

Aus dem
Veterinär-Physiologischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Intestinale Mechanismen zum Schutz vor Histamin - bedingten Intoxikationen beim Schwein

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Vivica von Vietinghoff-Scheel
aus Urcos / Peru

Leipzig, 2007

Gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG): AS 131/1-1
und die H. Wilhelm Schaumann Stiftung

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. med. vet. habil. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. habil. Gotthold Gäbel

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. habil. Gotthold Gäbel
Veterinär-Physiologisches Institut
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Prof. Dr. med. vet. habil. Herbert Fuhrmann
Veterinär-Physiologisch-Chemisches Institut
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Ao. Univ.-Prof. Dr. techn. habil. Hubert G. Schwelberger
Klinische Abteilung für Allgemein- und Transplantationschirurgie
Labor für Theoretische Chirurgie
Universitätsklinik für Chirurgie, Innsbruck

Tag der Verteidigung: 12. Juni 2007

Inhaltsverzeichnis		Seite
1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Histamin	3
2.1.1	Bedeutung von Histamin im Säugetierorganismus	3
2.1.2	Vorkommen von Histamin.....	4
2.1.2.1	Endogener Ursprung	4
2.1.2.2	Exogener Ursprung.....	4
2.1.3	Bedeutung von Histamin beim Schwein	4
2.2	Protektive Mechanismen gegen Histaminintoxikationen	5
2.2.1	Histaminpermeation über das Dickdarmepithel	5
2.2.2	Cholinpermeation über das Dickdarmepithel	7
2.2.2.1	Bedeutung und Vorkommen von Cholin	7
2.2.2.2	Transport von Cholin über Zellmembranen	8
2.2.3	Histaminverstoffwechslung	9
2.2.3.1	Bedeutung der Histamin-N-Methyltransferase	9
2.2.3.2	Bedeutung der Diaminoxidase.....	10
2.2.4	Intraepitheliale Kompartimentierung der Histaminverstoffwechslung.....	12
2.2.4.1	Zelluläre Lokalisation der Histamin-N-Methyltransferase.....	12
2.2.4.2	Zelluläre Lokalisation der Diaminoxidase	13
2.3	Bedeutung der Literatur für die eigene Fragestellung	14
3	Material und Methoden	16
3.1	Versuche an isolierten porcinen Dickdarmepithelien	16
3.1.1	Tiere und Gewinnung der Dickdarmepithelien	16
3.1.2	Inkubation in der Ussingkammer	16
3.1.2.1	Isolierung der Epithelien des proximalen Kolons	16
3.1.2.2	Elektrophysiologische Parameter (I_{sc} , G_t)	18

3.1.2.3	Allgemeine Versuchsdurchführung	21
3.1.2.4	Spezielle Versuchsdurchführung	22
3.1.2.4.1	Organischer Kationentransport	22
3.1.2.4.2	Histaminverstoffwechslung	23
3.1.2.4.3	Intraepitheliale Kompartimentierung der Histaminverstoffwechslung.....	23
3.2	Analyseverfahren.....	25
3.2.1	Analyse von radioaktiven Tracern	25
3.2.1.1	Bestimmung von Tritium-markiertem Histamin und Cholin	25
3.2.1.2	Berechnung der Fluxraten aus den Radioaktivitätsmesswerten	25
3.2.2	HPLC-Analyse von Histamin und 1-Methylhistamin.....	27
3.2.2.1	Standards und Eichreihen	28
3.2.2.2	Chromatographische Trennbedingungen und Detektion	28
3.2.2.3	Verlaufskontrolle	29
3.2.2.4	Berechnung der Fluxrate aus den Werten der HPLC-Analyse	29
3.3	Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.....	30
4	Ergebnisse	32
4.1	Organischer Kationentransport über isolierte Dickdarmepithelien	32
4.1.1	Cholintransport in Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten	32
4.1.2	Hist-rad-Fluxraten in Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten.....	33
4.1.3	Einfluss vom organischen Kation MPP auf die Hist-rad-Fluxraten.....	33
4.2	Entwicklung einer HPLC-Methode für die Analyse von Histamin und 1-MH .	34
4.2.1	Modifizierung der HPLC-Methode von Saito et al. (1992).....	35
4.2.2	Validierung der HPLC-Methode	36
4.2.2.1	Spezifität.....	37
4.2.2.2	Linearität.....	37
4.2.2.3	Präzision und Genauigkeit.....	38
4.2.2.4	Quantifizierungsgrenze.....	40

4.3	Endogene Freisetzung von Histamin und 1-MH	40
4.4	Permeation von Histamin über isolierte Dickdarmepithelien	41
4.4.1	Histaminsekretion	41
4.4.2	Umfang der Histaminverstoffwechslung während der Permeation über isolierte Dickdarmepithelien	42
4.5	Verstoffwechslung von Histamin und daran beteiligte Enzyme	42
4.5.1	Einfluss von Amodiaquin und Aminoguanidin auf die endogene Freisetzung von Histamin und 1-MH	42
4.5.2	Einfluss von Amodiaquin und Aminoguanidin auf die Verstoffwechslung von exogenem Histamin	44
4.6	Intraepitheliale Kompartimentierung der Histaminverstoffwechslung	46
4.6.1	Einfluss von NEM auf die endogene Freisetzung von Histamin und 1-MH.....	47
4.6.2	Wirkung von NEM auf den Transport von Histamin und 1-MH	49
5	Diskussion	52
5.1	HPLC-Analyse	52
5.2	Organischer Kationentransport über isolierte Dickdarmepithelien	53
5.3	Histaminverstoffwechslung	54
5.3.1	Freisetzung und Verstoffwechslung von endogenem Histamin	54
5.3.2	Verstoffwechslung von exogenem Histamin	54
5.4	Serosale Appearance von 1-MH	57
5.5	Intraepitheliale Kompartimentierung der Histaminverstoffwechslung	59
5.6	Schlussfolgerungen	61
6	Zusammenfassung	63
7	Summary	65
8	Literaturverzeichnis	67
	Anlagen	77
	Danksagung	80

Abkürzungsverzeichnis

A	Epithelfläche, die für den Flux zur Verfügung steht
AD	Amodiaquin
AG	Aminoguanidin
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of Variance)
DAO	Diaminoxidase
Δt	Fluxdauer = $t_1 - t_0$
dpm_{P_0} , dpm_{P_1} , dpm_H	Zerfälle pro Minute (decays per minute) in den kalten Proben P_0 bzw. P_1 bzw. in der heißen Probe H
EC	Enzyme Code
ECL	enterochromaffin-ähnlich (enterochromaffine-like)
EE	Einspannen der Epithelien
EP	Paarung der Epithelien nach ihrer Gewebeleitfähigkeit
Eq	Equivalent (Einheit des Kurzschlussstroms); 1 Eq entspricht dem Strom von 1 mol einfach positiv geladenen Ionen
GIT	Gastrointestinaltrakt
G_t	Gewebeleitfähigkeit
H_0 , H_1	heiße Probe am Anfang bzw. Ende des Versuches
HDC	Histidindekarboxylase
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hist-rad	radioaktiv markiertes Histamin und seine radioaktiv markierten Metaboliten
HNMT	Histamin-N-Methyltransferase
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
I_{sc}	Kurzschlussstrom
J	Fluxrate
K_0 , K_1	Konzentration von Histamin bzw. 1-MH zum Zeitpunkt t_0 bzw. t_1

K_m	Michaelis-Menten-Konstante (Substratkonzentration, bei der es zur halbmaximalen Umsatzgeschwindigkeit eines Enzyms bzw. zum halbmaximalen Stofftransport kommt)
LM	Lebendmasse
LOQ	Quantifizierungsgrenze (limit of quantification)
M	mukosal
1-MH	1-Methylhistamin, Syn. <i>tele</i> -Methylhistamin; ein Abbauprodukt von Histamin
MPP	1-Methyl-4-phenylpyridinium
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	von mukosal nach serosal
n	Anzahl der Stichproben bei den Ussingkammerversuchen bzw. bei der Validierung der HPLC-Methode die Anzahl der Messungen je Konzentration
N	Anzahl der Versuchstiere für n Stichproben
NEM	N-Ethylmaleimid
OC	open circuit
OCT	Organischer Kationentransporter
OPA	<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd
P_0, P_1, P_2	1., 2. und 3. Probe von der kalten Versuchsseite
PC12	Phäochromozytomzelllinie 12 von Ratten
pDAO	porcine Diaminoxidase
PD_t	transepitheliale Potentialdifferenz
R	Zugabe der Radioaktivität
rad	radioaktiv markiert
S	serosal
S_H, S_{P_0}, S_{P_1}	absolute Substanzmenge in der heißen Probe H bzw. in der Probe P_0 zum Zeitpunkt t_0 bzw. in der Probe P_1 zum Zeitpunkt t_1
SC	short-circuit

SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of mean)
SM	von serosal nach mukosal
SNK	Student-Newman-Keuls-Test
s. S.	siehe Seite
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
U_0, U_1	absolute Substanzmenge in der kalten Ussingkammerhälfte zum Zeitpunkt t_0 bzw. t_1
V_A	Auffüllvolumen, dass nach P_0 zugegeben wurde, um den hydrostatischen Druck zwischen der mukosalen und der serosalen Ussingkammerhälfte gleichzuhalten
V_G	gesamtes Puffervolumen, das zu Anfang in der Ussingkammerhälfte vorhanden ist
V_{t_0}	Volumen in der kalten Ussingkammerhälfte nach der Probenahme P_0 zum Zeitpunkt t_0
V_{t_1}	Volumen in der kalten Ussingkammerhälfte vor der Probenahme P_1 zum Zeitpunkt t_1
V_{P_0}, V_{P_1}	Probenvolumen für die Radioaktivitätsmessung zum Zeitpunkt t_0 bzw. t_1
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
X_0, X_1	absolute Teilchenmenge in der Ussingkammerhälfte von Histamin bzw. 1-MH zum Zeitpunkt t_0 bzw. t_1
Z	Zugabe der entsprechenden Substanzen und/oder Hemmstoffe
ZNS	Zentrales Nervensystem
zw.	zwischen

1 Einleitung

Histamin ist ein biogenes Amin, das im Organismus sowohl physiologische als auch pathophysiologische Reaktionen auslösen kann.

Als parakriner Mediator kommt Histamin in den ECL-Zellen des Magens (HÅKANSON et al. 1986), den basophilen Granulozyten im Blut (O'DONNELL et al. 1983) und den Mastzellen, vor allem im Bindegewebe der Lunge, der Haut und des Magendarmtraktes (RILEY und WEST 1953) vor. In diesen verschiedenen Zellen wird Histamin durch das Enzym Histidindekarboxylase (HDC) synthetisiert (OHTSU und WATANABE 2003).

