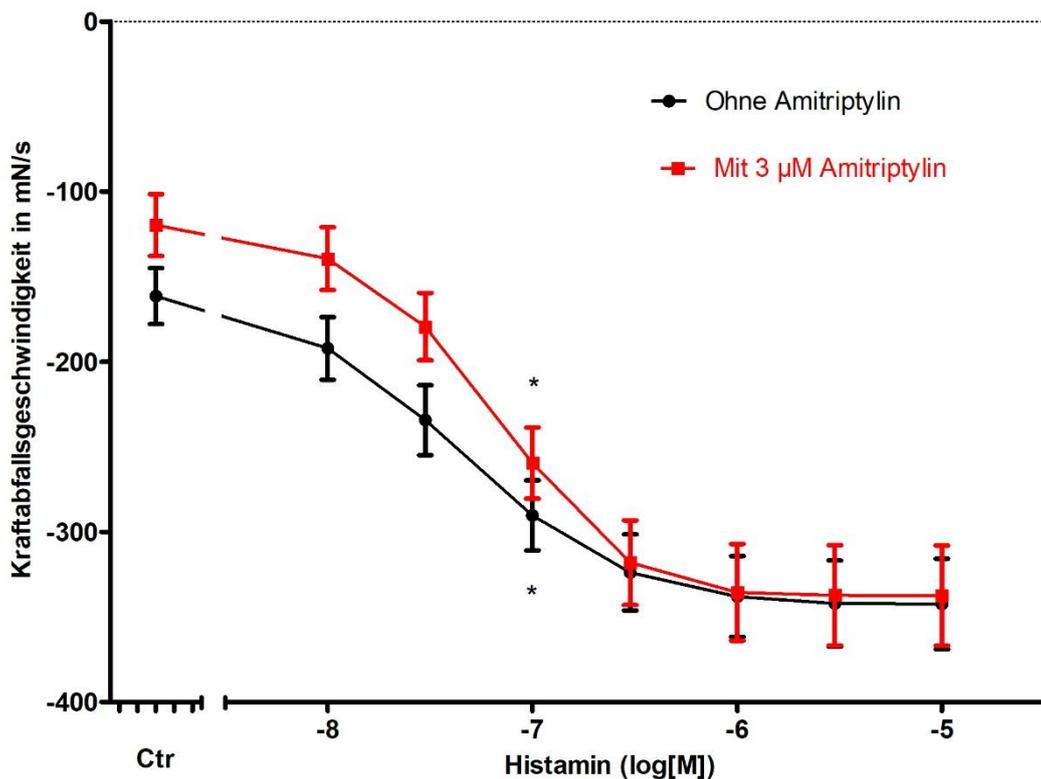


Abb. 10

Kraftabfallsgeschwindigkeit linker H<sub>2</sub>-TG-Vorhofpräparate unter einer Histamin KWK ohne und mit 3  $\mu$ M Amitriptylin. \*:  $p < 0,05$  vs. Ctr.

Bei der WT-Kontrollgruppe betrug die Kraftabfallsgeschwindigkeit in der Ausgangslage  $-189,55 \pm 17,38$  mN/s (n=8) und nach Gabe von 3  $\mu$ M Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrierungsphase  $-216,54 \pm 30,09$  mN/s (n=8). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich mit  $-154,77 \pm 15,34$  mN/s (n=8) beziehungsweise  $-195,40 \pm 28,31$  mN/s (n=8) unter 3  $\mu$ M Amitriptylin kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels 10  $\mu$ M Isoprenalin, wodurch die Kraftabfallsgeschwindigkeit auf  $-359,14 \pm 29,34$  mN/s (n=8) stieg.

#### 4.2.3 Anspannungs- und Erschlaffungszeit

Die Zeit bis zur maximalen Kraftentwicklung einer Muskelkontraktion bei den elektrisch stimulierten H<sub>2</sub>-TG linken Vorhofpräparaten betrug ohne Amitriptylin  $13,78 \pm 0,33$  ms (n=8). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungskurve betrug sie noch  $12,40 \pm 0,21$  ms (n=8). Unter 3  $\mu$ M Amitriptylin und nach Abwarten der Äquibrilierung betrug die Anstiegszeit  $13,85 \pm 0,35$  ms (n=8) und nach der Histamin KWK  $12,42 \pm 0,19$  ms (n=8). Der pEC<sub>50</sub>-Wert der Wirkungskurve betrug ohne Amitriptylin  $-7,38 \pm 0,16$  (n=8) und unter 3  $\mu$ M Amitriptylin  $-7,32 \pm 0,20$  (n=8). Es fand somit auch unter einer Dosierung von 3  $\mu$ M Amitriptylin keine Verschiebung zu höheren Konzentrationen statt.

Bei der Wildtyp Kontrollgruppe betrug die Zeit bis zur maximalen Kraftentwicklung einer Muskelkontraktion in der Ausgangslage  $13,65 \pm 0,38$  ms (n=8) und nach Gabe von 3  $\mu$ M Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrilierungsphase noch  $13,52 \pm 0,25$  ms (n=8). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich mit  $14,12 \pm 0,38$  ms (n=8) beziehungsweise unter 3  $\mu$ M Amitriptylin mit  $13,58 \pm 0,24$  ms (n=8) kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels 10  $\mu$ M Isoprenalin, wodurch die Anstiegszeit auf  $12,78 \pm 0,31$  ms (n=8) fiel.

Die Erschlaffungszeit der Präparate bei den elektrisch stimulierten H<sub>2</sub>-TG linken Vorhofpräparaten betrug ohne Amitriptylin  $32,33 \pm 2,21$  ms (n=8) und fiel am Ende der Histamin KWK auf  $25,70 \pm 2,10$  ms (n=8). Nach Gabe von 3  $\mu$ M Amitriptylin und Abwarten der 30-minütigen Äquibrilierung betrug die Erschlaffungszeit  $22,66 \pm 2,70$  ms (n=8) und fiel am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve auf  $23,88 \pm 2,41$  ms (n=8). Der pEC<sub>50</sub>-Wert der Histamin KWK ohne Amitriptylin betrug  $-6,96 \pm 0,11$  (n=8) und unterschied sich unter 3  $\mu$ M Amitriptylin mit  $-7,07 \pm 0,32$  (n=8) weiterhin nicht.

Bei den WT betrug die Erschlaffungszeit der Präparate in der Ausgangslage  $31,20 \pm 2,11$  ms (n=8) und fiel nach Gabe von 3  $\mu$ M Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrilierungsphase auf  $26,54 \pm 1,88$  ms (n=8). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich mit  $31,35 \pm 2,22$  ms (n=8) beziehungsweise unter 3  $\mu$ M Amitriptylin mit  $25,35 \pm 1,72$  ms (n=8) kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels 10  $\mu$ M Isoprenalin, worunter die Erschlaffungszeit  $27,93 \pm 1,09$  ms (n=8) betrug.

#### 4.2.4 Herzfrequenz

Die Frequenz der spontan schlagenden H<sub>2</sub>-TG rechten Vorhofpräparate in Ausgangslage ohne Amitriptylin betrug 470,39 ± 33,03 bpm (n=7). Nach 3 µM Amitriptylin und nach Abwarten der 30-minütigen Äquibrilierung betrug die Frequenz in Ruhe nur noch 225,35 ± 66,25 bpm (n=5). Am Ende der Histamin KWK betrug die Frequenz 622,89 ± 16,06 bpm (n=7) ohne Amitriptylin und 317,08 ± 61,73 bpm (n=4) unter 3 µM Amitriptylin. Der pEC<sub>50</sub>-Wert der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve ohne Amitriptylin betrug -7,16 ± 0,17 (n=7) und unter 3 µM Amitriptylin -6,81 ± 0,06 (n=4). Somit zeigte sich hier eine Abnahme der Herzfrequenz in Ausgangslage unter Amitriptylin und eine Verschiebung der Kurve zu höheren Konzentrationen (p > 0,05). Jedoch fiel im Vergleich zu 1 µM Amitriptylin eine deutlich höhere Anzahl an Arrhythmien bei den Präparaten unter 3 µM auf.

Bei der Wildtyp Kontrollgruppe betrug die Herzfrequenz in der Ausgangslage 405,35 ± 14,84 bpm (n=8) und nach Gabe von 3 µM Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrilierungsphase noch 244,57 ± 25,25 bpm (n=8). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich mit 417,05 ± 24,07 bpm (n=8) beziehungsweise unter 3 µM Amitriptylin mit 202,52 ± 34,80 bpm (n=8) kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der β-adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels 10 µM Isoprenalin, wodurch die Frequenz auf 367,14 ± 28,02 bpm (n=8) stieg.

Tab. 3

Zusammenfassung der kontraktile Parameter von H<sub>2</sub>-TG-Vorhofpräparaten unter 3 µM Amitriptylin

\*: p < 0,05 vs. ohne Amitriptylin; #: p < 0,05 Verschiebung des EC<sub>50</sub>-Werts

	Kontrolle	10 µM Histamin	3 µM Amitriptylin	10 µM Histamin + 3 µM Amitriptylin
Kontraktionskraft (mN, n=7) <sup>#</sup>	4,26 ± 0,73	8,80 ± 0,96	2,75 ± 0,68*	8,16 ± 0,85
Kraftanstiegs-	370,02 ±	645,10 ±	191,61 ±	602,18 ±

geschwindigkeit (mN/s, n=8) <sup>#</sup>	51,07	56,59	38,76*	51,66
Relaxations- geschwindigkeit (mN/s, n=5) <sup>#</sup>	-161,50 ± 16,47	-342,36 ± 26,63	-119,66 ± 18,16*	-337,46 ± 29,39
Anspannungszeit (ms, n=8)	13,78 ± 0,33	13,85 ± 0,35	12,40 ± 0,21*	12,42 ± 0,19
Erschlaffungszeit (ms, n=8)	32,33 ± 2,21	25,70 ± 2,10	22,66 ± 2,70*	23,88 ± 2,41
Herzfrequenz (bpm, n=4-7) <sup>#</sup>	470,39 ± 33,03	622,89 ± 16,06	225,35 ± 66,25*	317,08 ± 61,73

#### 4.3 Kontraktionsversuche mit 10 µM Amitriptylin

##### 4.3.1 Kraftentwicklung

Bei den transgenen Tieren betrug die Kraft Ausgangslage der elektrisch stimulierten linken Vorhofpräparate ohne Amitriptylin  $2,93 \pm 0,38$  mN (n=6). Nach Gabe von 10 µM Amitriptylin und einer 30-minütigen Äquibrierungsphase betrug die Ausgangslage ohne Histamin nur noch  $1,89 \pm 0,26$  mN (n=6). Die maximale Kraftentwicklung am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungskurve betrug ohne Amitriptylin  $5,17 \pm 0,95$  mN (n=6) und unterschied sich unter 10 µM Amitriptylin mit  $4,33 \pm 0,77$  mN (n=6) nicht. Neben dem Kraftabfall nach Amitriptylinabgabe zeigte sich auch eine Verschiebung der Histamin KWK zu höheren Konzentrationen (Abb. 11). Der pEC<sub>50</sub>-Wert der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve ohne Amitriptylin betrug  $-7,48 \pm 0,21$  (n=6) und erhöhte sich in Anwesenheit von 10 µM Amitriptylin auf  $-6,35 \pm 0,28$  (n=6, p > 0,05).

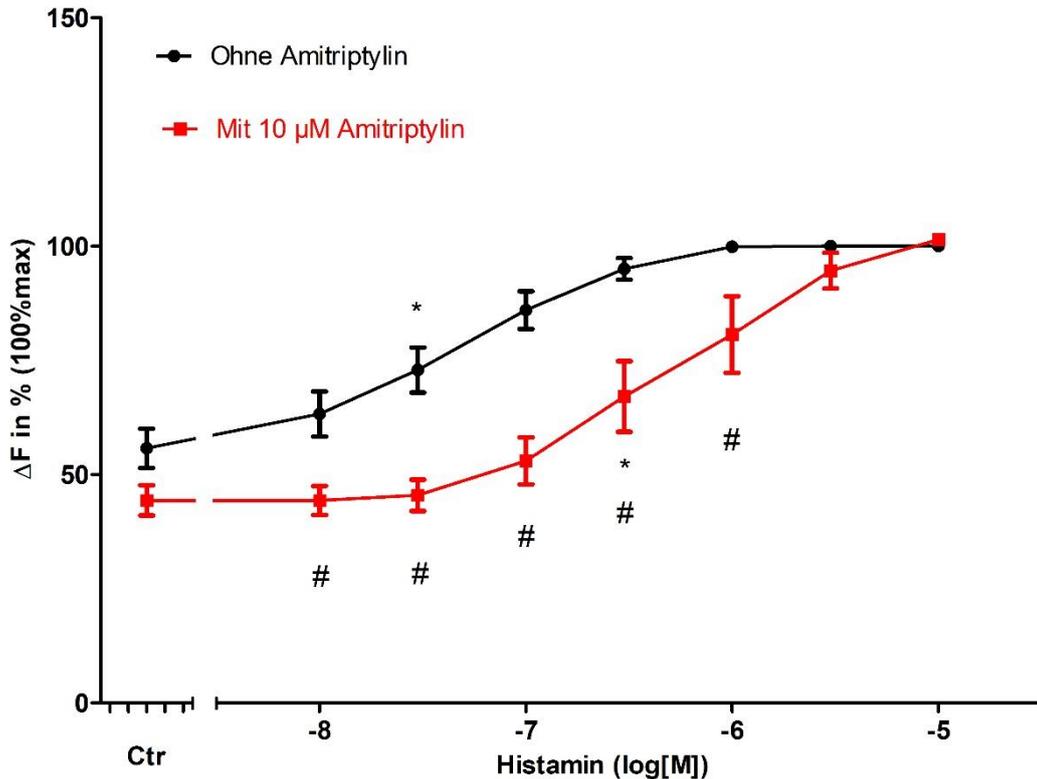


Abb. 11

Kraftentwicklung der linken  $H_2$ -TG-Vorhofpräparate ( $n=6$ ) unter einer Histamin KWK ohne und mit  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin. #:  $p < 0,05$  vs. WT; \*:  $p < 0,05$  vs. Ctr

Bei der Wildtyp Kontrollgruppe betrug die Kraftentwicklung in Ausgangslage  $3,71 \pm 0,64$  mN ( $n=8$ ) und nach Gabe von  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrierungsphase noch  $2,98 \pm 0,63$  mN ( $n=8$ ). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich mit  $3,63 \pm 0,57$  mN ( $n=8$ ) beziehungsweise unter  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin mit  $2,81 \pm 0,46$  mN ( $n=8$ ) kein signifikanter Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels  $10 \mu\text{M}$  Isoprenalin, wodurch die Kraftentwicklung auf  $4,73 \pm 0,67$  mN ( $n=8$ ) stieg.

#### 4.3.2 Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit

Bei der Kraftanstiegsgeschwindigkeit der  $H_2$ -TG elektrisch stimulierten linken Vorhofpräparate zeigte sich in der Ausgangslage ohne Amitriptylin ein Wert von  $201,87 \pm 27,44$  mN/s ( $n=7$ ). Nach Gabe von  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin und einer 30-minütigen Äquibrierungsphase betrug die Ausgangslage ohne Histamin nur noch  $130,07 \pm 19,41$  mN/s ( $n=7$ ). Die maximale Kraftanstiegsgeschwindigkeit nach der Histamin KWK betrug ohne Amitriptylin  $382,50 \pm 66,76$  mN/s ( $n=7$ ) und veränderte sich unter  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin mit  $313,94 \pm 54,12$  mN/s ( $n=7$ ) nicht.

Es zeigte sich somit auch hier neben einem Abfall der Anstiegsgeschwindigkeit eine Verschiebung der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve unter Amitriptylin zu höheren Konzentrationen (Abb. 12). Der  $pEC_{50}$ -Wert der Histamin KWK ohne Amitriptylin betrug  $-7,36 \pm 0,22$  ( $n=7$ ) und stieg in Anwesenheit von  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin auf  $-6,17 \pm 0,32$  ( $n=7$ ) an ( $p < 0,05$ ).

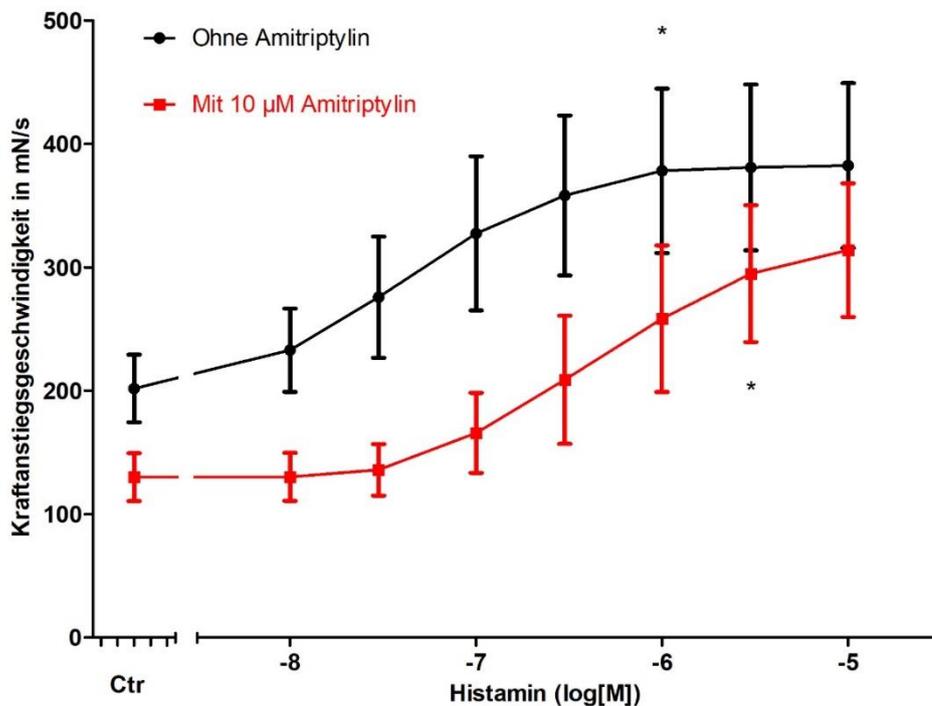


Abb. 12

Kraftanstiegsgeschwindigkeit linker  $H_2$ -TG-Vorhofpräparate unter einer Histamin KWK ohne und mit  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin. \*:  $p < 0,05$  vs. Ctr.

Bei den WT betrug die Kraftanstiegsgeschwindigkeit in der Ausgangslage  $295,07 \pm 45,47$  mN/s ( $n=8$ ) und nach Gabe von  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin sowie der 30-minütigen Äquibrierungsphase noch  $231,10 \pm 43,05$  mN/s ( $n=8$ ). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich mit  $292,27 \pm 42,15$  mN/s ( $n=8$ ) beziehungsweise  $224,71 \pm 29,59$  mN/s ( $n=8$ ) unter  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels  $10 \mu\text{M}$  Isoprenalin, wodurch die Kraftanstiegsgeschwindigkeit auf  $383,43 \pm 46,69$  mN/s ( $n=8$ ) stieg.

Die Ausgangslage der Kraftabfallsgeschwindigkeit der  $H_2$ -TG elektrisch stimulierten linken Vorhofpräparate betrug ohne Amitriptylin  $-99,07 \pm 15,13$  mN/s ( $n=6$ ). Unter  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin und nach Abwarten der Äquibrierung betrug diese  $-74,80 \pm 14,62$  mN/s ( $n=6$ ). Am Ende der Histamin KWK betrug die Abfallsgeschwindigkeit ohne Amitriptylin  $-205,76 \pm 26,68$  mN/s ( $n=6$ ) und mit  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin  $-191,78 \pm 29,83$  mN/s ( $n=6$ ). Der  $pEC_{50}$ -Wert der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve ohne Amitriptylin betrug  $-7,12 \pm 0,11$  ( $n=6$ ) und in

Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Amitriptylin  $-6,11 \pm 0,26$  ( $n=6$ ). Es zeigte sich hier somit weiterhin eine Verschiebung der Kurve zu höheren Konzentrationen ( $p < 0,05$ , Abb. 13).

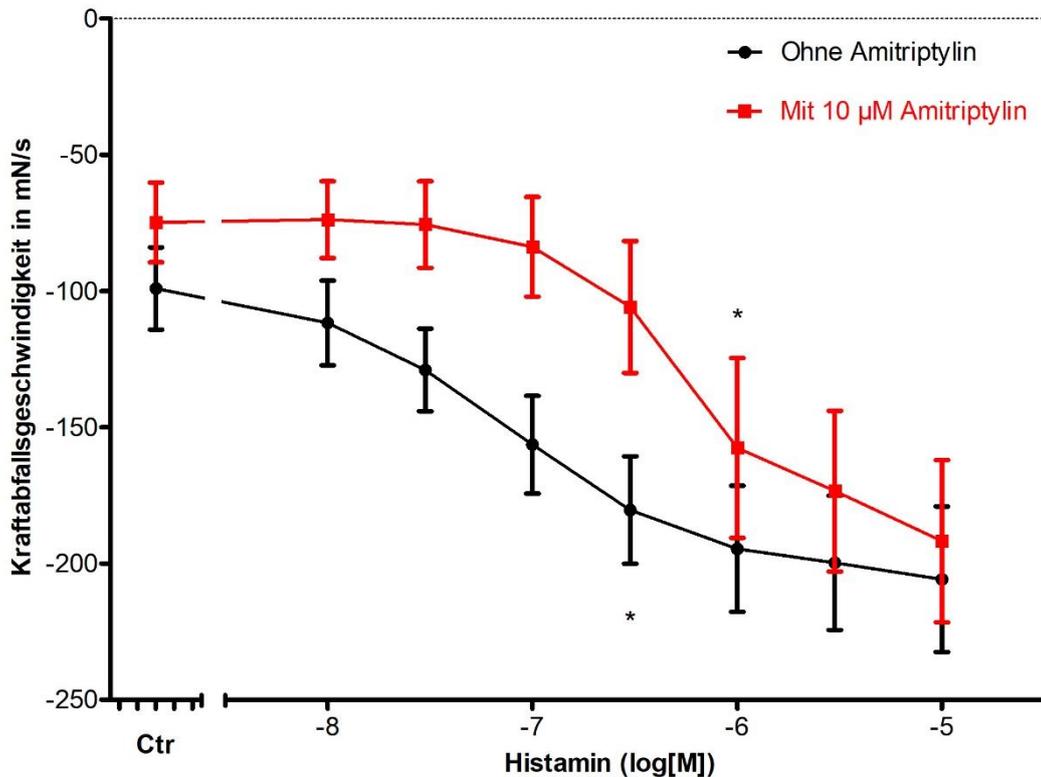


Abb. 13

Kraftabfallgeschwindigkeit linker  $H_2$ -TG-Vorhofpräparate unter einer Histamin KWK ohne und mit 10  $\mu\text{M}$  Amitriptylin. \*:  $p < 0,05$  vs. Ctr.

Bei der Wildtyp Kontrollgruppe betrug die Kraftabfallgeschwindigkeit in der Ausgangslage  $-131,03 \pm 20,38$  mN/s ( $n=8$ ) und nach Gabe von 10  $\mu\text{M}$  Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrierungsphase noch  $-119,03 \pm 25,71$  mN/s ( $n=8$ ). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich mit  $-130,77 \pm 21,39$  mN/s ( $n=8$ ) beziehungsweise  $-118,69 \pm 20,93$  mN/s ( $n=8$ ) unter 10  $\mu\text{M}$  Amitriptylin kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels 10  $\mu\text{M}$  Isoprenalin, wodurch die Kraftabfallgeschwindigkeit auf  $-198,31 \pm 26,01$  mN/s ( $n=8$ ) stieg.