Histamin kann jedoch nicht nur vom Säugetierorganismus gebildet werden, sondern auch durch bakterielle Histidindekarboxylasen. Zur Histaminsynthese befähigte Bakterien können in Lebens- und Futtermitteln und auch im Darmchymus vorkommen (MARINO et al. 2000; EMBORG et al. 2005; SCHNEIDER et al. 1989).

Schweine sind in besonders hohem Maße mit zwei Quellen von Histamin konfrontiert. Einerseits mit dem endogenen Histamin, das sich in den Mastzellen der *Tela submucosa* des Magendarmtraktes befindet (RILEY und WEST 1953) und andererseits mit dem exogenen Histamin, das sich durch die bakterielle Synthese im Darmchymus anreichern kann (SCHNEIDER et al. 1989). Es entsteht ein enormes Konzentrationsgefälle von Histamin von ca. 100 μM im Darmlumen gegenüber Werten von < 100 nM im Blut (SCHNEIDER et al. 1989; SCHLUMBOHM et al. 1999).

Unter bestimmten pathologischen Bedingungen kann Histamin in signifikanten Größenordnungen vom Darmlumen auf die Blutseite gelangen (SATTLER et al. 1988). Daraufhin zeigen Schweine Schocksymptome, wie z. B. Hautrötung und Blutdruckabfall, die zum Tode führen können (SATTLER et al. 1988). Bei gesunden Schweinen hingegen bleiben solche Schocksymptome aus (SATTLER et al. 1988; SATTLER und LORENZ 1990). Es gibt indirekte Hinweise darauf, dass das Darmepithel dabei eine effiziente Barriere darstellt. Als Grundlage dieser Barriere ist zum Einen die Fähigkeit des Darmepithels annehmbar, durch seine hohe Dichtigkeit nur sehr wenig Histamin durchzulassen. Zum Anderen könnte das Darmepithel einmal übergetretenes Histamin wieder aktiv zurück ins Darmlumen transportieren und / oder verstoffwechseln.

Um sich die Barrierefunktion des Darmepithels zu verdeutlichen, sind zunächst einige grundsätzliche Betrachtungen notwendig.

Eine rein passive Diffusion von Histamin über Zellmembranen ist per se nur sehr eingeschränkt möglich. Histamin ist bei physiologischen pH-Werten ein positiv geladenes Molekül, ein organisches Kation, und daher schlecht membrangängig (GUTKNECHT und WALTER 1981). Die passive Diffusion von Histamin findet am Darmepithel daher vorzugsweise parazellulär statt (ASCHEBACH et al. 2002).

Neben der passiven Diffusion sind aber auch alternative Permeationswege möglich. So können organische Kationen, wie Histamin oder auch das in der Transportphysiologie häufig als Modellkation eingesetzte Cholin über spezifische Transportproteine die Zellbarriere überwinden (BUSCH et al. 1996; ARNDT et al. 2001). Es ist unbekannt, inwieweit das Dickdarmepithel vom Schwein in der Lage ist, organische Kationen zu transportieren.

Außer der Permeation sind katabole Vorgänge als Barrieremechanismen in Betracht zu ziehen. An der Verstoffwechslung und damit Entgiftung von Histamin sind vor allem zwei Enzyme beteiligt: zum Einen die Diaminoxidase (DAO) und zum Anderen die Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) (SESSA und PERIN 1994; BROWN et al. 1959). Dabei wird der DAO die entscheidendere Rolle zugesprochen (SATTLER et al. 1988; SATTLER und LORENZ 1990; NILSSON et al. 1996). Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass im Schweinecolon die HNMT das Schlüsselenzym bei der Histaminentgiftung ist. Allerdings konnte das bislang nur indirekt gezeigt werden (AHRENS et al. 2002; ASCHEBACH et al. 2002).

Ziel dieser Arbeit war es daher, mit Hilfe der Ussingkammer-Technik *in vitro* Untersuchungen am isolierten Epithel vom Schweinedickdarm durchzuführen, um den Transport von Histamin und Cholin über das Dickdarmepithel, die Verstoffwechslung von Histamin während seines Übertrittes über das Epithel und das Verbleiben von 1-Methylhistamin (1-MH, ein Histaminabbauprodukt), zu untersuchen. Für die genaue Untersuchung der Histaminverstoffwechslung war es nötig eine Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie-Methode zu entwickeln. Diese Methode sollte es dann ermöglichen sowohl Histamin als auch sein Abbauprodukt 1-MH in derselben Probe zu bestimmen.

2 Literaturübersicht

2.1 Histamin

2.1.1 Bedeutung von Histamin im Säugetierorganismus

Histamin ist ein biogenes Amin, das im Säugetierorganismus viele Funktionen erfüllt. Einige dieser Funktionen sollen hier kurz erwähnt werden.

Als Neurotransmitter ist Histamin an verschiedenen Regelkreisen im zentralen Nervensystem beteiligt. So wurde dem Histamin schon von COSTENTIN et al. (1973) eine Rolle in der Thermoregulation zugesprochen. Eine Erhöhung des Histamingehaltes im Gehirn durch intraventrikuläre Injektion von Histamin alleine oder zur Verstärkung zusammen mit Amodiaquin (ein Histamin-N-Methyltransferase Hemmstoff) führte zu einer Hypothermie bei Versuchsmäusen. Nicht nur die Thermoregulation wird durch Histamin beeinflusst, auch die Nahrungsaufnahme wird durch Histamin indirekt über die Freisetzung von Noradrenalin reguliert, wobei Histamin Appetit-reduzierend wirkt (KUROSE und TRASHIMA 1999).

Außerhalb des Nervensystems hat Histamin unter anderem im Gastrointestinaltrakt eine große Bedeutung. Dabei ist eine seiner wichtigsten Wirkungen die Stimulation der Salzsäuresekretion im Magen (LORENZ et al. 1971; BARTH et al. 1975; DIBONA et al. 1979; MÅRDH et al. 1985; LOISELLE und WOLLIN 1993). Doch nicht nur im Magen wirkt Histamin, sondern es beeinflusst auch den Ionentransport im Dünn- und Dickdarm (THØRBOLL und SKADHAUGE 1997; AHRENS et al. 2003).

Als Entzündungsmediator spielt Histamin bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen eine große Rolle. So sind einige Symptome bei allergischen Reaktionen u.a. darauf zurückzuführen, dass Histamin vasodilatierend und damit Blutdruck-senkend wirkt (DALE und LAIDLAW 1911; LORENZ et al. 1971; JIN et al. 2006).

2.1.2 Vorkommen von Histamin

2.1.2.1 Endogener Ursprung

Histamin wird vom Organismus selbst gebildet, indem die Histidindekarboxylase (HDC; EC 4.1.2.2) die Aminosäure Histidin zu Histamin umsetzt. OHTSU und WATANABE (2003) konnten zeigen, dass Histidindekarboxylasegen-Knockout-Mäuse einen sehr deutlich verminderten Histamingehalt in verschiedenen Organen hatten.

Das endogen gebildete Histamin kommt in verschiedenen Geweben und Zellen vor; z.B. in Mastzellen und basophilen Granulozyten (RILEY und WEST 1953; O'DONNELL 1983), in endokrinen Zellen des Magens und des Darmes (HÅKANSON et al. 1986) und in Neuronen im Nervensystem (PANULA et al. 1984; KUKKO-LUKJANOV und PANULA 2003). Histamin konnte sogar in der Tränenflüssigkeit von Menschen nachgewiesen werden (VENZA et al. 2004).

2.1.2.2 Exogener Ursprung

Histamin kann auch außerhalb des Tierkörpers gebildet werden; z. B. in Pflanzen (TASKILA et al. 2000). Weiterhin können viele Bakterien Histamin bilden. Dazu setzt die bakterielle Histidindekarboxylase Histidin zu Histamin um. Diese Umsetzung kann in Lebensmitteln, z. B. in Käse (MARINO et al. 2000), in Thunfischkonserven (EMBORG et al. 2005) oder in Futtermitteln, z. B. in der Silage, stattfinden. Ebenso können Bakterien, die im Chymus vorkommen, Histamin synthetisieren (SCHNEIDER et al. 1989). Dieses bakteriell gebildete Histamin kann zu massiven Problemen führen, wenn die Darmbarriere für Histamin durchlässig wird (SATTLER et al. 1988; SATTLER und LORENZ 1990).

2.1.3 Bedeutung von Histamin beim Schwein

Schweine beherbergen hohe Konzentrationen an Histamin in ihren eigenen Geweben, z. B. in der Darmwand (LORENZ et al. 1971). Dabei ist die Höhe der Histaminkonzentration altersabhängig. So nimmt die Histaminkonzentration in der Mukosa des proximalen Kolons im Verlauf des Älterwerdens bei adulten Schweinen (100-150 kg LM) im Vergleich zu jungen Schweinen (15-25 kg LM) ca. 5-fach zu (LORENZ et al. 1971).

Außer dem endogenen Histamin sind Schweine großen Mengen an luminalem Histamin ausgesetzt, die im Darminhalt gebildet werden (SCHNEIDER et al. 1989). Das Konzentrationsgefälle kann von ca. 100 µM im Darmlumen (SCHNEIDER et al. 1989) bis

hin zu einer Konzentration von < 100 nM im Blut reichen (SCHLUMBOHM et al. 1999). Würde das luminale Histamin auf die Blutseite gelangen, würden die Schweine massive klinische Symptome zeigen, die auf einen Schock hinweisen: Blutdruckabfall, Rötung der Haut, Erbrechen, Bronchospasmus (LORENZ et al. 1971; SATTLER et al. 1988; SATTLER und LORENZ 1990). Trotz des immensen Konzentrationsgradienten zeigen Schweine aber im Normalfall keine derartige Symptomatik (SATTLER et al. 1988; SATTLER und LORENZ 1990), was auf eine effektive Darmbarriere gegenüber exogenem Histamin hindeutet.

2.2 Protektive Mechanismen gegen Histaminintoxikationen

2.2.1 Histaminpermeation über das Dickdarmepithel

Die Histaminabsorption aus dem Dickdarm ins Blut wird durch die Strukturen des Darmepithels begrenzt. Dabei handelt es sich einerseits um die Zellmembranen der Darmepithelzellen und andererseits um die Abdichtung der Zellzwischenräume, die „Tight-junctions“.