#### 4.3.3 Anspannungs- und Erschlaffungszeit

Die Zeit bis zur maximalen Kraftentwicklung einer Muskelkontraktion bei den  $H_2$ -TG elektrisch stimulierten linken Vorhofpräparaten betrug ohne Amitriptylin  $12,51 \pm 0,15$  ms ( $n=8$ ). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungskurve betrug sie noch  $11,20 \pm 0,15$  ms ( $n=8$ ). Unter 10  $\mu\text{M}$  Amitriptylin und nach Abwarten der Äquibrierung betrug die Anstiegszeit  $12,65 \pm 0,24$  ms ( $n=8$ ) beziehungsweise  $11,56 \pm 0,15$  ms ( $n=8$ ) nach der Histamin KWK. Der  $pEC_{50}$ -Wert der

Wirkungskurve betrug ohne Amitriptylin  $-6,83 \pm 0,16$  (n=8) und unter  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin  $-6,02 \pm 0,31$  (n=8). Es fand somit unter  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin erstmals eine Verschiebung der Kurve zu höheren Konzentrationen bei der maximalen Kraftentwicklung ( $p < 0,05$ , Abb. 14).

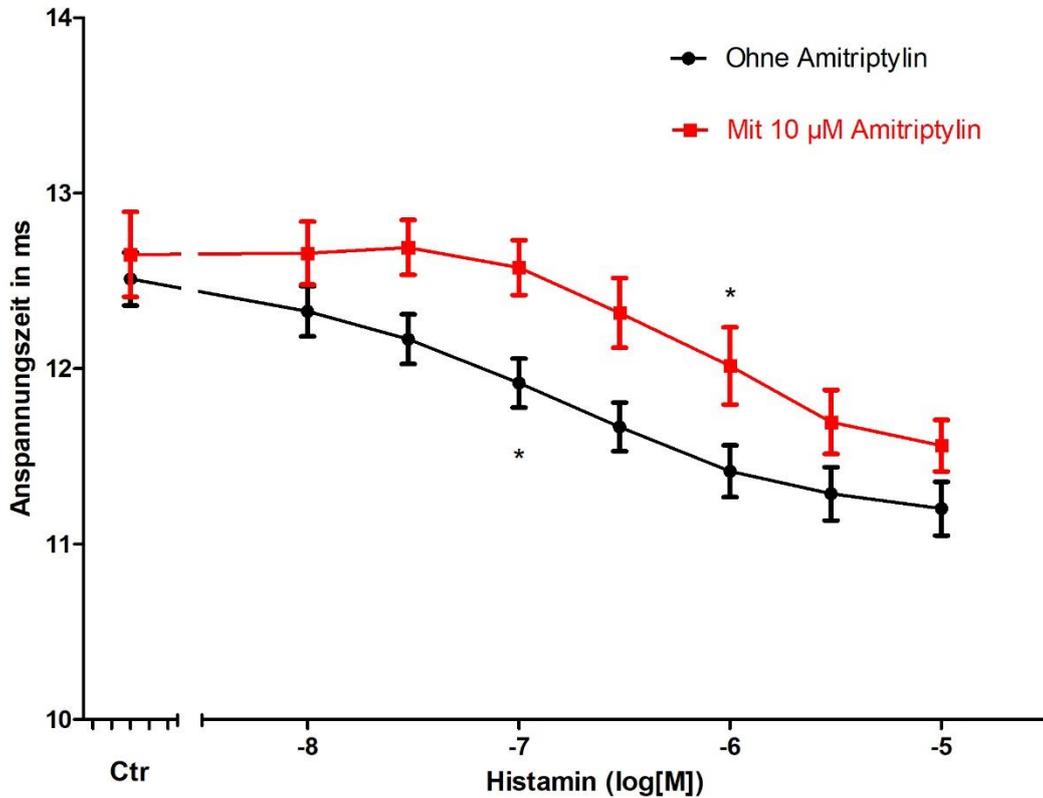


Abb. 14

Anspannungszeit linker  $H_2$ -TG-Vorhofpräparate (n=8) unter einer Histamin KWK ohne und mit  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin. \*:  $p < 0,05$  vs. Ctr.

Bei der Wildtyp Kontrollgruppe betrug die Zeit bis zur maximalen Kraftentwicklung einer Muskelkontraktion in der Ausgangslage  $12,43 \pm 0,36$  ms (n=8) und  $12,59 \pm 0,23$  ms (n=8) nach Gabe von  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrierungsphase. Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich mit  $12,24 \pm 0,38$  ms (n=8) beziehungsweise unter  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin mit  $12,90 \pm 0,28$  ms (n=8) kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der  $\beta$ -adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels  $10 \mu\text{M}$  Isoprenalin, wodurch die Anstiegszeit auf  $11,84 \pm 0,30$  ms (n=8) fiel.

Die Erschlaffungszeit der Präparate bei den elektrisch stimulierten linken Vorhofpräparaten betrug ohne Amitriptylin  $28,78 \pm 1,21$  ms (n=6) und fiel am Ende der Histamin KWK auf  $25,49 \pm 0,86$  ms (n=6). Nach Gabe von  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin und Abwarten der 30-minütigen Äquibrierung betrug die Erschlaffungszeit  $27,54 \pm 0,84$  ms (n=6) und fiel am Ende der

Histamin Konzentrationswirkungskurve auf  $26,46 \pm 0,81$  ms (n=6). Der pEC<sub>50</sub>-Wert der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve ohne Amitriptylin betrug  $-7,13 \pm 0,15$  (n=6) und veränderte sich unter 10 µM Amitriptylin mit  $-7,21 \pm 0,47$  (n=6) nicht.

Bei der WT-Kontrollgruppe betrug die Erschlaffungszeit der Präparate in der Ausgangslage  $30,12 \pm 1,16$  ms (n=8) und  $30,31 \pm 1,45$  ms (n=8) nach Gabe von 10 µM Amitriptylin und der 30-minütigen Äquibrierungsphase. Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich mit  $28,97 \pm 0,83$  ms (n=8) beziehungsweise unter 10 µM Amitriptylin mit  $27,44 \pm 0,65$  ms (n=8) kein Unterschied zur Ausgangslage. Zum Ende des Versuchs erfolgte der Nachweis der β-adrenergen Stimulierbarkeit des Präparates mittels 10 µM Isoprenalin, worunter die Erschlaffungszeit  $28,25 \pm 1,02$  ms (n=8) betrug.

#### 4.3.4 Herzfrequenz

Die Frequenz der spontan schlagenden H<sub>2</sub>-TG rechten Vorhofpräparate in Ausgangslage ohne Amitriptylin betrug  $198,37 \pm 25,36$  bpm (n=5). Am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungskurve betrug die Frequenz  $360,12 \pm 7,87$  bpm (n=5). Der pEC<sub>50</sub>-Wert der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve betrug ohne Amitriptylin  $-6,95 \pm 0,20$  (n=5). Unter 10 µM Amitriptylin und nach der Äquibrierungszeit zeigten sämtliche Präparate anhaltende Arrhythmien und teils komplette Asystolien. Somit war eine Auswertung der Herzfrequenz unter Amitriptylin nicht möglich. Daher kann weder ein pEC<sub>50</sub>-Wert noch eine Verschiebung der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zu höheren Konzentrationen ermittelt werden.

Bei der WT Kontrollgruppe betrug die Herzfrequenz in der Ausgangslage  $288,25 \pm 37,43$  bpm (n=8) und am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte sich mit  $302,96 \pm 37,92$  bpm (n=8) kein Unterschied zur Ausgangslage. Nach der Gabe von 10 µM Amitriptylin entwickelten sämtliche Präparate starke Arrhythmien oder eine Asystolie.

*Tab. 4*

*Zusammenfassung der kontraktile Parameter von H<sub>2</sub>-TG-Vorhofpräparaten unter 10 µM Amitriptylin*

*\*: p < 0,05 vs. ohne Amitriptylin; #: p < 0,05 Verschiebung des EC<sub>50</sub>-Werts*

Kontrolle	10 µM Histamin	10 µM Amitriptylin	10 µM Histamin + 10 µM Amitriptylin

Kontraktionskraft (mN, n=6) <sup>#</sup>	2,93 ± 0,38	5,17 ± 0,95	1,89 ± 0,26*	4,33 ± 0,77
Kraftanstiegs- geschwindigkeit (mN/s, n=7) <sup>#</sup>	201,87 ± 27,44	382,50 ± 66,76	130,07 ± 19,41*	313,94 ± 54,12
Relaxations-geschwindigkeit (mN/s, n=6) <sup>#</sup>	-99,07 ± 15,13	-205,76 ± 26,68	-74,80 ± 14,62*	-191,78 ± 29,83
Anspannungszeit (ms, n=8) <sup>#</sup>	12,51 ± 0,15	11,20 ± 0,15	12,65 ± 0,24	11,56 ± 0,15
Erschlaffungszeit (ms, n=6)	28,78 ± 1,21	25,49 ± 0,86	27,54 ± 0,84*	26,46 ± 0,81
Herzfrequenz (bpm, n=5)	198,37 ± 25,36	360,12 ± 7,87	X	X

#### 4.4 Kraftentwicklung an menschlichen Präparaten

Die Kontraktionskraft bei den menschlichen Proben betrug in der Ausgangslage  $5,57 \pm 0,63$  mN (n=4) und stieg unter  $10 \mu\text{M}$  Histamin auf  $8,20 \pm 1,01$  mN (n=4) an. Nach Gabe von  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin lag die Kraftentwicklung in Ruhe bei  $5,06 \pm 1,09$  mN (n=4) und erhöhte sich am Ende der Konzentrations-Wirkungs-Kurve auf  $4,71 \pm 1,32$  mN (n=4). Nach Applikation von  $10 \mu\text{M}$  Isoprenalin veränderte sich die Kraftentwicklung mit  $4,33 \pm 0,41$  mN (n=4) nicht wesentlich. Nach Gabe von  $100 \mu\text{M}$  Isoprenalin stieg die Kraftentwicklung jedoch auf  $5,88 \pm 1,39$  mN (n=4) an. Betrachtet man die Kraftentwicklung nun als relativen Kraftzuwachs ( $\Delta F$ ) betrug die Ausgangslage ohne Amitriptylin 0 mN und stieg am Ende der Histamin KWK auf  $2,63 \pm 0,63$  mN (n=4) an. Unter  $10 \mu\text{M}$  Amitriptylin betrug der relativen Kraftzuwachs am Ende der Histamin Konzentrations-Wirkungs-Kurve  $-0,35 \pm 0,85$  mN (n=4). Unter  $10 \mu\text{M}$  Isoprenalin zeigte sich mit  $-1,55 \pm 0,30$  mN (n=4) keinen Kraftanstieg unter  $100 \mu\text{M}$  Isoprenalin mit  $1,32 \pm 2,43$  mN (n=4) jedoch schon. Hier zeigte sich, daß die positiv inotrope Wirkung von  $10 \mu\text{M}$  Histamin noch nicht in der Lage ist die negativ inotrope Wirkung von  $10 \text{ mM}$  Amitriptylin auszugleichen (Abb. 15). Bei den menschlichen Proben zeigte sich innerhalb des aus Gründen der Vergleichbarkeit gewählten Bereiches der Histamin Konzentrationswirkungskurve kein Erreichen eines Plateaus, welches die maximale Kraftentwicklung anzeigen würde. Somit ließen sich keine  $p\text{EC}_{50}$ -Werte berechnen und es konnte auch keine Verschiebung der Kurve analysiert werden.

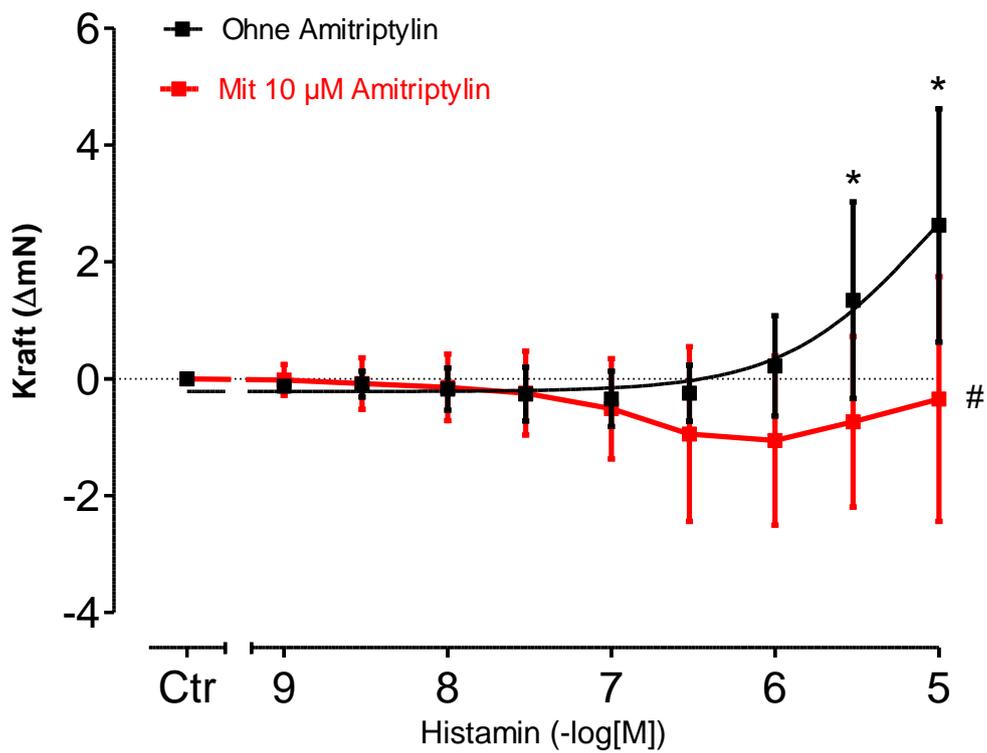
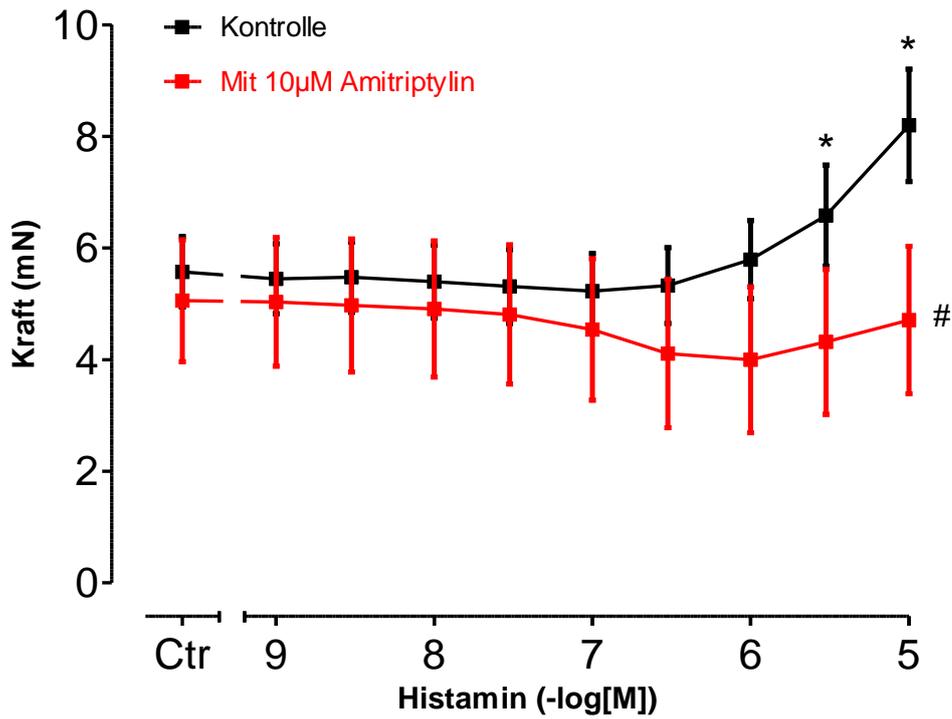


Abb. 15

Kraftentwicklung humaner Vorhofpräparate (n=4) unter einer Histamin KWK ohne und mit 10  $\mu M$  Amitriptylin.

#:  $p < 0,05$  vs. ohne Amitriptylin; \*:  $p < 0,05$  vs. Ctr. (vor KWK)

#### 4.5 Phospholamban-Phosphorylierung

Der Quotient von an Serin 16 phosphoryliertem Phospholamban zu der Beladungskontrolle Calsequestrin (PLB Ser16/CSQ) betrug bei den WT-Präparaten unter 10  $\mu$ M Histamin  $1,40 \pm 0,17$  (n=4). Für die Präparate der H<sub>2</sub>-TG-Tiere unter 10  $\mu$ M Histamin betrug der Quotient  $10,15 \pm 1,71$  (n=6) und bei den transgenen Tieren unter 10  $\mu$ M Histamin und 10  $\mu$ M Amitriptylin betrug er nur noch  $4,05 \pm 1,43$  (n=4, Abb. 16). Die Mittelwerte der drei Gruppen wurden mittels einer ANOVA verglichen und es konnte ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) nachgewiesen werden (Abb. 17).

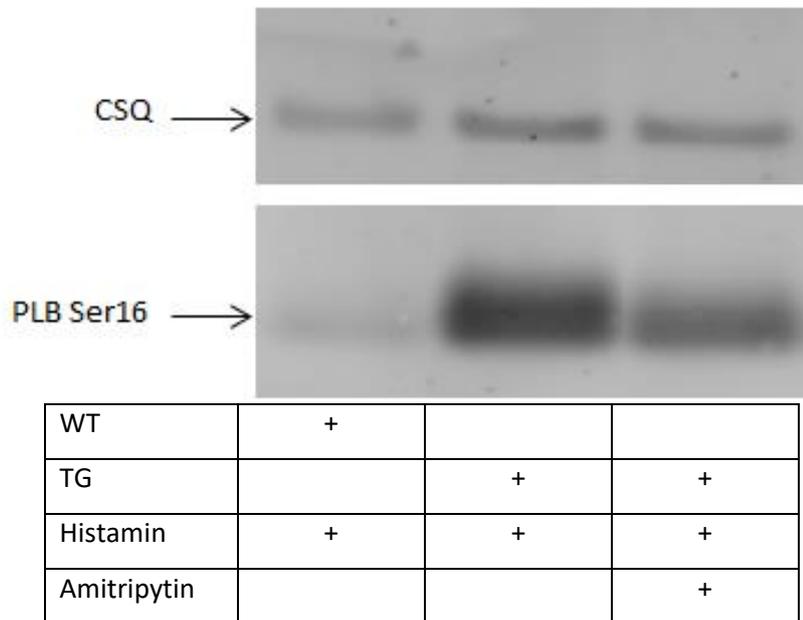


Abb. 16

Western-Blot: Links WT mit Histamin; in der Mitte H<sub>2</sub>-TG mit Histamin; Rechts H<sub>2</sub>-TG mit Histamin und 10  $\mu$ M Amitriptylin

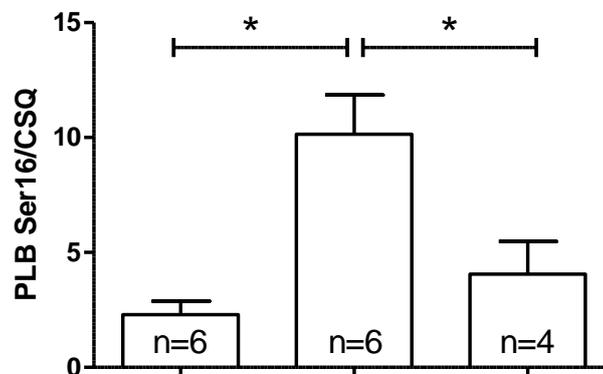


Abb. 17

Quotienten PLB Ser16/CSQ: Links WT mit Histamin; in der Mitte H<sub>2</sub>-TG mit Histamin; Rechts H<sub>2</sub>-TG mit Histamin und 10  $\mu$ M Amitriptylin; \*:  $p < 0,05$

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methoden

Das verwendete Mausmodell zeigt eine Überexpression des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors in Herzmuskelzellen. Das Problem hierbei ist, daß keine genaue Aussage über die Quantität der Expression und Rezeptordichte getroffen werden kann. Dies liegt daran, daß aktuell keiner der kommerziell verfügbaren Antikörper gegen diesen Rezeptor für den Nachweis geeignet ist. Jedoch zeigte sich in den Versuchen zur Modelletablierung, daß die maximal entfaltete inotrope und chronotrope Wirkung nach Histamingabe derselben Intensität wie einer maximalen Stimulation der  $\beta$ -Rezeptoren entspricht (diskutiert in Gergs et al. 2019a). Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, bei denen die Gabe von 10  $\mu$ M Isoprenalin am Ende der Histamin KWK bei den transgenen Tieren keine weitere positiv inotrope und chronotrope Wirkung erzeugte. Dies spricht für eine Überexpression des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors im Vergleich zu dem Expressionsmuster bei dem menschlichen Herz, da hier normalerweise nur durch Betaadrenozeptoren eine maximale inotrope Wirkung hervorgerufen wird. Durch Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren wird typischerweise am gesunden menschlichen Herz nur eine submaximale positiv inotrope und chronotrope Wirkung hervorgerufen (Bristow et al. 1982).

Bei jeder experimentellen Arbeit muss die Anzahl der verwendeten Tiere diskutiert werden. Es gilt immer eine Abwägung zwischen Ethik und Tierschutz auf der einen Seite und einer möglichst hohen Validität auf der anderen Seite zu treffen. Es lässt sich jedoch immer argumentieren, daß eine höhere Zahl an Versuchstieren zu valideren Ergebnissen führen würde. Dies ist aber im Rahmen des Tierschutzes nicht unbegrenzt möglich.

Die Berechnung der Verschiebung der Kurven zu höheren Konzentrationen wurde anhand der EC<sub>50</sub> Werte bei einem zugrunde gelegten sigmoidalen Verlauf der Konzentrationswirkungskurven vorgenommen. Um eine maximal hohe Genauigkeit bei der Berechnung zu erreichen ist ein großes Plateau zu Beginn und am Ende der Kurve nötig, sowie möglichst viele unterschiedliche Konzentration zwischen den Plateaus (Goutelle et al. 2008). Es lassen sich bei dem Versuchsaufbau jedoch nicht beliebig viele Pipettierzeitpunkte einbauen, da mit jedem zusätzlichen Zeitpunkt die Versuchsdauer entsprechend steigt. Das ist nicht nur bezüglich der Praktikabilität kritisch zu sehen, sondern vor allem auch in Bezug auf die Qualität der Vorhofpräparate. Mit zunehmender Versuchsdauer setzten Erschlaffungsprozesse der Präparate ein, welche ebenfalls Einfluss auf die gemessenen Werte nehmen und sie somit verfälschen.