Die Zellmembranen bestehen hauptsächlich aus Phospholipiden. Substanzen, die stark hydrophil sind, wie es auch beim Histamin der Fall ist, können nur schwerlich passiv über diese Phospholipiddoppelschicht diffundieren. Der Permeabilitätskoeffizient von künstlichen Zellmembranen für Histamin liegt bei $3,5 \times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$ (GUTKNECHT und WALTER 1981) und ist damit wesentlich niedriger als z. B. jener für Butyrat mit $9,5 \times 10^{-2} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$. Vom Butyrat wird angenommen, dass es vorwiegend passiv über Epithelien diffundiert (WALTER und GUTKNECHT 1986). So gesehen, stellen Zellmembranen eine effektive Barriere für eine Histaminabsorption dar.

Zellmembranen bestehen allerdings nicht nur aus Phospholipiden. Für den Transport hydrophiler Moleküle sind in die Phospholipidschicht Transportproteine eingebaut. Einige davon könnten Histamin transportieren (OGASAWARA et al. 2006). Je nach Transportertyp und Lokalisation in der Zellmembran würde dann Histamin eher über das Epithel absorbiert oder sezerniert werden. Die ersten Hinweise aus der Literatur über einen proteinvermittelten aktiven Transport von Histamin gibt es von Untersuchungen am Magen von verschiedenen Spezies. Anhand dieser Untersuchungen an Magenmukosazellen und Parietalzellen konnte gezeigt werden, dass Histamin aktiv (d.h. der Transport war sättigbar, Na^+ - und temperaturabhängig) in die Zellen aufgenommen wurde (ALBINUS und SEWING 1981; WOLLIN 1987, 1990; LOISELLE und WOLLIN

1993). Nach der Aufnahme in die Zellen zeigte sich, dass Histamin sowohl intakt ins Magenlumen, als auch als 1-Methylhistamin (1-MH), ein Abbauprodukt von Histamin, nach serosal abgegeben wurde (LOISELLE und WOLLIN 1993). Bezüglich der Abgabe von Histamin auf die luminal Seite gibt es ähnliche sekretorische Vorgänge in Speicheldrüsen (ERJAVEC und STANOVNIK 1987), im Pansen (ASCHENBACH et al. 2000), im Dünndarm (KNUTSON et al. 1990) und im Dickdarm (ASCHENBACH et al. 2002). Viele Transportproteine sind auf molekularer Ebene bekannt, vor allem die Organischen Kationentransporter (OCT's), welche elektrogen und mit hoher Kapazität die verschiedensten organischen Kationen einschließlich Histamin über Zellmembranen transportieren (BUSCH et al. 1996; RAJAN et al. 2000; OGASAWARA et al. 2006). Der OCT1 kommt vor allem in der Leber vor, aber auch in der Niere und im Darm (Übersicht in BURCKHARDT und WOLFF 2002). Der OCT2 wurde hauptsächlich in der Niere gefunden und beim Menschen in geringer Menge in der Milz und der Plazenta, im Darm und im Gehirn (Übersicht in BURCKHARDT und WOLFF 2002). Der OCT3 wurde überwiegend in der Plazenta gefunden, ist aber von den drei OCT's am weitesten im Körper verbreitet. So wurde der OCT3 im Darm, in der Niere, dem Herzen, im Gehirn und in der Retina nachgewiesen (RAJAN et al. 2000; Übersicht in BURCKHARDT und WOLFF 2002). Durch eine neuere Studie konnte immunhistochemisch die zelluläre Lokalisation des OCT1 und OCT3 nachgewiesen werden (MÜLLER et al. 2005). Der OCT3 soll im menschlichen Jejunum in der apikalen Zellmembran der Darmzotten lokalisiert sein, während der OCT1 auf der basolateralen Seite exprimiert wird (MÜLLER et al. 2005). Ein OCT6 wurde in hämatopoetischen Zellen des Menschen auf mRNA-Ebene gefunden; er konnte weder in der Plazenta, der Leber noch in der Niere nachgewiesen werden (GONG et al. 2002).

Weitere Transporter, die Histamin transportieren können, sind die vesikulären Monoamintransporter (VMAT1 und 2). VMAT1 kommt vor allem in chromaffinen Zellen der Nebenniere, den enterochromaffinen Zellen des Darmtraktes und den Merkelzellen vor. Der VMAT2 ist in den chromaffinen Zellen der Nebenniere, in Nervenzellen des zentralen, peripheren und intestinalen Nervensystems, in Megakaryozyten / Thrombozyten, in Enterochromaffin-ähnlichen (ECL) Zellen der Magenschleimhaut und in Mastzellen zu finden (Übersicht in WEIHE und EIDEN 2000). Dabei weist der VMAT2 eine etwa 30-fach höhere Affinität zum Histamin auf, als zum Serotonin oder zu Katecholaminen (ERICKSON et al. 1996). ENGEL und WANG (2005) konnten zeigen, dass Histamin auch von einem Plasmamembran-Monoamintransporter (PMAT, auch ENT4 genannt) transportiert wurde, allerdings scheint die Affinität mit einer K_m von 10,5 mM recht niedrig zu sein.

Der Permeation einer hydrophilen Substanz, wie es Histamin ist, setzen nicht nur die Zellmembranen eine Barriere entgegen, sondern auch die Zellzwischenräume mit den Tight-junctions. Allerdings sind die Zellzwischenräume mit negativen Ladungen von Carboxyl-, Phosphorsäure- oder Schwefelsäuregruppen ausgekleidet, so dass Kationen relativ gut durch die Zellzwischenräume gelangen können. Dieses Phänomen wurde als Kationenpermselectivität bezeichnet (POWELL 1981) und könnte aufgrund des vorhandenen Konzentrationsgefälles eine Absorption von Histamin unterstützen. Obwohl das Darmepithel des proximalen Kolons beim Schwein eine niedrige Leitfähigkeit besitzt (TRAYNOR und O'GRADY 1992), konnte gezeigt werden, dass Histamin zum Teil über den parazellulären Weg die Epithelseite wechselte (ASCHENBACH et al. 2002).

2.2.2 Cholinpermeation über das Dickdarmepithel

Cholin ist, ebenso wie Histamin, ein organisches Kation. Cholin wird häufig als Testsubstrat in Transportstudien von organischen Kationen eingesetzt (ARNDT et al. 2001; BUDIMAN et al. 2000). Um herauszufinden in wie weit das Dickdarmepithel in der Lage ist, neben Histamin auch andere organische Kationen zu transportieren, wurden in der vorliegenden Arbeit auch Fluxstudien mit Cholin durchgeführt. Daher sollen hier einige Charakteristika von Cholin dargelegt werden.

2.2.2.1 Bedeutung und Vorkommen von Cholin

Cholin wurde von STRECKER (1862) als Bestandteil der Schweinegalle entdeckt. Seither wurde Cholin hinsichtlich seiner Bedeutung als Nährstoff, als Zellmembrankomponente und als Vorstufe des Neurotransmitters Acetylcholin untersucht.

Obwohl der Mensch in der Lage ist, Cholin *de novo* zu synthetisieren, ist die Nahrung die Hauptaufnahmequelle von Cholin für den Organismus (ZEISEL et al. 1991). Der Organismus benötigt Cholin für die pränatale Gedächtnisentwicklung (ZEISEL 2000), die Leberfunktion (ZEISEL et al. 1991; HENSLEY et al. 2000) und als Methylgruppendonor im Körper (ZEISEL 2000; HENSLEY et al. 2000). Der Plasmaspiegel von Cholin wird in engen Grenzen gehalten und liegt, sowohl beim Menschen als auch bei anderen Säugetieren, bei etwa 10 μM (BLIGH 1952). Dennoch unterliegt der Plasmaspiegel von Cholin Schwankungen. So kann er bei einer Cholin-reduzierten Diät um bis zu 50% sinken (ZEISEL et al. 1991), während er bei einer Cholin-reichen Ernährung auf etwa 20 μM steigen kann (ZEISEL 1981). Körpereigenes Cholin wird in einem fortwährenden Zyklus vor allem aus Phosphatidylcholin durch dessen Katabolismus freigesetzt. Das freie Cholin

wird dann erneut zu Phosphatidylcholin resynthetisiert, welches den Hauptbestandteil der eukaryontischen Zellmembranen ausmacht (GARCIA et al. 1998). Im Rahmen der Synthese von Acetylcholin wird Cholin rezykliert. So wird nach dem Abbau von Acetylcholin Cholin wieder in die Nervenendigungen aufgenommen und zur Resynthese von Acetylcholin verwendet (BLUSZTAJN und WURTMAN 1983).

2.2.2.2 Transport von Cholin über Zellmembranen

Die Synthese sowohl von Phosphatidylcholin als auch von Acetylcholin findet intrazellulär statt. Da Cholin bei physiologischem pH-Wert ein hydrophiles Kation ist, kann es nicht durch einfache Diffusion in die Zellen aufgenommen werden. Ein durch Transportproteine vermittelter Cholintransport über die Zellmembran ist daher zwingend erforderlich, um den Bedarf der Zellen abzudecken. Die Cholintransporter werden in niedrig-affine und hoch-affine, substratspezifische Cholintransporter eingeteilt.

Als hoch-affinen Cholintransporter werden diejenigen Transporter bezeichnet, die einen K_m -Wert unter 10 μM aufweisen (BLUSZTAJN und WURTMAN 1983). Sie sitzen z. B. in der präsynaptischen Membran der cholinergen Nervenendigungen und sorgen dafür, dass Cholin in die Nervenendigungen zur Resynthese von Acetylcholin wieder aufgenommen werden kann (YAMAMURA und SNYDER 1973).

Als niedrig-affine Cholintransporter werden diejenigen Transporter bezeichnet, die eine K_m größer als 30-100 μM aufweisen (BLUSZTAJN und WURTMAN 1983). Niedrig-affine Cholintransporter kommen in den verschiedensten Zellen und Geweben vor, wie z. B. in Darm- (HEGAZY und SCHWENK 1984) und Leberzellen (MOSELEY et al. 1996), in der Plazenta (GRASSL 1994), aber auch in Zellorganellen wie den Mitochondrien (PORTER et al. 1992). Der Cholintransport über diese niedrig-affinen Transporter dient der Versorgung der verschiedenen Zellen mit Cholin für die Synthese von Phosphatidylcholin und anderen Phospholipiden.

Zu den Transportern, die gegenüber Cholin eine niedrige Affinität aufweisen, gehören die Organischen Kationentransporter (OCT's), so dass Cholin häufig als Testsubstrat in Transportstudien von OCT's eingesetzt wird (ARNDT et al. 2001; BUDIMAN et al. 2000).