Bei der Reproduktion der Versuche an menschlichen Präparaten lassen sich zwei Punkte anbringen. Erstens gilt auch hier wieder, daß eine höhere Anzahl an Präparaten für eine höhere Validität sorgen würde. Jedoch sind menschliche Präparate nur sehr begrenzt verfügbar. Zweitens lagen uns nur menschliche Vorhofpräparate vor. Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung und Wirkung der Rezeptoren am menschlichen Herz (Matsuda et al. 2004) wäre auch eine Analyse des Verhaltens von Ventrikeln von großem Interesse. Weiterhin lässt sich an isolierten atrialen Muskelproben die chronotrope Wirkung nicht erforschen, da hierfür ein intaktes Sinusknotenpräparat nötig ist.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Rechte Vorhöfe

In sämtlichen Versuchen an WT-Präparaten zeigte sich unter schrittweiser Erhöhung der Histamin Konzentration kein positiv chronotroper Effekt. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen aus früheren Veröffentlichungen, in denen gezeigt wurde, daß im murinen Herzen keine funktionellen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren vorhanden sind. Die Gabe von Histamin führte im Gegensatz dazu an den H<sub>2</sub>-TG-Präparaten zu einem positiv chronotropen Effekt (Gergs et al. 2013, 2019a, 2020). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß an den rechten Vorhofpräparaten der transgenen Tiere die Gabe von Amitriptylin konzentrationsabhängig zu einer Verschiebung der Histamin KWK zu höheren Konzentrationen führt. Dies zeigt den kompetitiven Antagonismus von Amitriptylin an den humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren im Sinusknoten der transgenen Tiere.

### 5.2.2 Linke Vorhöfe

Die linken WT Vorhofpräparate zeigten ebenfalls keinen Effekt auf die Histamin KWK. Dies deckt sich erneut mit dem Wissen, daß in murinen Vorhöfen keine funktionellen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren exprimiert werden und bisherigen Veröffentlichungen diesbezüglich. Weiterhin führte Histamin zu einer Steigerung der kontraktilen Parameter bei den H<sub>2</sub>-TG Präparaten, wie bereits beschrieben (Gergs et al. 2013, 2019a, 2020). Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, daß Amitriptylin zu einer Verschiebung der Histamin Konzentrations-Wirkungskurven zu höheren Konzentrationen bei H<sub>2</sub>-TG führt. Dies zeigt, daß Amitriptylin eine antagonistische Wirkung an den humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren im linken Vorhof der transgenen Tiere entfaltet und so Einfluss auf die kontraktilen Parameter nimmt.

Unter sämtlichen Konzentrationen von Amitriptylin zeigte sich initial ein negativ inotroper Effekt. Dies ließe sich durch die Blockade von Natriumkanälen durch Amitriptylin erklären, da der niedrigere intrazelluläre Natrium Gehalt zu einer Aktivierung der Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) führen würde (Oravec et al. 2018). Der Transport von Natrium in die Zelle mit gleichzeitigem Transport von Calcium aus der Zelle führt zu einem negativ inotropen Effekt. Dieser Mechanismus ist auch einer der Gründe, weshalb Antiarrhythmika der Klasse I bei Patienten mit Herzinsuffizienz kontraindiziert sind. Es konnte bereits gezeigt werden, daß trizyklische Antidepressiva wie Amitriptylin eine Blockade an Natrium Kanälen verursachen (Dick et al. 2007). Eine Alternative oder auch synergistische Erklärung könnte die Blockade von L-Typ Calcium-Kanälen sein. Eine solche Blockade führt ebenfalls zu einem negativ inotropen Effekt. Es konnte an isolierten Kardiomyozyten von Ratten gezeigt werden, daß Amitriptylin mit einem EC-50 Wert von 23,2  $\mu\text{M}$  kardiale L-Typ Calcium-Kanäle blockiert (Zahradník et al. 2008).

Es ist bereits beschrieben worden, daß Histamin zu einem positiv inotropen Effekt und der Verkürzung von kontraktile Parametern wie der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit, sowie der Anspannungs- und Erschlaffungszeit in den H<sub>2</sub>-TG-Mäusen führt (Gergs et al. 2019a, Binter 2020). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß Amitriptylin diese Effekte konzentrationsabhängig signifikant abschwächt mit Ausnahme der Erschlaffungszeit. Bei der Relaxationsgeschwindigkeit und der Anspannungszeit trat diese Verschiebung zu höheren Konzentrationen erst bei höheren Konzentrationen von Amitriptylin auf.

### 5.2.3 Menschliche Präparate

Im Sinne eines translationalen Forschungsansatzes wurden die Versuche an menschlichen Präparaten wiederholt und dabei beispielhaft die Kraftentwicklung untersucht, um die Auswirkungen auf die endogenen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren zu untersuchen. Über den positiv inotropen Effekt von Histamin am menschlichen Herzen wurde schon vielfach berichtet (Neumann et al. 2021). Aber die hier vorliegende Arbeit zeigt erstmals, daß dieser Effekt durch Amitriptylin abgeschwächt wird. Dies deckt sich mit den Ergebnissen an den isolierten Vorhofpräparaten von H<sub>2</sub>-TG und ist ein Beleg für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen und ein Zeichen für die Eignung unseres Maus-Modells.

Ein weiteres interessantes Ergebnis war, daß hohe Konzentrationen von Isoprenalin wie 100  $\mu\text{M}$  nötig gewesen sind, um in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Amitriptylin einen positiv inotropen

Effekt auszulösen. Dies deckt sich mit früheren Ergebnissen, welche beispielsweise an murinen Astrozyten eine Blockade von  $\beta$ -Adrenozeptoren durch Amitriptylin zeigten (Richardson und Hertz 1983). Weiterhin zeigte eine Studie an isolierten Herzen von Ratten, daß die von Amitriptylin ausgelöste QRS-Zeit-Verlängerung unter anderem über eine Blockade der  $\beta$ -Adrenozeptoren bewirkt wird (Akgun Arici et al. 2009).

#### 5.2.4 Western Blot-Ergebnisse

Der nach Amitriptylingabe verminderte Phosphorylierungszustand des Phospholambans zeigt an, daß die Abschwächung der Wirkung des Histamins durch Amitriptylin sehr wahrscheinlich auf einer Blockade des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors beruht. Durch die Bindung von Histamin an Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren wird die PKA aktiviert, welche PLB ausschließlich an Serin 16 phosphoryliert (Simmerman et al. 1986, Gergs et al. 2019a). Dies führt zu der erhöhten Konzentration von phosphoryliertem PLB bei den transgenen Tieren unter 10  $\mu$ M Histamin, welche bereits beschrieben wurde (Gergs et al. 2020). Die reduzierte Menge von phosphoryliertem PLB bei den mit Amitriptylin behandelten Präparaten zeigt, daß hier eventuell eine geringere Aktivität der PKA und somit eine Blockade des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor Signalweges vorliegt.

#### 5.3 Fazit

Zusammenfassend konnte in dieser hier vorgelegten Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, daß Amitriptylin einen antagonistischen Effekt an kardialen humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren entfaltet und somit eine Auswirkung auf die kontraktile Parameter hat, welche durch Stimulation dieses Rezeptors moduliert werden. Es wurde an isolierten Vorhofpräparaten von transgenen Tieren mit Überexpression des humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors eine konzentrationsabhängige Verschiebung der Histamin-Konzentrationswirkungskurve zu höheren Konzentrationen durch Amitriptylin nachgewiesen. Bei den Wildtypmäusen, welche als Kontrollgruppe dienten, konnte aufgrund fehlender funktioneller Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren keine Verschiebung der Kurve zu höheren Konzentrationen beobachtet werden. Jedoch zeigte Amitriptylin in dieser Gruppe, wie auch bei den transgenen Tieren, einen geringen negativ inotropen Effekt. Auch zeigte sich eine zunehmende Rate an Arrhythmien unter höheren Amitriptylin Konzentrationen, was den proarrhythmischen Effekt dieses Pharmakons unterstreicht. Aufgrund dieser gesteigerten Rate an Arrhythmien war es nicht möglich die

Herzfrequenz unter 10  $\mu\text{M}$  Amitriptylin zu untersuchen. Durch eine Analyse der Phosphorylierung des Phospholambans an Serin 16 wurde nachgewiesen, daß die gemessenen Veränderungen über den Histamin- $\text{H}_2$ -Rezeptor vermittelt werden. Der reduzierte Anteil an phosphoryliertem Phospholamban unter Amitriptylin im Vergleich zu einer reinen Histamin Gabe zeigt, daß die Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven zu höheren Konzentrationen auf eine Blockade des Histamin- $\text{H}_2$ -Rezeptors zurückzuführen ist.

#### 5.4 Klinische Bedeutung und Ausblick

Die Präparate der rechten Vorhöfe zeigten zunehmend Arrhythmien mit steigenden Konzentrationen von Amitriptylin. Dies ist eine wichtige Nebenwirkung des Medikaments im klinischen Alltag und schlägt sich nieder in der Empfehlung dieses Pharmakon nicht mit anderen Medikamenten zu kombinieren, welche ebenfalls eine Verlängerung des QT-Intervalls provozieren. Es wurde in diesem Zusammenhang auch schon auf das häufigere Auftreten von Arrhythmien bei der Kombination von Amitriptylin mit dem  $\text{H}_2$ -Antihistaminikum Cimetidin hingewiesen (Curry et al. 1985). Diese Arbeit zeigt, daß Amitriptylin selbst nun in die Klasse der Antihistaminika gezählt werden sollte.

Auch konnte der negativ inotrope Effekt von Amitriptylin in dieser Arbeit reproduziert werden. Diese unerwünschte Wirkung stellt besonders für Patienten mit einer höhergradigen Herzinsuffizienz eine Gefahr dar und muss beim Einsatz dieses Medikaments beachtet werden, besonders in einer Kombination mit anderen ebenfalls negativ inotropen Substanzen. Besonders in Bezug auf  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten sollte berücksichtigt werden, daß die kombinierte Blockade von  $\beta$ -Adrenozeptoren und Histamin- $\text{H}_2$ -Rezeptoren eine Hemmung derselben intrazellulären Signalkaskade verursacht und somit synergistisch wirken kann. In diesem Zusammenhang sei auch noch die interessante Beobachtung erwähnt, daß unter 10  $\mu\text{M}$  Amitriptylin eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Isoprenalin an humanen Proben nötig war, um einen positiv inotropen Effekt auszulösen. Die klinische Relevanz dieser Entdeckung ist aktuell noch spekulativ und bietet einen möglichen Ansatz für zukünftige klinische Untersuchungen.

Ein Nachteil des Amitriptylins liegt darin, daß es öfters auch in suizidaler Absicht überdosiert eingenommen wird (Henry 1997). Die Studienlage bezüglich toxischer Konzentrationen von Amitriptylin ist zum jetzigen Zeitpunkt noch schwach, jedoch zeigte eine Analyse von suizidalen Patienten in Finnland bezüglich der Plasmakonzentration von Amitriptylin einen Median von 12,6  $\mu\text{M}$  (Koski et al. 2005). Somit haben die Ergebnisse dieser Arbeit durchaus toxikologische

Relevanz. Die höchste therapeutische Dosierung von Amitriptylin bei psychiatrischen Patienten unterscheidet sich mit 637 nM nicht groß von der hier getesteten Dosierung von 1  $\mu$ M (Baumann et al. 2004). Somit sollten geringe Effekte der Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor Blockade, welche diese Arbeit untersucht, auch bei sachgerechter Dosierung auftreten (Kerr et al. 2001). Die Metabolisierung von Amitriptylin läuft vorwiegend in der Leber mittels CYP2D6 ab, jedoch spielen auch andere Cytochrom P450 Enzyme bei dem Abbau eine Rolle. Zu nennen sind hier noch CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 und CYP3A5 (Samer et al. 2013). Medikamente, welche den Abbau von Amitriptylin beeinträchtigen, beispielsweise durch Konkurrenz um CYP2D6, könnten somit selbst bei niedriger Dosierung von Amitriptylin eine Intoxikation verursachen (Forget et al. 2008). Des Weiteren kann es auch zu solchen Intoxikationen aufgrund genetischer Polymorphismen bei den Cytochrom P450 Enzymen mit unterschiedlichen Metabolisierungsaktivitäten kommen (Hiemke et al. 2018).