Neben den hoch- und niedrig-affinen Cholintransporter gibt es noch Transporter, die sich nicht in die eine oder andere Gruppe einteilen lassen. So haben z. B. MELEGA und HOWARD (1981) einen Cholinaufnahmemechanismus bei der PC12-Zellkultur (Phäochromo-cytomzellen von Ratten) untersucht, der nicht Na^+ -abhängig ist, was eine typische Eigenschaft niedrig-affiner Cholintransporter ist. Dieser Transporter weist aber

einen K_m -Wert von 12 μM auf, was wiederum auf die hoch-affinen Cholintransporter hindeutet.

Ob und wie Cholin vom Kolonepithel des Schweins transportiert wird, ist unbekannt.

2.2.3 Histaminverstoffwechslung

Trotz einer eingeschränkten Permeation werden geringe Mengen von Histamin vom Organismus über das Darmepithel absorbiert (AHRENS et al. 2002). Zusammen mit dem endogen freigesetzten Histamin, vor allem aus den Mastzellen der Darmmukosa, muss das exogene Histamin abgebaut und damit entgiftet werden.

Histamin kann über verschiedene Stoffwechselwege abgebaut werden, je nach Tierart und Organ. Dabei sind prinzipiell zwei Möglichkeiten des Histaminabbaus bekannt: 1. die Methylierung durch die Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) und 2. die oxidative Desaminierung durch die Diaminoxidase (DAO) (LINDAHL 1960; NAKOS und GOSSRAU 1995).

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Versuche unternommen, um zu zeigen, dass außer der DAO noch andere Oxidasen am Histaminabbau beteiligt sind (WALDMEIER et al. 1977; HOUGH und DOMINO 1979; ELSWORTH et al. 1980). Für den Gastrointestinaltrakt konnte jedoch gezeigt werden, dass nur die DAO (außer der HNMT) eine Rolle bei der Verstoffwechslung von Histamin spielt (KUSCHE et al. 1975b, 1982; NAKOS und GOSSRAU 1995). Eine ebenfalls vorhandene Monoaminoxidase ist hingegen ohne Bedeutung bei der Verstoffwechslung von Histamin (NAKOS und GOSSRAU 1995).

2.2.3.1 Bedeutung der Histamin-N-Methyltransferase

Die HNMT (EC 2.1.1.8) ist ein monomerisches Enzym, das die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf die 1-Position vom Imidazolring von Histamin überträgt (BROWN et al. 1959). Die HNMT konnte in Enzympräparationen aus dem Schweineantrum und aus der menschlichen Schleimhaut des Magencorpus nachgewiesen werden (BARTH et al. 1973a). Desweiteren war die HNMT in Kaninchen-, Menschen-, Katzen- und Hamsterleber vorhanden; nur die Rattenleber war nicht in der Lage 1-MH zu produzieren (LINDAHL 1960; BROWN et al. 1959). Außerhalb der Magenmukosa und des Lebergewebes kommt die HNMT noch in verschiedenen weiteren Geweben vor: in Niere, Ileum, Lunge, Herz, Gehirn; je nach Tierart allerdings mit unterschiedlich hoher Aktivität (BROWN et al. 1959).

Die Studie von KLOCKER et al. (2005) machte deutlich, dass die HNMT beim Schwein ubiquitär im Körper verteilt ist. Nur das Blutplasma und die Galle weisen keine HNMT-Aktivität auf (KLOCKER et al. 2005).

Was die Substrate und die Reaktionsbedingungen angeht, ist die HNMT sehr substratspezifisch: sie setzt nur Histamin enzymatisch um (BROWN et al. 1959). Dabei liegt das pH-Optimum bei 7,2 - 7,4 (BROWN et al. 1959). Eine HNMT-Aktivität ist allerdings auch schon ab pH 5,0 messbar und bleibt bis pH 10,0 erhalten (LINDAHL 1960).

Anerkannte Hemmstoffe der HNMT sind Amodiaquin (AD: HARLE und BALDO 1988) und auch das Reaktionsprodukt 1-Methylhistamin (1-MH: BARTH et al. 1973b). In einer *in vivo* Untersuchung wurden Mäuse mit AD vorbehandelt und bekamen anschließend ³H-Histamin i.v. verabreicht. Das führte zu einem erhöhten ³H-Histamin- und einem erniedrigten ³H-1-MH-Gehalt in verschiedenen Geweben im Vergleich zu den Kontrolltieren (ANDRE und SCHWARTZ 1973).

Untersuchungen zur hemmenden Wirkung von 1-MH zeigten, dass 1-MH die HNMT sowohl kompetitiv als auch nicht kompetitiv hemmen kann. Dabei lag die halbmaximale Hemmkonzentration für 1-MH bei ca. 100 µM (BARTH et al. 1973b, 1973a; BROWN et al. 1959).

Auf die Bedeutung der HNMT bei der Verstoffwechslung (und damit Entgiftung) von Histamin wird durch Untersuchungen am Epithel des proximalen Kolons vom Schwein von AHRENS et al. (2002) und ASCHENBACH et al. (2002) hingewiesen. Ihre Untersuchungen führten sie mit der Ussingkammer-Technik durch. In den Proben wurden der Radioaktivitätsgehalt und die Histaminkonzentration bestimmt. Bei einer Hemmung der HNMT war die Menge an radioaktiv-markierten Substanzen, die die Epithelseite gewechselt hat, gleich der Menge an Histamin, die mit der HPLC bestimmt wurde. Die Autoren AHRENS et al. (2002) und ASCHENBACH et al. (2002) schlussfolgerten anhand diese indirekten Befunde, dass eine verminderte Verstoffwechslungsrate durch die Hemmung der HNMT hervorgerufen werden kann. Ein direkter Nachweis der 1-MH-Bildung am intakten Kolonepithel fehlt aber bislang.

2.2.3.2 Bedeutung der Diaminoxidase

Die Diaminoxidase (DAO; EC 1.4.3.6) ist ein kupferhaltiges Enzym (BIEGANSKI 1983; SESSA und PERIN 1994), das biogene Amine mit 3 - 6 C-Atomen, wie Kadaverin oder Putreszin, einige ihrer Derivate oder Histamin oxidativ desaminiert (SESSA und PERIN

1994). Bei dieser Reaktion wird NH_3 und H_2O_2 abgegeben. Im Falle von Histamin entsteht als Reaktionsprodukt Imidazolazetaldehyd, das weiterhin durch eine Aldehyddehydrogenase zu Imidazolessigsäure oxidiert wird (KAPELLER-ADLER und FLETCHER 1959).

Eine hohe Aktivität der DAO konnte im Darm von Mensch, Hund, Schwein, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte und Maus im Vergleich zu der niedrigeren DAO-Aktivität in Niere, Leber, Lunge und Plasma festgestellt werden (BIEGANSKI et al. 1983; KUSCHE et al. 1975b). KLOCKER et al. (2005) untersuchten die Verteilung und Expression der Histaminverstoffwechelnden Enzyme in den verschiedenen Geweben vom Schwein. Diese Studie bestätigt vorangegangene Untersuchungen, nach denen die DAO vom Schwein vor allem im Nierengewebe und im Gastrointestinaltrakt vorkommt. Im Gastrointestinaltrakt (GIT) war die DAO-Aktivität folgendermaßen verteilt: wenig bis gar nicht im Magen, dann langsam ansteigend vom proximalen Dünndarm (Duodenum, Jejunum) bis zu den höchsten Werten im Ileum und wieder geringer im Dickdarm (KUSCHE et al. 1973, 1975b, 1978; KLOCKER et al. 2005). In allen anderen untersuchten Organen (Haut, Unterhaut, Bindegewebe, Plasma, Leukozyten, Arterien, Venen, Nerven, Thymus, Milz, Lymphknoten, Knochenmark, Zunge, Speiseröhre, Mageneingang, Magen, Leber, Bauchspeicheldrüse, Gallenblase, Galle, Bauchfell, Großes Netz, Nebenniere, Harnleiter, Harnblase, Harnröhre, Gebärmutter, Eierstock, Eileiter, Zwerchfell, Luftröhre, Lunge, Skelettmuskel, Herzmuskel, Herzohr, Auge, harte Hirnhaut, großes Netz, Großhirn, Kleinhirn, Hirnstamm und Hypophyse) war die DAO-Aktivität verschwindend gering (KLOCKER et al. 2005). Erstaunlich sind Untersuchungen zur mRNA-Expression der DAO: sie zeigen, dass die DAO auf mRNA-Ebene auch in der Milz, im Gehirn und weiteren Organen exprimiert wurde, obwohl diese Organe so gut wie keine Enzymaktivität aufwiesen (KLOCKER et al. 2005).

Die Substrate, die bevorzugt von der DAO umgesetzt werden, sind aliphatische Amine. Putreszin und Kadaverin (mit je 1 mM) wurden durch die humane DAO etwa gleich schnell desaminiert, während 1,3-Diaminopropan (5 mM) 1,5 mal schneller desaminiert wurde als Putreszin (BIEGANSKI et al. 1983). Je länger die aliphatischen Ketten, desto langsamer desaminierte die humane DAO die Substrate (BIEGANSKI et al. 1980). Histamin wurde ca. halb so schnell desaminiert wie Putreszin (53% bei pH 7,0), dagegen wurde 1-MH (100 μM) etwa genauso schnell wie Putreszin abgebaut (BIEGANSKI et al. 1980).

Wie schnell die DAO ihre Substrate umsetzt, hängt von den Reaktionsbedingungen ab. Die intestinale DAO des Menschen hat ihr pH-Optimum bei 6,7 und einer

Histaminkonzentration von 100 μM (BIEGANSKI et al. 1980). Das pH-Optimum liegt damit niedriger als das von der intestinalen DAO der Kaninchen bei pH 7,5; der Hunde bei pH 7,3 - 7,6 oder der Schweine bei pH 7,5 - 8,0 (KUSCHE et al. 1975b, 1975c, 1975a).

Als Hemmstoffe der DAO wurden in vergangenen Studien vor allem Semikarbazid (K_i : 5 μM : SCHULER 1952) und Aminoguanidin (AG; K_i : 0,011 μM : BIEGANSKI et al. 1980 bzw. 0,05 μM : SCHULER 1952) verwendet.

Die funktionelle Bedeutung der DAO bei der Entgiftung von Histamin wird in der Literatur oft erwähnt (KUSCHE et al. 1979; SATTLER et al. 1988). Deren *in vivo* Untersuchungen lassen jedoch keinen Rückschluss darauf zu, inwieweit das Darmepithel an der Entgiftung von Histamin beteiligt ist. Histamin könnte nach der oralen Aufnahme auch aus dem Magendarmtrakt resorbiert werden, aber erst von der DAO in der Leber verstoffwechselt werden. Dass das Darmepithel bei der Histaminverstoffwechslung eine Rolle spielt, konnten NILSSON et al. (1996) anhand von Untersuchungen am Dünndarm der Ratte zeigen. Die Histamin- und Putreszinkkonzentrationen waren im portalen Venenblut 2-3x niedriger als im arteriellen Blut. Eine Behandlung der Tiere mit AG, d.h. eine Hemmung der DAO, ließ diese Differenz verschwinden (NILSSON et al. 1996). In *in vitro* Untersuchungen mit der Ussingkammer-Technik konnte indirekt gezeigt werden, dass die DAO auch im proximalen Kolon vom Schwein eine Rolle spielt (AHRENS et al. 2002; ASCHENBACH et al. 2002). Bei der Hemmung der DAO verringerte sich die Differenz zwischen der Menge an radioaktiv-markierten Substanzen und der Menge an Histamin, die mit der HPLC bestimmt wurde (AHRENS et al. 2002; ASCHENBACH et al. 2002). Das deutet auf eine eingeschränkte Verstoffwechslung von Histamin bei gehemmter DAO hin.

2.2.4 Intraepitheliale Kompartimentierung der Histaminverstoffwechslung

2.2.4.1 Zelluläre Lokalisation der Histamin-N-Methyltransferase

Die Literaturangaben stimmen darin überein, dass die HNMT ein Enzym ist, das im Zytosol vorkommt. BROWN et al. (1959) fand die HNMT im löslichen Überstand im Gehirn von Meerschweinchen und in der Mäuseleber. Auch im Lebergewebe von Schweinen, Kaninchen, Mensch und Hamster fand sich die HNMT im Überstand; die Mitochondrienfraktion zeigte keine Methylierungsaktivität (LINDAHL 1960). Tahara et al. (2000) konnten die HNMT vor allem in Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts der Meerschweinchen mit Hilfe von polyklonalen AK gegen die HNMT sichtbar machen.

BARNES und HOUGH (2002) postulieren außerdem die Existenz einer Membran-

gebundenen Form der HNMT im ZNS, was eine zelluläre Aufnahme von Histamin in die Nervenzellen erübrigen würde. Allerdings war die Membran-gebundene Aktivität der HNMT sehr viel niedriger als die HNMT-Aktivität innerhalb der Nervenzellen (BARNES und HOUGH 2002).

2.2.4.2 Zelluläre Lokalisation der Diaminoxidase

Bei der DAO sind die Hinweise über die zelluläre Lokalisation in der Literatur nicht so eindeutig wie für die HNMT. Zwar wurde übereinstimmend die DAO-Aktivität der Darmwand vor allem der Mukosaschicht zugeordnet (BIEGANSKI et al. 1983; D'AGOSTINO et al. 1984; DANIELE und QUARONI 1990; SCHWELBERGER et al. 1998a, 1998b). Hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation besteht Uneinigkeit. D'Agostino et al. (1984) fanden die DAO der Ratte intrazellulär, dort aber teilweise in Organellen und Zellmembranen (ca. 54 %) und teilweise im Zytosol (ca. 36 %). BIEGANSKI et al. (1983) lokalisierten die DAO des Schweines, des Kaninchens und des Hundes vor allem im Zytosol. Bei Mensch, Ratte und Maus befand sich die DAO sowohl im Zytosol als auch in der Mitochondrienfraktion (BIEGANSKI et al. 1983). Die bisherigen Nachweise einer zytosolischen Lokalisation der DAO bedürfen aber einer kritischen Betrachtung. Die DAO der Schweine ist ein glykosiliertes Enzym mit einem Kohlenhydratanteil von ca. 11 % (SCHWELBERGER und BODNER 1997). Das macht es sehr wahrscheinlich, dass die DAO auf sekretorischem Weg die Zellen verlässt und vorher entsprechend in Vesikel eingeschlossen wird (SCHWELBERGER und BODNER 1997). Dazu würde die histologische Beobachtung passen, dass sich die DAO in den oberflächlichen Epithelzellen der Krypten im Gastrointestinaltrakt des Schweins punktförmig nahe entlang der Plasmamembran vor allem basal, aber auch lateral und apikal der Zellen verteilte (SCHWELBERGER et al. 1998a, 1998b; DANIELE und QUARONI 1990). Funktionell untermauert werden kann dies durch eine Untersuchung von DANIELE und QUARONI (1990), die zeigte, dass Heparin die Freisetzung der DAO auf der basolateralen Seite von Caco-2-Zellen stimulierte.

2.3 Bedeutung der Literatur für die eigene Fragestellung

Obwohl Schweine mit großen Mengen an Histamin, die sich im Darmlumen befinden, konfrontiert werden, bleiben Schweine unter physiologischen Bedingungen gesund. Nur unter besonderen Umständen kann es zur Histaminintoxikation kommen. Die Histaminintoxikation führt dann u. a. zu Hautrötung, Blutdruckabfall und Schocksymptomen, die durchaus den Tod zur Folge haben können (SATTLER et al. 1988; SATTLER und LORENZ 1990). Das Dickdarmepithel der Schweine trägt aber vermutlich entscheidend dazu bei, die Schweine vor solch einer Histaminintoxikation zu schützen (AHRENS et al. 2002; ASCHENBACH et al. 2002). Dabei werden verschiedene Mechanismen postuliert, die eine Histaminintoxikation verhindern sollen (ASCHENBACH et al. 1998).

Zum Einen konnte gezeigt werden, dass Histamin vom Dickdarmepithel nur sehr eingeschränkt resorbiert wird (AHRENS et al. 2002). Zum Anderen wird dieser Resorption durch eine Sekretion von Histamin ins Lumen entgegengewirkt (ASCHENBACH et al. 2002). Als erster Schritt eines Sekretionsvorganges wird die basolaterale Aufnahme der zu sezernierenden Substanz vorausgesetzt. Im Rahmen dieser Studie sollte daher untersucht werden, ob eine basolaterale Aufnahme von Histamin einen zentralen Mechanismus im Rahmen der Histaminsekretion darstellt.

Weiterhin ist allgemein sehr wenig über die Transportkapazität von Kationen über das Dickdarmepithel bekannt. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob das Darmepithel in der Lage ist, weitere Kationen (z. B. Cholin) zu transportieren oder ob Histamin gegebenenfalls eine Ausnahme darstellt.

Als weiteren wichtigen Mechanismus, der eine Histaminintoxikation verhindern kann, ist die Histaminverstoffwechslung zu nennen. Es konnte gezeigt werden, dass Histamin bei seinem Übertritt über das Darmepithel zu einem erheblichen Anteil verstoffwechselt wurde (ASCHENBACH et al. 2002). Um die Histaminverstoffwechslung im Detail untersuchen zu können, sollte eine HPLC-Methode entwickelt werden, durch die Histamin und sein Abbauprodukt 1-MH gemeinsam in einer Probe analysiert werden können.

In der Literatur wird der DAO die entscheidende Rolle beim Histaminabbau zugesprochen (SATTLER et al. 1988, 1989; SATTLER und LORENZ 1990), während neuere Erkenntnisse auf die HNMT hinweisen (AHRENS et al. 2002; ASCHENBACH et al. 2002). Mit Hilfe der HPLC-Methode sollte nun untersucht werden, in welchem Umfang sich die Aktivität der HNMT bzw. der DAO auf die Histaminverstoffwechslung auswirkt und

welche Rolle das jeweilige Enzym bei der Verstoffwechslung spielt.

Bezüglich der intrazellulären Lokalisation der Histaminverstoffwechslung wird allgemein angenommen, dass die Methylierung von Histamin durch die HNMT im Zytosol stattfindet. Die DAO betreffend, sind die Literaturangaben zur intraepithelialen Lokalisation widersprüchlich. Entweder soll die DAO intrazellulär in Vesikeln vorkommen (SCHWELBERGER et al. 1998a, 1998b) oder es wird beschrieben, dass sie frei im Zytosol vorliegt (BIEGANSKI et al. 1983). Die Untersuchungen sollen abklären, ob Histamin oder 1-MH, sein Abbauprodukt, eventuell intravesikulär von der DAO abgebaut werden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuche an isolierten porcinen Dickdarmepithelien

3.1.1 Tiere und Gewinnung der Dickdarmepithelien

Für die Versuche wurden Epithelien des proximalen Kolons von Mastschweinen aus der Kreuzung Pietrain x Angler-Sattelschwein beiderlei Geschlechts verwendet. Die Läufer waren zwischen 20 und 35 kg schwer. Sie wurden vom Lehr- und Versuchsgut Oberholz der Universität Leipzig unter den dortigen Standardbedingungen aufgezogen und mindestens einen Tag vor dem Versuch im Veterinär-Physiologischen Institut aufgestellt. Dort erhielten sie ad libitum Wasser und bis 12 Stunden vor dem Versuchsbeginn 2x täglich kommerziell erhältliches Schweinemastfutter.

Zu Beginn des Versuches wurde das Schwein in seinem Stallabteil mit Ketamin (15 mg/kg) und Xylazin (1,0 mg/kg) intramuskulär sediert. Nach etwa 10 bis 15 min wurde ein Venenkatheter in die Ohrvene gelegt und Thiopental bis zum Erreichen des Toleranzstadiums (ca. 8 mg/kg) intravenös appliziert. Im Anschluss erfolgte die Tötung durch Blutentzug. Sofort danach erfolgte die Entnahme von ca. 1 m proximalen Kolon, ausgehend von der Ansa proximalis der Gyri centrifugales. Das Stück vom proximalen Kolon wurde erst mit eiskalter 0,9 % Kochsalzlösung und anschließend mit eiskalter Pufferlösung (Zusammensetzung s. Abschnitt 3.1.2.1; pH 7,2 - 7,3) gespült bis der Darmchymus komplett entfernt worden war. Nach der Spülung wurde das Dickdarmstück in ein Becherglas mit eiskalter, Carbogen (95 % O₂ / 5 % CO₂)- begaster Pufferlösung überführt und im Dewargefäß ins Labor transportiert.