## 6 Zusammenfassung

Bei Histamin handelt es sich um ein Monoamin, welches fast ubiquitär im Säugetier-Körper vorkommt. Histamin wirkt nach heutigem Kenntnisstand über vier Rezeptoren: die Histamin-Rezeptoren-H<sub>1-4</sub>. Es nimmt auch entscheidenden Einfluss auf kardiale Parameter wie Inotropie und Chronotropie. Amitriptylin ist ein trizyklisches Antidepressivum, welches seine antidepressive Wirkung primär über die Wiederaufnahmehemmung von Serotonin und teilweise auch Noradrenalin im synaptischen Spalt entfalten soll. Es bindet auch an viele andere Rezeptoren, unter anderem an den Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor. Diese Arbeit untersucht, inwiefern sich diese Blockade des Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors auf die kontraktile Parameter von Vorhofpräparaten auswirkt. Dazu wurden transgene Mäuse mit Überexpression des humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptors verwendet. Wildtyp-Mäuse ohne Expression funktioneller kardialer Histaminrezeptoren dienten als Kontrollgruppe. An isolierten spontan schlagenden rechten und elektrisch stimulierten linken Vorhofpräparationen wurde eine Histamin-Konzentrationswirkungskurve von 10 nM bis 10 µM durchgeführt. Bei den transgenen Tieren zeigte sich darunter eine Zunahme der Herzfrequenz, Kraftentwicklung, Kraftanstiegs- und Relaxationsgeschwindigkeit, sowie eine Abnahme der Anspannungs- und Erschlaffungszeit. Daraufhin wurde das Histamin aus den Organbädern ausgewaschen und 1 µM, 3 µM beziehungsweise 10 µM Amitriptylin wurden hinzugegeben. Nach einer Phase der Äquibilierung wurde die Histamin-Konzentrationswirkungskurve wiederholt. In diesen Versuchen konnte eine konzentrationsabhängige Verschiebung der Kurven durch Amitriptylin zu höheren Konzentrationen von Histamin anhand der EC<sub>50</sub>-Werte bei den kontraktile Parametern gezeigt werden. Die ausgeprägte proarrhythmische Wirkung von Amitriptylin führte unter 10 µM zu persistierenden Arrhythmien oder Asystolien bei sämtlichen rechten Vorhofpräparaten, womit eine Analyse der Herzfrequenz unter diesen Bedingungen nicht möglich war. Der Versuch wurde an humanen Präparaten unter 10 µM Amitriptylin wiederholt und die Kraftentwicklung wurde analysiert, um die Translation der Ergebnisse auf den Menschen zu überprüfen. Hier zeigte sich ebenfalls eine Abschwächung der Kraftentwicklung unter Amitriptylin.

Es wurde ferner der Phosphorylierungszustand des Phospholambans an seiner 16. Aminosäure, und zwar Serin, mittels eines spezifischen Antikörpers im Western Blot analysiert. Es wurden Proben von Wildtyp-Mäusen verglichen mit transgenen Präparaten unter 10 µM Histamin und unter 10 µM Histamin plus 10 µM Amitriptylin. Es zeigte sich bei den transgenen Tieren eine deutliche Histamin-bedingte Zunahme der Phosphorylierung des Phospholambans auf Serin 16, welche unter 10 µM Amitriptylin abgeschwächt wurde. Somit konnte gezeigt

werden, daß die gemessenen Veränderungen der kontraktilen Parameter intrazellulär auch über Phospholamban-Phosphorylierung vermittelt wurden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, daß Amitriptylin als Antagonist an kardialen humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptoren wirkt und darüber konzentrationsabhängig die kontraktilen Muskel-Parameter beeinflusst, welche durch Stimulation dieses Rezeptors moduliert werden.

Amitriptylin wird auch in suizidaler Absicht von Patienten überdosiert. Dabei werden Plasmakonzentrationen erreicht, welche den hier untersuchten Werten entsprechen oder sie sogar übertreffen. Weiterhin wird es in der Leber primär über CYP2D6 abgebaut und es gibt zahlreiche Pharmaka im klinischen Alltag, welche als Substrat um dieses Enzym konkurrieren. Somit kann es durch eine Hemmung des Abbaus von Amitriptylin bereits unter therapeutischen Dosierungen zu den in dieser Arbeit gefundenen und toxikologisch relevanten Effekten auf das Herz des Menschen kommen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ackermann D. (1910). Über den bakteriellen Abbau des Histidins. Hoppe-Seyler's Z. für physiologische Chem. 65, 504–510. 10.1515/bchm2.1910.65.5-6.504
- Agata N, Kato Y, Namekata I, Takahara A, Tanaka H, Chino D, Koike K, Tanaka Y. H<sub>2</sub>receptor-mediated positive inotropic effect of histamine in neonatal guinea-pig left atria. Biol Pharm Bull. 2010;33(12):2033-5. doi: 10.1248/bpb.33.2033. PMID: 21139247.
- Angus JA, Black JW. Pharmacological assay of cardiac H<sub>2</sub>-receptor blockade by amitriptyline and lysergic acid diethylamide. Circ Res. 1980 Jun;46(6 Pt 2):I64-9. PMID: 6103762.
- Akgun Arici MA, Kalkan S, Demir O, Hocaoglu Aksay N, Gidener S, Tuncok Y. Does adenosine A(1) receptor stimulation causes QRS prolongation by blocking beta adrenergic receptors in amitriptyline poisoning? Toxicol Lett. 2009 Apr 25;186(2):130-8. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.01.015. Epub 2009 Jan 20. PMID: 19429234.
- Appl H, Holzammer T, Dove S, Haen E, Strasser A, Seifert R. Interactions of recombinant human histamine H<sub>1</sub>R, H<sub>2</sub>R, H<sub>3</sub>R, and H<sub>4</sub>R receptors with 34 antidepressants and antipsychotics. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2012 Feb;385(2):145-70. doi: 10.1007/s00210-011-0704-0. Epub 2011 Oct 28. PMID: 22033803.
- Ash AS, Schild HO. Receptors mediating some actions of histamine. 1966. Br J Pharmacol. 1997 Feb;120(4 Suppl):302-14, discussion 300-1. doi: 10.1111/j.1476-5381.1997.tb06811.x. PMID: 9142412; PMCID: PMC3224306
- Badger-Emeka LI, Emeka PM, Thirugnanasambantham K, Ibrahim HIM. Anti-Allergic Potential of Cinnamaldehyde via the Inhibitory Effect of Histidine Decarboxylase (HDC) Producing Klebsiella pneumonia. Molecules. 2020;25(23):5580. Published 2020 Nov 27. doi:10.3390/molecules25235580
- Barbui C, Hotopf M. Amitriptyline v. the rest: still the leading antidepressant after 40 years of randomised controlled trials. Br J Psychiatry. 2001 Feb;178:129-44. doi: 10.1192/bjp.178.2.129. PMID: 11157426.
- Baumann P, Hiemke C, Ulrich S, Eckermann G, Gaertner I, Gerlach M, Kuss HJ, Laux G, Müller-Oerlinghausen B, Rao ML, Riederer P, Zernig G; Arbeitsgemeinschaft für neuropsychopharmakologie und pharmakopsychiatrie. The AGNP-TDM expert group consensus guidelines: therapeutic drug monitoring in psychiatry. Pharmacopsychiatry. 2004 Nov;37(6):243-65. doi: 10.1055/s-2004-832687. PMID: 15551191.
- Bertolotti A. The split protein phosphatase system. Biochem J. 2018 Dec 6;475(23):3707-3723. doi: 10.1042/BCJ20170726. PMID: 30523060; PMCID: PMC6282683.
- Black JW, Duncan WA, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM. Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-receptors. Nature. 1972 Apr 21;236(5347):385-90. doi: 10.1038/236385a0. PMID: 4401751.
- Bodmer S, Imark C, Kneubühl M. Biogenic amines in foods: histamine and food processing. Inflamm Res. 1999 Jun;48(6):296-300. doi: 10.1007/s000110050463. PMID: 10442480.
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. N Engl J Med. 1982 Jul 22;307(4):205-11. doi: 10.1056/NEJM198207223070401. PMID: 6283349.

- Brodde OE, Broede A, Daul A, Kunde K, Michel MC. Receptor systems in the non-failing human heart. *Basic Res Cardiol*. 1992;87 Suppl 1:1-14. doi: 10.1007/978-3-642-72474-9\_1. PMID: 1353955.
- Brahmi N, Thabet H, Kouraichi N, Driss I, Amamou M. Syndrome de Brugada et autres anomalies cardiovasculaires associées à l'intoxication par les antidépresseurs tricycliques et apparentés [Brugada syndrome and other cardiovascular abnormalities related to tricyclic antidepressants and related drugs intoxication]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2007 Jan;100(1):28-33. French. PMID: 17405551.
- Campleman SL, Brent J, Pizon AF, Shulman J, Wax P, Manini AF; Toxicology Investigators' Consortium (Toxic). Drug-specific risk of severe QT prolongation following acute drug overdose. *Clin Toxicol (Phila)*. 2020 Dec;58(12):1326-1334. doi: 10.1080/15563650.2020.1746330. Epub 2020 Apr 7. PMID: 32252558; PMCID: PMC7541562.
- Comas-Basté O, Sánchez-Pérez S, Veciana-Nogués MT, Latorre-Moratalla M, Vidal-Carou MDC. Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biomolecules*. 2020 Aug 14;10(8):1181. doi: 10.3390/biom10081181. PMID: 32824107; PMCID: PMC7463562.
- Curry SH, DeVane CL, Wolfe MM. Cimetidine interaction with amitriptyline. *Eur J Clin Pharmacol*. 1985;29(4):429-33. doi: 10.1007/BF00613457. PMID: 3912187.
- Dale HH, Laidlaw PP. The physiological action of beta-aminazolyethylamine. *J Physiol*. 1910 Dec 31;41(5):318-44. doi: 0.1113/jphysiol.1910.sp001406. PMID: 16993030; PMCID: PMC1512903.
- Dale HH, Laidlaw PP. Further observations on the action of beta-aminazolyethylamine. *J Physiol*. 1911 Oct 20;43(2):182-95. doi: 10.1113/jphysiol.1911.sp001464. PMID: 16993089; PMCID: PMC1512691.
- Dick IE, Brochu RM, Purohit Y, Kaczorowski GJ, Martin WJ, Priest BT. Sodium channel blockade may contribute to the analgesic efficacy of antidepressants. *J Pain*. 2007 Apr;8(4):315-24. doi: 10.1016/j.jpain.2006.10.001. Epub 2006 Dec 15. PMID: 17175203.
- Di Pietro ME, Ferro M, Mele A. Inclusion complexes of tricyclic drugs and  $\beta$ -cyclodextrin: Inherent chirality and dynamic behaviour. *Int J Pharm*. 2020 Oct 15;588:119775. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119775. Epub 2020 Aug 15. PMID: 32805385.
- Druid H, Holmgren P. A compilation of fatal and control concentrations of drugs in postmortem femoral blood. *J Forensic Sci*. 1997 Jan;42(1):79-87. PMID: 8988577.
- Feng C, Teuber S, Gershwin ME. Histamine (Scombroid) Fish Poisoning: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016 Feb;50(1):64-9. doi: 10.1007/s12016-015-8467-x. PMID: 25876709.
- Forget P, le Polain de Waroux B, Wallemacq P, Gala JL. Life-threatening dextromethorphan intoxication associated with interaction with amitriptyline in a poor CYP2D6 metabolizer: a single case re-exposure study. *J Pain Symptom Manage*. 2008 Jul;36(1):92-6. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2007.09.006. Epub 2008 Mar 21. PMID: 18359183.
- Gergs U, Kirchhefer U, Bergmann F, Künstler B, Mißlinger N, Au B, Mahnkopf M, Wache H, Neumann J. Characterization of Stressed Transgenic Mice Overexpressing H2-

- Histamine Receptors in the Heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 2020 Sep;374(3):479-488. doi: 10.1124/jpet.120.000063. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32561687.
- Gergs U a), Bernhardt G, Buchwalow IB, Edler H, Fröba J, Keller M, Kirchhefer U, Köhler F, Mißlinger N, Wache H, Neumann J. Initial Characterization of Transgenic Mice Overexpressing Human Histamine H2 Receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019 Apr;369(1):129-141. doi: 10.1124/jpet.118.255711. Epub 2019 Feb 6. PMID: 30728249.
- Gergs U b), Trapp T, Bushnaq H, Simm A, Silber RE, Neumann J. Age-Dependent Protein Expression of Serine/Threonine Phosphatases and Their Inhibitors in the Human Cardiac Atrium. *Adv Med.* 2019 Jan 2;2019:2675972. doi: 10.1155/2019/2675972. PMID: 30719459; PMCID: PMC6334353.
- Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, Hanske G, Schmitz W, Neumann J. Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J Biol Chem.* 2004 Sep 24;279(39):40827-34. doi: 10.1074/jbc.M405770200. Epub 2004 Jul 6. PMID: 15247211.
- Gludovacz E, Maresch D, Lopes de Carvalho L, Puxbaum V, Baier LJ, Sützl L, Guédez G, Grünwald-Gruber C, Ulm B, Pils S, Ristl R, Altmann F, Jilma B, Salminen TA, Borth N, Boehm T. Oligomannosidic glycans at Asn-110 are essential for secretion of human diamine oxidase. *J Biol Chem.* 2018 Jan 19;293(3):1070-1087. doi: 10.1074/jbc.M117.814244. Epub 2017 Nov 29. PMID: 29187599; PMCID: PMC5777248.
- Goutelle S, Maurin M, Rougier F, Barbaut X, Bourguignon L, Ducher M, Maire P. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008 Dec;22(6):633-48. doi: 10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x. PMID: 19049668.
- Green JP, Maayani S. Tricyclic antidepressant drugs block histamine H2 receptor in brain. *Nature.* 1977 Sep 8;269(5624):163-5. doi: 10.1038/269163a0. PMID: 20581.
- Haghighi K, Bidwell P, Kranias EG. Phospholamban interactome in cardiac contractility and survival: A new vision of an old friend. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Dec;77:160-7. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.10.005. Epub 2014 Oct 18. PMID: 25451386; PMCID: PMC4312245.
- Heijman J, Dewenter M, El-Armouche A, Dobrev D. Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Nov;64:90-8. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.09.006. Epub 2013 Sep 16. PMID: 24051368.
- Hattori Y, Gando S, Nagashima M, Kanno M. Histamine receptors mediating a positive inotropic effect in guinea pig and rabbit ventricular myocardium: distribution of the receptors and their possible intracellular coupling processes. *Jpn J Pharmacol.* 1994 Aug;65(4):327-36. doi: 10.1254/jjp.65.327. PMID: 7990270.
- Hattori Y, Nakaya H, Endou M, Kanno M. Inotropic, electrophysiological and biochemical responses to histamine in rabbit papillary muscles: evidence for coexistence of H1- and H2-receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990 Apr;253(1):250-6. PMID: 2158545.
- Hattori Y, Sakuma I, Kanno M. Differential effects of histamine mediated by histamine H1- and H2-receptors on contractility, spontaneous rate and cyclic nucleotides in the rabbit heart. *Eur J Pharmacol.* 1988 Aug 24;153(2-3):221-9. doi: 10.1016/0014-2999(88)90609-7. PMID: 2846318.

- Henry JA. Epidemiology and relative toxicity of antidepressant drugs in overdose. *Drug Saf.* 1997 Jun;16(6):374-90. doi: 10.2165/00002018-199716060-00004. PMID: 9241492.
- Herzig S, Neumann J. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev.* 2000 Jan;80(1):173-210. doi: 10.1152/physrev.2000.80.1.173. PMID: 10617768.
- Hescheler J, Tang M, Jastorff B, Trautwein W. On the mechanism of histamine induced enhancement of the cardiac Ca<sup>2+</sup> current. *Pflugers Arch.* 1987 Sep;410(1-2):23-9. doi: 10.1007/BF00581891. PMID: 2446249.
- Hicks JK, Sangkuhl K, Swen JJ, Ellingrod VL, Müller DJ, Shimoda K, Bishop JR, Kharasch ED, Skaar TC, Gaedigk A, Dunnenberger HM, Klein TE, Caudle KE, Stingl JC. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline (CPIC) for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants: 2016 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2017 Jul;102(1):37-44. doi: 10.1002/cpt.597. Epub 2017 Feb 13. PMID: 27997040; PMCID: PMC5478479.
- Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, Conca A, Deckert J, Domschke K, Eckermann G, Egberts K, Gerlach M, Greiner C, Gründer G, Haen E, Havemann-Reinecke U, Hefner G, Helmer R, Janssen G, Jaquenoud E, Laux G, Messer T, Mössner R, Müller MJ, Paulzen M, Pfuhlmann B, Riederer P, Saria A, Schoppek B, Schoretsanitis G, Schwarz M, Gracia MS, Stegmann B, Steimer W, Stingl JC, Uhr M, Ulrich S, Unterecker S, Waschgl R, Zernig G, Zurek G, Baumann P. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry.* 2018 Jan;51(1-02):9-62. doi: 10.1055/s-0043-116492. Epub 2017 Sep 14. Erratum in: *Pharmacopsychiatry.* 2018 Jan;51(1-02):e1. PMID: 28910830.
- Hughes MJ, Coret IA. Effects of tricyclic compounds on the histamine response of isolated atria. *J Pharmacol Exp Ther.* 1974 Nov;191(2):252-61. PMID: 4418735.
- Jutel M, Akdis M, Akdis CA. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy.* 2009 Dec;39(12):1786-800. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03374.x. PMID: 20085595.
- Kachur JF, Allbee WE, Gagarella TS. Antihistaminic and antimuscarinic effects of amitriptyline on guinea pig ileal electrolyte transport and muscle contractility in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988 May;245(2):455-9. PMID: 2896792.
- Kerr GW, McGuffie AC, Wilkie S. Tricyclic antidepressant overdose: a review. *Emerg Med J.* 2001 Jul;18(4):236-41. doi: 10.1136/emj.18.4.236. PMID: 11435353; PMCID: PMC1725608.
- King LA. Synergistic effect of benzodiazepines in fatal amitriptyline poisonings. *Lancet.* 1982 Oct 30;2(8305):982-3. doi: 10.1016/s0140-6736(82)90177-5. PMID: 6127477.
- Koh A, Pak KC, Choi HY, Ryu S, Choi SE, Kim KS, Bae KS, Lim HS. Quantitative Modeling Analysis Demonstrates the Impact of CYP2C19 and CYP2D6 Genetic Polymorphisms on the Pharmacokinetics of Amitriptyline and Its Metabolite, Nortriptyline. *J Clin Pharmacol.* 2019 Apr;59(4):532-540. doi: 10.1002/jcph.1344. Epub 2018 Nov 19. PMID: 30452773.
- Kondratenko SN, Savelyeva MI, Kukes VG, Shikh EV, Gneushev ET. Experimental and Clinical Pharmacokinetics of Fluoxetine and Amitriptyline: Comparative Analysis and Possible Methods of Extrapolation. *Bull Exp Biol Med.* 2019 Jul;167(3):356-362. doi: 10.1007/s10517-019-04526-9. Epub 2019 Jul 26. PMID: 31346879.

- Kornhuber J, Muehlbacher M, Trapp S, Pechmann S, Friedl A, Reichel M, Mühle C, Terfloth L, Groemer TW, Spitzer GM, Liedl KR, Gulbins E, Tripal P. Identification of novel functional inhibitors of acid sphingomyelinase. *PLoS One*. 2011;6(8):e23852. doi: 10.1371/journal.pone.0023852. Epub 2011 Aug 31. PMID: 21909365; PMCID: PMC3166082.
- Kovacova-Hanusikova E, Buday T, Gavliakova S, Plevkova J. Histamine, histamine intoxication and intolerance. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2015 Sep-Oct;43(5):498-506. doi: 10.1016/j.aller.2015.05.001. Epub 2015 Aug 1. PMID: 26242570.
- Koski A, Vuori E, Ojanperä I. Relation of postmortem blood alcohol and drug concentrations in fatal poisonings involving amitriptyline, propoxyphene and promazine. *Hum Exp Toxicol*. 2005 Aug;24(8):389-96. doi: 10.1191/0960327105ht542oa. PMID: 16138729.
- Kuefner MA, Feurle J, Petersen J, Uder M, Schwelberger HG. Influence of iodinated contrast media on the activities of histamine inactivating enzymes diamine oxidase and histamine N-methyltransferase in vitro. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2014 Jul-Aug;42(4):324-8. doi: 10.1016/j.aller.2013.01.002. Epub 2013 Apr 8. PMID: 23578781.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75. PMID: 14907713.
- Maintz L, Novak N. Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr*. 2007 May;85(5):1185-96. doi: 10.1093/ajcn/85.5.1185. PMID: 17490952.
- Matthaei J, Brockmöller J, Steimer W, Pischke K, Leucht S, Kullmann M, Jensen O, Ouethy T, Tzvetkov MV, Rafehi M. Effects of Genetic Polymorphism in CYP2D6, CYP2C19, and the Organic Cation Transporter OCT1 on Amitriptyline Pharmacokinetics in Healthy Volunteers and Depressive Disorder Patients. *Front Pharmacol*. 2021 May 21;12:688950. doi: 10.3389/fphar.2021.688950. PMID: 34093211; PMCID: PMC8175851.
- Matsuda N, Jesmin S, Takahashi Y, Hatta E, Kobayashi M, Matsuyama K, Kawakami N, Sakuma I, Gando S, Fukui H, Hattori Y, Levi R. Histamine H1 and H2 receptor gene and protein levels are differentially expressed in the hearts of rodents and humans. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 May;309(2):786-95. doi: 10.1124/jpet.103.063065. Epub 2004 Jan 29. PMID: 14752062.
- McClure EW, Daniels RN. Classics in Chemical Neuroscience: Amitriptyline. *ACS Chem Neurosci*. 2021 Feb 3;12(3):354-362. doi: 10.1021/acscchemneuro.0c00467. Epub 2021 Jan 13. PMID: 33438398.
- Melin V, Salgado P, Thiam A, Henríquez A, Mansilla HD, Yáñez J, Salazar C. Study of degradation of amitriptyline antidepressant by different electrochemical advanced oxidation processes. *Chemosphere*. 2021 Jul;274:129683. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129683. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33540303.
- Naila A, Flint S, Fletcher G, Bremer P, Meerdink G. Control of biogenic amines in food—existing and emerging approaches. *J Food Sci*. 2010 Sep;75(7):R139-50. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. PMID: 21535566; PMCID: PMC2995314.
- Neumann J, Grobe JM, Weisgut J, Schwelberger HG, Fogel WA, Marušáková M, Wache H, Bähre H, Buchwalow IB, Dhein S, Hofmann B, Kirchhefer U, Gergs U. Histamine can be Formed and Degraded in the Human and Mouse Heart. *Front Pharmacol*. 2021 May 11;12:582916. doi: 10.3389/fphar.2021.582916. PMID: 34045955; PMCID: PMC8144513.