3.1.2 Inkubation in der Ussingkammer

3.1.2.1 Isolierung der Epithelien des proximalen Kolons

Im Labor wurde vom proximalen Kolon ein ca. 2,5 cm langes Stück abgetrennt und am mesenterialen Ansatz vorsichtig aufgeschnitten. Das etwa viereckige Stück wurde mit der Mukosa nach oben zeigend auf eine Plexiglasscheibe gelegt und mit einem senkrecht gestellten Objektträger an einer Seite fixiert. Nun wurden die Lamina epithelialis mucosae und die Lamina propria mucosae, im Folgenden als Epithel bezeichnet, mit einem

Metallspatel von den Muskelschichten und dem Bindegewebe abgeschoben. Diese Methode der Epithelpräparation war angelehnt an die "slide stripping"-Technik von TRAYNOR und O'GRADY (1992). Abbildung 1 und 2 zeigen den Unterschied zwischen "gestripptem" Epithel und Darmwand.



Abb. 1: „Gestripptes“ Epithel bestehend aus Epithel, Lamina propria und Lamina muscularis mucosae nach der "slide stripping"-Technik

Die Gewebeprobe wurde in Tissue-Tek eingelegt, im flüssigen Stickstoff tiefgefroren und mit einem Gefriermikrotom in 16 µm dünne Schnitte geschnitten. Der Gewebeschnitt wurde mit HE angefärbt. (Der Schnitt wurde von der Verfasserin im Institut für Veterinär-Pathologie angefertigt und im Veterinär-Physiologischen Institut angefärbt.)



Abb. 2: Schnitt durch die Darmwand vor der Abpräparation des Epithels

Ep - Epithel (bestehend aus Epithel, Lamina propria, Lamina muscularis mucosae); Sm - Tunica submucosa; M - Tunica muscularis; S - Tunica serosa. Das histologische Präparat wurde wie in Abbildung 1 beschrieben hergestellt.

Das Epithel wurde auf ca. 2 x 2 cm zugeschnitten, optisch auf Unversehrtheit geprüft und zum Schutz des Epithelrandes zwischen zwei Silikonringe mit einer inneren Öffnung von 1,1 cm² gelegt. Die Öffnung der Silikonringe war mit einem feinen Netz bespannt, um das Epithel vor mechanischen Belastungen infolge hydrostatischer Druckschwankungen zu schützen. Die Silikonringe mit dem Epithel wurden zwischen zwei Ussingkammerhälften eingespannt. Beide Ussingkammerhälften wurden gleichzeitig mit je 12 ml der 37,5 ± 0,5 °C warmen Pufferlösung vorsichtig von unten aufgefüllt. Die Pufferlösung war wie folgt zusammengesetzt (in mM): NaCl 105, KCl 5, MOPS 5, CaCl₂ 1,8, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 25, Na₂HPO₄ 1, D-Glucose 10, Na-Propionat 5, Na-Butyrat 2, H₃PO₄ 2 und Enrofloxacin 0,03; pH 7,35 - 7,40. Die mukosale, d. h. die ehemals dem Lumen zugewandte Epithelseite, wurde getrennt von der serosalen, das ist die ehemals dem Blut zugewandte Epithelseite, mit Puffer umspült. Außer der Einfüll- und Ablassöffnung von unten war jede Kammerhälfte mit dem darüberliegenden Pufferreservoir verbunden. Die Pufferlösung wurde mit Hilfe der Carbogen-Begasung ständig umgewälzt und durch eine Wasserbadummantelung konstant auf 37,5 ± 0,5 °C gehalten. Das Pufferreservoir war für die Chemikaliengabe und die Probenentnahme von oben zugänglich. In Abbildung 3 ist eine Ussingkammer schematisch dargestellt.

3.1.2.2 Elektrophysiologische Parameter (I_{sc} , G_t)

Mit Hilfe einer Voltage Clamp Anlage (Ing.-Büro für Mess- und Datentechnik, Aachen) wurden über die gesamte Versuchsdauer hinweg die elektrophysiologischen Parameter bestimmt. Dabei handelte es sich um den Kurzschlussstrom (I_{sc}) und die Gewebeleitfähigkeit (G_t). Der Kurzschlussstrom (I_{sc}) stellt den Strom dar, der durch Ladungstransporte über das Epithel entsteht. Dieser Strom führt im nicht geklemmten Zustand (Open circuit-Modus) zum Aufbau einer Potentialdifferenz über dem Epithel. Die transepitheliale Potentialdifferenz wird durch Agarbrücken (3 M KCl), die sich nahe dem Epithel befinden, abgegriffen. Die Agarbrücken stehen über Kalomelektroden (Sensortechnik Meinsberg GmbH, Ziegra-Knobelsdorf) mit der Voltage Clamp Anlage in Verbindung. Im Short-circuit-Modus wird die transepitheliale Potentialdifferenz auf 0 mV "geklemmt". Der Klemmstrom wird von der Anlage über Silberelektroden und 0,9 %ige NaCl-Agarbrücken in die Ussingkammer eingespeist. Er ist dem Kurzschlussstrom vom Betrag her gleich jedoch entgegengesetzt gerichtet. Der Kurzschlussstrom ist definitionsgemäß positiv, wenn die transepitheliale Potentialdifferenz ihren Pluspol auf der serosalen Seite hätte. Der zweite elektrophysiologische Parameter, die Gewebeleitfähigkeit (G_t), zeigt die Durchlässigkeit des Epithels für Ionen an. Dieser

Parameter diente in den durchgeführten Untersuchungen vor allem der Überprüfung der Unversehrtheit des Epithels. Die Gewebeleitfähigkeit wird folgendermaßen bestimmt: 1x pro Minute wird ein bipolarer Stromimpuls (ΔI) von 100 μA und einer Dauer von 300 ms ausgesendet. Daraus resultiert eine Potentialänderung (ΔP_{d_t}). Aus Stromimpuls und Potentialänderung lässt sich mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes die Gewebeleitfähigkeit errechnen: $G_t = \Delta I \times \Delta P_{d_t}^{-1}$. Die während des Versuchs gemessenen Werte wurden um das Eigenpotential und den Eigenwiderstand der Versuchseinrichtung korrigiert, welche vor Versuchsbeginn ermittelt worden waren.

Die elektrophysiologischen Daten wurden im Rahmen dieser Studie lediglich zur Überprüfung der Intaktheit der Epithelpräparationen herangezogen. Sie werden daher im Ergebnisteil nicht weiter erläutert. Sie sind jedoch der Vollständigkeit halber in Anlage 2 aufgeführt.

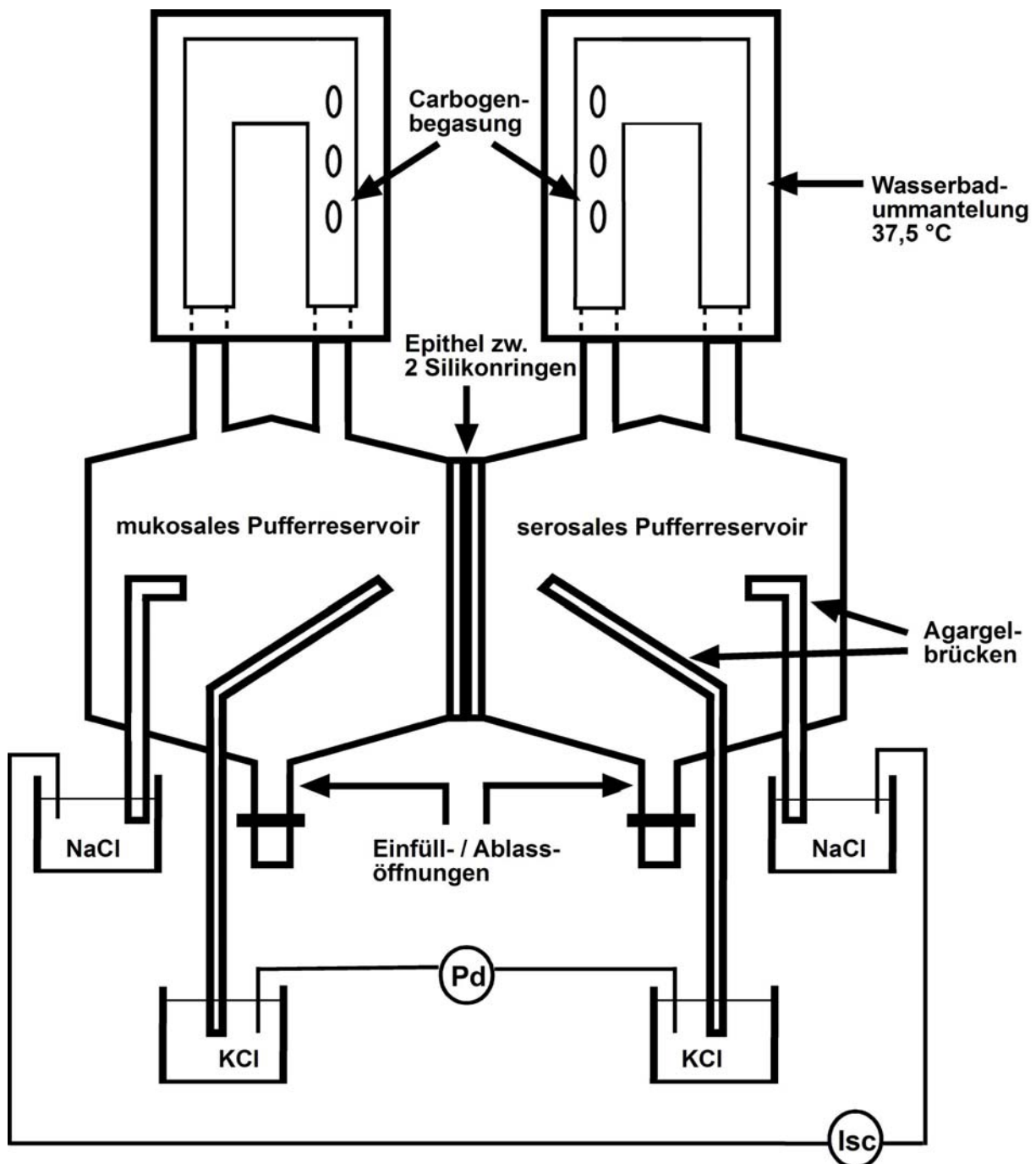


Abb. 3: Schematische Darstellung einer Ussingkammer

Zwischen zwei Ussingkammerhälften ist das Epithel zwischen zwei Silikonringen eingespannt. Die zwei gewebe-nahen Agargelbrücken dienen dazu, die Potentialdifferenz (Pd_t) zwischen serosaler und mukosaler Epithelseite zu bestimmen. Über die zwei gewebefernen Agargelbrücken wird gegebenenfalls der Klemmstrom appliziert. Der Puffer wird über die jeweilige Einfüll- bzw. Ablassöffnung vorsichtig in die Kammerhälften eingefüllt. Durch die Begasung kommt es zu einer ständigen Umwälzung des Puffers, der mit Hilfe eines Thermostates auf $37,5 \pm 0,5$ °C temperiert wird.