- Nicholson GM, Blanche T, Mansfield K, Tran Y. Differential blockade of neuronal voltage-gated Na(+) and K(+) channels by antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol.* 2002 Sep 27;452(1):35-48. doi: 10.1016/s0014-2999(02)02239-2. PMID: 12323383.
- Oravec K, Kormos A, Gruber A, Márton Z, Kohajda Z, Mirzaei L, Jost N, Levijoki J, Pollesello P, Koskelainen T, Otsomaa L, Tóth A, Papp JG, Nánási PP, Antoons G, Varró A, Acsai K, Nagy N. Inotropic effect of NCX inhibition depends on the relative activity of the reverse NCX assessed by a novel inhibitor ORM-10962 on canine ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol.* 2018 Jan 5;818:278-286. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.10.039. Epub 2017 Oct 21. PMID: 29066415.
- Owens MJ, Morgan WN, Plott SJ, Nemeroff CB. Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 Dec;283(3):1305-22. PMID: 9400006.
- Parsons ME, Ganellin CR. Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147 Suppl 1(Suppl 1):S127-35. doi: 10.1038/sj.bjp.0706440. PMID: 16402096; PMCID: PMC1760721.
- Punke MA, Friederich P. Amitriptyline is a potent blocker of human Kv1.1 and Kv7.2/7.3 channels. *Anesth Analg.* 2007 May;104(5):1256-64, tables of contents. doi: 10.1213/01.ane.0000260310.63117.a2. PMID: 17456683.
- Richardson JS, Hertz L. The effects of antidepressant drugs on adenylyl cyclase linked beta adrenergic binding sites on mouse astrocytes in primary cultures. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1983;7(4-6):675-80. doi: 10.1016/0278-5846(83)90044-1. PMID: 6320303.
- Richelson E. Pharmacology of antidepressants. *Mayo Clin Proc.* 2001 May;76(5):511-27. doi: 10.4065/76.5.511. PMID: 11357798.
- Rudorfer MV, Potter WZ. Metabolism of tricyclic antidepressants. *Cell Mol Neurobiol.* 1999 Jun;19(3):373-409. doi: 10.1023/a:1006949816036. PMID: 10319193.
- Sánchez C, Hyttel J. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell Mol Neurobiol.* 1999 Aug;19(4):467-89. doi: 10.1023/a:1006986824213. PMID: 10379421.
- Samer CF, Lorenzini KI, Rollason V, Daali Y, Desmeules JA. Applications of CYP450 testing in the clinical setting. *Mol Diagn Ther.* 2013 Jun;17(3):165-84. doi: 10.1007/s40291-013-0028-5. PMID: 23588782; PMCID: PMC3663206.
- Scherf-Clavel M, Zebner J, Hommers L, Deckert J, Menke A, Unterecker S. Nortriptyline serum concentration as a predictor for cardiac risk in amitriptyline-treated patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2020 Jan;76(1):73-80. doi: 10.1007/s00228-019-02766-2. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31641787.
- Schild HO. pA, a new scale for the measurement of drug antagonism. *Br J Pharmacol Chemother.* 1947 Sep;2(3):189-206. doi: 10.1111/j.1476-5381.1947.tb00336.x. PMID: 20258355; PMCID: PMC1509780.
- Schirone M, Visciano P, Tofalo R, Suzzi G. Histamine Food Poisoning. *Handb Exp Pharmacol.* 2017;241:217-235. doi: 10.1007/164\_2016\_54. PMID: 27752845.
- Schneider J, Patterson M, Jimenez XF. Beyond depression: Other uses for tricyclic antidepressants. *Cleve Clin J Med.* 2019 Dec;86(12):807-814. doi: 10.3949/ccjm.86a.19005. PMID: 31821138.

- Schwartz JC. The histamine H3 receptor: from discovery to clinical trials with pitolisant. *Br J Pharmacol.* 2011 Jun;163(4):713-21. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01286.x. PMID: 21615387; PMCID: PMC3111674.
- Schwelberger HG, Feurle J, Houen G. Mapping of the binding sites of human diamine oxidase (DAO) monoclonal antibodies. *Inflamm Res.* 2018 Mar;67(3):245-253. doi: 10.1007/s00011-017-1118-3. Epub 2017 Nov 21. PMID: 29164268; PMCID: PMC5807474.
- Simmerman HK, Collins JH, Theibert JL, Wegener AD, Jones LR. Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem.* 1986 Oct 5;261(28):13333-41. PMID: 3759968.
- Stanton T, Bolden-Watson C, Cusack B, Richelson E. Antagonism of the five cloned human muscarinic cholinergic receptors expressed in CHO-K1 cells by antidepressants and antihistaminics. *Biochem Pharmacol.* 1993 Jun 9;45(11):2352-4. doi: 10.1016/0006-2952(93)90211-e. PMID: 8100134.
- Stead AH, Moffat AC. A collection of therapeutic, toxic and fatal blood drug concentrations in man. *Hum Toxicol.* 1983 Jul;2(3):437-64. doi: 10.1177/096032718300200301. PMID: 6885090.
- Steinburg MI, Holland DR. Separate receptors mediating the positive inotropic and chronotropic effect of histamine in guinea-pig atria. *Eur J Pharmacol.* 1975 Nov;34(1):95-104. doi: 10.1016/0014-2999(75)90229-0. PMID: 12000.
- Teschemacher AG, Seward EP, Hancox JC, Witchel HJ. Inhibition of the current of heterologously expressed HERG potassium channels by imipramine and amitriptyline. *Br J Pharmacol.* 1999 Sep;128(2):479-85. doi: 10.1038/sj.bjp.0702800. PMID: 10510461; PMCID: PMC1571643.
- Thangam EB, Jemima EA, Singh H, Baig MS, Khan M, Mathias CB, Church MK, Saluja R. The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Front Immunol.* 2018 Aug 13;9:1873. doi: 10.3389/fimmu.2018.01873. PMID: 30150993; PMCID: PMC6099187.
- Toda M, Yamamoto M, Uneyama C, Morikawa K. [Histamine food poisonings in Japan and other countries]. *Kokuritsu Iyakuin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku.* 2009;(127):31-8. Japanese. PMID: 20306704.
- Tongsook C, Niederhauser J, Kronegger E, Straganz G, Macheroux P. Leucine 208 in human histamine N-methyltransferase emerges as a hotspot for protein stability rationalizing the role of the L208P variant in intellectual disability. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017 Jan;1863(1):188-199. doi: 10.1016/j.bbdis.2016.10.005. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27769936.
- Traiffort E, Pollard H, Moreau J, Ruat M, Schwartz JC, Martinez-Mir MI, Palacios JM. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of histamine H2 receptors in human brain identified with [<sup>125</sup>I]iodoaminopotentidine. *J Neurochem.* 1992 Jul;59(1):290-9. doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb08903.x. PMID: 1351926.
- Uno J, Obara K, Suzuki H, Miyatani S, Chino D, Yoshio T, Tanaka Y. Inhibitory Effects of Antidepressants on Acetylcholine-Induced Contractions in Isolated Guinea Pig Urinary Bladder Smooth Muscle. *Pharmacology.* 2017;99(1-2):89-98. doi: 10.1159/000452221. Epub 2016 Oct 22. PMID: 27771722.

- Wang Q, Michalak M. Calsequestrin. Structure, function, and evolution. *Cell Calcium*. 2020 Sep;90:102242. doi: 10.1016/j.ceca.2020.102242. Epub 2020 Jun 20. PMID: 32574906.
- Windaus, A., Vogt, W. Synthese des Imidazolyl-äthylamins. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 40. 1907 Jun; 3691-3695.
- Wu Q, Xu Y, Bao Y, Alvarez J, Gonzales ML. Tricyclic Antidepressant Use and Risk of Fractures: A Meta-Analysis of Cohort Studies through the Use of Both Frequentist and Bayesian Approaches. *J Clin Med*. 2020 Aug 10;9(8):2584. doi: 10.3390/jcm9082584. PMID: 32785030; PMCID: PMC7463510.
- Yoshikawa T, Nakamura T, Yanai K. Histamine N-Methyltransferase in the Brain. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 10;20(3):737. doi: 10.3390/ijms20030737. PMID: 30744146; PMCID: PMC6386932.
- Zahradník I, Minarovic I, Zahradníková A. Inhibition of the cardiac L-type calcium channel current by antidepressant drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Mar;324(3):977-84. doi: 10.1124/jpet.107.132456. Epub 2007 Nov 29. PMID: 18048694.
- Zhai Y, Wu L, Zheng Y, Wu M, Huang Y, Huang Q, Shentu J, Zhao Q, Liu J. Bioequivalence Study of Amitriptyline Hydrochloride Tablets in Healthy Chinese Volunteers Under Fasting and Fed Conditions. *Drug Des Devel Ther*. 2020 Aug 4;14:3131-3142. doi: 10.2147/DDDT.S258173. PMID: 32801649; PMCID: PMC7414938.
- Živanović V, Seifert S, Drescher D, Schrade P, Werner S, Guttman P, Szekeres GP, Bachmann S, Schneider G, Arenz C, Kneipp J. Optical Nanosensing of Lipid Accumulation due to Enzyme Inhibition in Live Cells. *ACS Nano*. 2019 Aug 27;13(8):9363-9375. doi: 10.1021/acsnano.9b04001. Epub 2019 Jul 22. PMID: 31314989.

## Publikationen im Rahmen der Doktorarbeit

Neumann J, **Binter M**, Fehse C, Marusakova M, Kirchhefer U, Hofmann B, Gergs U (2021) Amitriptyline functionally antagonizes cardiac H2 histamine receptors in transgenic mice and human atria. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 394(6):1251-1262. doi: 10.1007/s00210-021-02065-7

**Binter M**, Gergs U, Neumann J (2020) Interaction of amitriptyline and histamine in the heart of H2 receptor transgenic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 393 (Suppl 1):S31

Neumann J, Schwarzer D, **Binter M**, Gergs U (2019) Interaction of H2-histamine and 5-HT4-serotonin receptors in the mammalian heart and effects of amitriptyline. *Inflamm Res* 68 (Suppl 1):S45

## 8 Thesen

1. Histamin bewirkt an Herzvorhöfen von Wildtypmäusen (WT) keine Veränderungen der kontraktile Parameter.
2. Histamin verursacht an transgenen Tieren (H<sub>2</sub>-TG) mit Überexpression des humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor eine Zunahme der Herzfrequenz, Kraftentwicklung, Kraftanstiegs- und Relaxationsgeschwindigkeit, sowie eine Abnahme der Anspannungs- und Erschlaffungszeit.
3. Amitriptylin bewirkt an H<sub>2</sub>-TG-Vorhöfen eine konzentrationsabhängige Verschiebung der Konzentrationswirkungskurven zu höheren Konzentrationen für die oben genannten kontraktile Parameter
4. Amitriptylin senkt den Anteil des an Serin-16 phosphorylierten Phospholambans
5. Amitriptylin bewirkt einen funktionell kompetitiv antagonistischen Effekt am humanen Histamin-H<sub>2</sub>-Rezeptor
6. Die abgeschwächte Histamin Wirkung durch Amitriptylin lässt sich auch an humanen, elektrisch gereizten Vorhofpräparaten nachweisen

## **9 Erklärungen**

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

(2) Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

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

(3) Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, daß ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Hannover, den 17.02.2022

## **10 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich zuallererst bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. Joachim Neumann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Halle-Wittenberg) bedanken für die Betreuung, Unterstützung und Förderung im Rahmen dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich sämtlichen MitarbeiterInnen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Halle-Wittenberg und in besonderem Maße Dr. Ulrich Gergs, Frau Pia Wilmy und Sonja Reber. Vielen Dank für die intensive Betreuung, den Hilfestellungen in sämtlichen Widrigkeiten des experimentellen Alltags und für eure Herzlichkeit.

Zum Ende möchte ich noch meiner Familie danken. Ihr habt mich bei allem seit jeher unterstützt und ohne euch hätte ich es nie soweit geschafft. Danke für Alles!