3.1.2.3 Allgemeine Versuchsdurchführung

Fünf bis zehn Minuten nach dem Einspannen der letzten Epithelpräparation wurde die Voltage Clamp Anlage im "open circuit" - Modus gestartet bis sich die elektrophysiologischen Parameter stabilisiert hatten. Nach weiteren 10 - 15 min wurde auf "short-circuit" umgestellt, so dass während der Fluxstudien kein elektrischer Gradient über dem Epithel bestand. Dann wurden für die Fluxstudien je 2 Epithelien einander zugeordnet, d. h. gepaart. Diese gepaarten Epithelien durften sich nicht mehr als 25% in ihrer Gewebeleitfähigkeit (G_t) unterscheiden. Die Zuordnung der Epithelpaare zu den einzelnen Versuchsgruppen wurde so durchgeführt, dass am Ende einer Versuchsserie jede Versuchsgruppe in etwa den gleichen mittleren G_t -Wert hatte. Jedes Epithelpaar stellte einen Versuchsansatz dar, davon wurde an einem Epithel die Fluxrate von der mukosalen zur serosalen Seite (MS-Fluxrate; J_{MS}) und an dem anderen Epithel die Fluxrate von der serosalen zur mukosalen Seite (SM-Fluxrate, J_{SM}) bestimmt. Die Chemikalienzugabe erfolgte nach der Zuordnung der Epithelpaare zu den entsprechenden Versuchsansätzen nach dem jeweiligen Schema der Versuchsserie. Der anschließenden Zugabe der Radioaktivität folgte eine 45-minütige Äquilibrationszeit bis zur ersten Probenahme. Die Ussingkammerhälfte mit der zugesetzten Radioaktivität wurde als "heiße Seite" bezeichnet und die daraus entnommenen Proben als "heiße Proben". Die kontralaterale Seite war die "kalte Seite" und die entsprechenden Proben die "kalten Proben".

Es wurden heiße und kalte Proben sowohl für die Radioaktivitätsmessung als auch für die HPLC-Analyse genommen. Für die Szintillisationszählung umfasste das Probenvolumen der kalten Proben 0,8 ml. Die heißen Proben hatten ein Volumen von 0,1 ml und wurden ad 0,8 ml mit Pufferlösung aufgefüllt. Alle Proben, die für die Radioaktivitätsmessung bestimmt waren, wurden mit 4 ml Aquasafe 300 (Zinser Analytik, Maidenhead, UK) vermischt und für die Radioaktivitätsmessung bereitgestellt. Für die HPLC-Analyse wurden 0,4 ml von der heißen Seite und 0,8 ml von der kalten Seite entnommen. Sie wurden sofort nach der Probenahme bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und innerhalb von 2 Wochen analysiert. Die HPLC-Methode wird weiter unten beschrieben (s. Kap. 3.2.2.2). Um den hydrostatischen Druckunterschied nach der Probenentnahme wieder auf beiden Seiten des Epithels auszugleichen, wurde nach der Probenentnahme die kalte Seite mit frischem Puffer aufgefüllt und zwar mit 0,8 ml, wenn nur Proben für die Radioaktivitätsmessungen genommen wurden und mit 1,2 ml, wenn sowohl Proben für die Radiaktivitätsmessungen als auch für die HPLC-Analyse genommen worden waren. In letzterem Fall nahm dann

sowohl auf der heißen als auch auf der kalten Seite das Probenvolumen um 0,4 ml ab. Damit konnte ein Auffüllen auf der heißen Seite vermieden werden, was zur Verdünnung der Radioaktivität geführt hätte. In Abbildung 4 ist der allgemeine Versuchsablauf für die Versuchsserien dargestellt.

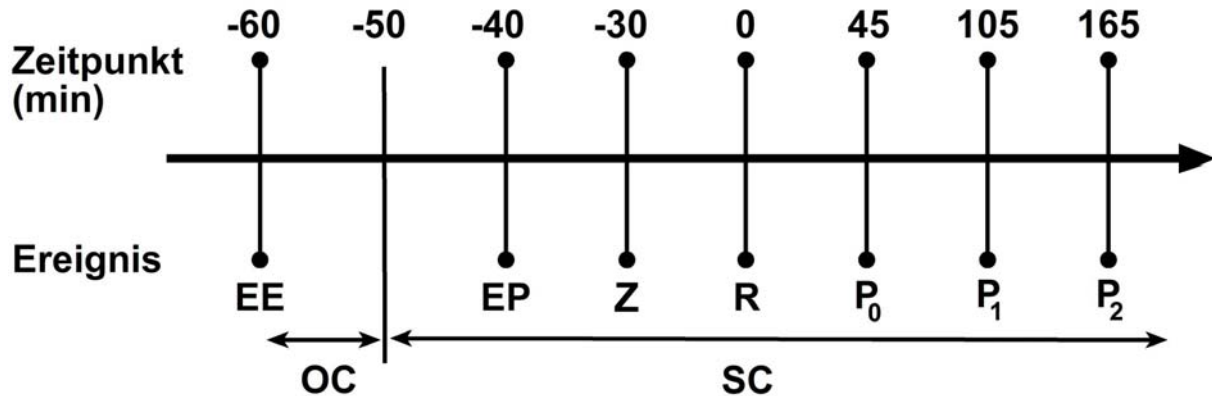


Abb. 4: Allgemeiner Versuchsablauf für die Versuchsserien

EE; Einspannen der Epithelien

EP; Paarung der Epithelien nach ihrer Gewebeleitfähigkeit

OC; open circuit

SC; short-circuit

Z; Zugabe der entsprechenden Substanzen und/oder Hemmstoffe

R; Zugabe der Radioaktivität

P₀, P₁, P₂; 1., 2. und 3. Probe von der kalten Versuchsseite

3.1.2.4 Spezielle Versuchsdurchführung

Die Tabelle 1 enthält eine Übersicht zu den einzelnen Versuchsserien (s. S. 23).

3.1.2.4.1 Organischer Kationentransport

Mit Hilfe dieser Versuchsserien sollte herausgefunden werden, ob das proximale Kolon vom Schwein in der Lage ist, Histamin mit Hilfe von Transportern organischer Kationen über das Darmepithel zu transportieren. Vergleichend wurde als organisches Kation neben Histamin auch Cholin eingesetzt. Um den Einfluss eines chemischen Gradienten auszuschließen, wurden auf beiden Epithelseiten gleiche Konzentrationen an Histamin (50 μM) bzw. Cholin (3 μM , 30 μM , 300 μM , 3 mM) vorgelegt. Diese Konzentrationen wurden entweder auf der mukosalen oder der serosalen Epithelseite mit 106 kBq Tritium-markiertem Histamin (für die Histaminfluxraten) oder 35 kBq Tritium-markiertem Cholin (für die Cholinfluxraten) versetzt.

Um zu eruieren, ob Histamin auf der serosalen Seite über Kationentransporter in das Epithel aufgenommen wird, wurde der Einfluss des organischen Kations 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP) auf die Histaminfluxraten untersucht. MPP wurde in einem parallelen Versuchsansatz der Histaminfluxstudien auf der serosalen Seite mit 1 mM Endkonzentration zugegeben.

3.1.2.4.2 Histaminverstoffwechslung

Ziel dieser Experimente war es, eine mögliche Beteiligung der Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) und der Diaminoxidase (DAO) an der Histaminverstoffwechslung im Darmepithel zu untersuchen. Dafür wurden einseitig (mukosal oder serosal) 100 µM Histamin vorgelegt, die mit radioaktiv-markiertem Histamin versetzt worden waren. Parallel zur Kontrollgruppe wurde der einen Versuchsgruppe 100 µM Amodiaquin (AD) und der anderen Versuchsgruppe 100 µM Aminoguanidin (AG) jeweils beidseitig vorgelegt. Amodiaquin hemmt die HNMT (HARLE und BALDO 1988) und Aminoguanidin die DAO (SCHULER 1952). Da das Darmepithel in der Lage ist, selber Histamin bzw. dessen Stoffwechselprodukte freizusetzen (endogene Freisetzung) wurden parallel zu den Versuchsansätzen Proben von Epithelien genommen, denen kein Histamin und keine Radioaktivität zugesetzt worden waren. Um den Einfluss von AD bzw. AG auf die endogene Freisetzung festzustellen, wurden zusätzlich histaminfrei inkubierte Epithelien mit AD bzw. AG (je 100 µM beidseitig) versetzt. Der Histamingehalt der Proben, denen Histamin vorgelegt worden war, wurde um die entsprechenden endogenen Freisetzungen korrigiert.

3.1.2.4.3 Intraepitheliale Kompartimentierung der Histaminverstoffwechslung

Von der DAO ist bekannt, dass sie als sekretorisches Enzym in Vesikeln verpackt vorkommt (SCHWELBERGER und BODNER 1997; SCHWELBERGER et al. 1998a). Daraus ergab sich die Fragestellung, ob Histamin und / oder sein erstes Abbauprodukt 1-MH intrazellulär in die Vesikel aufgenommen wird und dann innerhalb der Vesikel weiter von der DAO abgebaut wird. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden wiederum 100 µM Histamin, versetzt mit 53 kBq Tritium-markiertem Histamin, entweder mukosal oder serosal zugegeben. Weiterhin wurde in parallelen Versuchsansätzen zusätzlich beidseitig 100 µM AG, 1 mM N-Ethylmaleimid (NEM) oder 100 µM AG plus 1 mM NEM zugesetzt. NEM verhindert die Fusion von Vesikeln mit der Zellmembran (BLOCK et al. 1988; BECKERS et al. 1989).

Tab. 1: Übersicht über die durchgeführten Versuche

Kapitel	Thema	Substanzzugabe			Radioaktivität (H^3)
		Art	End- konzentration	Seite	Spezifische Aktivität, die entweder M oder S zugegeben wurde
4.1.1	Cholinfluxraten unter Gradienten-freien Bedingungen	Cholin	3 mM	M und S	35 kBq/12 ml
			300 μ M	M und S	-"
			30 μ M	M und S	-"
			3 μ M	M und S	-"
4.1.2, 4.1.3	Histaminfluxraten unter Gradienten-freien Bedingungen und Einfluss des organischen Kations MPP	Histamin MPP	50 μ M 1 mM	M und S S	106 kBq/12ml
4.5.1, 4.5.2, 4.5.3	Histaminverstoff- wechslung	Histamin AD AG	100 μ M 100 μ M 100 μ M	M oder S M und S M und S	53 kBq/12 ml
4.6.1, 4.6.2	Vesikulärer Transport von 1-Methylhistamin	Histamin AG NEM AG + NEM	100 μ M 100 μ M 1 mM 100 μ M + 1 mM	M oder S M und S M und S M und S	53 kBq/12 ml

Anmerkungen zu Tabelle 1: MPP, 1-Methyl-4-phenylpyridinium; AD, Amodiaquin; AG, Aminoguanidin; NEM, N-Ethylmaleimid; M, mukosal; S, serosal

3.2 Analyseverfahren

3.2.1 Analyse von radioaktiven Tracern

Alle Fluxstudien wurden mit radioaktiv markierten Substanzen durchgeführt, wobei Tritium als Markierung diente.

3.2.1.1 Bestimmung von Tritium-markiertem Histamin und Cholin

³H-Histamin und ³H-Cholin wurden mit dem β -Zähler Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter (Firma PerkinElmer, MA, USA) bestimmt. Alle Messwerte wurden für den Szintillations-Leerwert korrigiert, der durch Szintillationsmessung unbehandelter Pufferproben ermittelt wurde. Bei der Bestimmung von Histamin muss beachtet werden, dass Histamin bei seinem Übertritt über das Epithel teilweise verstoffwechselt wird. Daher wird, zur Unterscheidung zur ursprünglichen, nativen Histaminfluxrate, die Fluxrate von radioaktiv-markiertem Histamin (inklusive seiner Stoffwechselprodukte) als Hist-rad-Fluxrate bezeichnet.

3.2.1.2 Berechnung der Fluxraten aus den Radioaktivitätsmesswerten

Von den Messwerten der Radioaktivitätsmessungen wurde die Fluxrate wie folgt errechnet:

$$(1) \quad J_{rad} = \frac{U_1 - U_0}{\Delta t * A}$$

J_{rad} , Fluxrate

U_0 , absolute Substanzmenge in der kalten Ussingkammerhälfte zum Zeitpunkt t_0

U_1 , absolute Substanzmenge in der kalten Ussingkammerhälfte zum Zeitpunkt t_1

Δt , Fluxdauer = $t_0 - t_1$

A , Epithelfläche, die für den Flux zur Verfügung steht

t_0 , Anfang der Fluxperiode

t_1 , Ende der Fluxperiode

Die Fluxrate bezeichnet die absolute Menge einer Substanz, die über das Epithel die Seite gewechselt hat. Sie ist abhängig von der zur Verfügung stehenden Epithelfläche A und der Zeitdauer zwischen t_0 und t_1 , Δt . Die Berechnung der absoluten Teilchenmenge U_1 bzw. U_0 der Ussingkammerhälfte zu den Zeitpunkten t_1 bzw. t_0 wurde folgendermaßen durchgeführt. Zu den Zeitpunkten t_0 bzw. t_1 , wurden die Proben mit der Substanzmenge P_0 bzw. P_1 genommen. Die Radioaktivitätsmessungen ergeben die Werte in dpm (decays per

minute; Zerfälle pro Minute). Sie sind direkt proportional zu der Konzentration der gemessenen Substanz in der Probe und damit zu der Konzentration in der entsprechenden Ussingkammerhälfte. Da die Probenkonzentration der kalten Proben unbekannt ist, muss auf die heiße Probe zurückgegriffen werden. Ihre absolute Teilchenmenge (S_H) ist bekannt, und ihre dpm_H gemessen.

Nun gilt folgendes:

$$(2) \quad dpm_H \text{ entspricht } S_H \text{ und } dpm_{P_0} \text{ entspricht } S_{P_0} \text{ und } dpm_{P_1} \text{ entspricht } S_{P_1}$$

dpm_{P_0} , Zerfälle pro Minute in der kalten Probe P_0

dpm_{P_1} , Zerfälle pro Minute in der kalten Probe P_1

dpm_H , Zerfälle pro Minute in der gemittelten heißen Probe H; $dpm_H = (dpm_{H_0} + dpm_{H_1})/2$

dpm_{H_0} , Zerfälle pro Minute in der heißen Probe am Anfang des Versuches

dpm_{H_1} , Zerfälle pro Minute in der heißen Probe am Ende des Versuches

S_H , absolute Substanzmenge in der heißen Probe H

S_{P_0} , absolute Substanzmenge in der Probe P_0 zum Zeitpunkt t_0

S_{P_1} , absolute Substanzmenge in der Probe P_1 zum Zeitpunkt t_1

Dabei ist

$$(3) \quad \frac{S_H}{dpm_H} = \frac{S_{P_0}}{dpm_{P_0}} \text{ und } \frac{S_H}{dpm_H} = \frac{S_{P_1}}{dpm_{P_1}}$$

aufgelöst nach S_{P_0} und S_{P_1} ergibt:

$$(4) \quad S_{P_0} = \frac{S_H * dpm_{P_0}}{dpm_H} \text{ und } S_{P_1} = \frac{S_H * dpm_{P_1}}{dpm_H}$$

Das Verhältnis von absoluten Teilchen im Probenvolumen zum Probenvolumen ist dasselbe wie das Verhältnis von den absoluten Teilchen in der Ussingkammerhälfte zum Volumen dieser Ussingkammerhälfte zum Zeitpunkt t_0 bzw. t_1 . Für die Berechnung der Fluxrate ist dabei ausschlaggebend wieviel Teilchen sich nach der Probennahme P_0 noch in der Säule befanden und wieviele Teilchen bis zur Probennahme P_1 neu hinzugekommen sind.

$$(5) \quad \frac{S_{P_0}}{V_{P_0}} = \frac{U_0}{V_{t_0}} \text{ und } \frac{S_{P_1}}{V_{P_1}} = \frac{U_1}{V_{t_1}}$$

V_{P_0} , Probenvolumen für die Radioaktivitätsmessung zum Zeitpunkt t_0

V_{t_0} , das Volumen in der kalten Ussingkammerhälfte nach der Probennahme P_0 zum Zeitpunkt t_0 ; bei

ausschließlichen Radioaktivitätsratenbestimmungen ist $V_{t_0} = V_G - V_{P_0}$, wenn parallel dazu eine Probe für

die HPLC-Messungen genommen wurde, gilt $V_{t_0} = V_G - 2 * V_{P_0}$

U_0 , absolute Teilchenmenge in der kalten Ussingkammerhälfte zum Zeitpunkt V_{t0}

U_1 , absolute Teilchenmenge in der kalten Ussingkammerhälfte zum Zeitpunkt V_{t1}

V_{P1} , Probenvolumen für die Radioaktivitätsmessung zum Zeitpunkt t_1

V_{t1} , das Volumen in der kalten Ussingkammerhälfte vor der Probennahme P_1 zum Zeitpunkt t_1 ; bei

ausschließlichen Radioaktivitätsfluxratenbestimmungen ist $V_{t1} = (V_G - V_{P0}) + V_A$, wenn parallel dazu eine

Probe für die HPLC-Messungen genommen wurde, gilt $V_{t1} = (V_G - 2 * V_{P0}) + V_A$

V_A , Auffüllvolumen, das nach P_0 zugegeben wurde, um den hydrostatischen Druck zwischen der mukosalen und serosalen Ussingkammerhälfte gleichzuhalten

V_G , Gesamtes Puffervolumen, das zu Anfang des Versuches in der Ussingkammerhälfte vorhanden ist

Nach U_0 und U_1 aufgelöst ergibt:

$$(6) \quad U_0 = \frac{V_{t0}}{V_{P0}} * S_{P0} \quad \text{und} \quad U_1 = \frac{V_{t1}}{V_{P1}} * S_{P1}$$

Nun können S_{P0} und S_{P1} in Formel (6) eingesetzt werden:

$$(7) \quad U_0 = \frac{V_{t0}}{V_{P0}} * \frac{S_H * dpm_{P0}}{dpm_H} \quad \text{und} \quad U_1 = \frac{V_{t1}}{V_{P1}} * \frac{S_H * dpm_{P1}}{dpm_H}$$

In Formel (1) eingesetzt und vereinfacht ergibt sich folgende Formel:

$$(8) \quad J_{rad} = \frac{(dpm_{P1} * V_{t1} / V_{P1} - dpm_{P0} * V_{t0} / V_{P0}) * S_H}{dpm_H * \Delta t * A}$$

3.2.2 HPLC-Analyse von Histamin und 1-Methylhistamin

Histamin wird während seines Übertrittes über das Epithel zu einem großen Teil verstoffwechselt. Um diese Verstoffwechslung untersuchen zu können, reicht die Analyse von radioaktiven Markierungen nicht aus. Denn die Hist-rad-Fluxrate lässt keinen Rückschluss darauf zu, welcher Anteil auch nach dem Epithelübertritt von Histamin ist und welcher Anteil von den ebenfalls radioaktiv markierten Stoffwechselprodukten stammt. Damit eine Unterscheidung zwischen Histamin und seinen Kataboliten möglich wurde, wurden zusätzlich die Fluxraten des nativen Histamins und seines ersten Kataboliten 1-Methylhistamin bestimmt. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür eine HPLC-Methode entwickelt, die es ermöglicht, sowohl Histamin als auch 1-Methylhistamin in derselben Probe zu bestimmen.

3.2.2.1 Standards und Eichreihen

Von Histamin und 1-Methylhistamin wurden Standardlösungen von 10 mM, in 0,1n HCl gelöst, hergestellt. Sie wurden aliquotiert bei -80 °C eingefroren und vor Gebrauch aufgetaut. Die Histamin und 1-MH Standards wurden nach dem Auftauen gemischt und für die Eichreihen linear mit Kaliumphosphat-Puffer (25 mM; pH 7,4) verdünnt (Endkonzentrationen von Histamin bzw. 1-MH: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 5 und 50 µM). Damit wurden die zu erwartenden Konzentrationen aus den Ussingkammerexperimenten abgedeckt. Die Eichreihenlösungen wurden an demselben Tag hergestellt, an dem die Ussingkammerexperimente durchgeführt wurden, so dass sie den gleichen Einfrier- und Auftauzyklen ausgesetzt waren. Dadurch wurde eine Gleichbehandlung der Standard- und Probenlösungen gewährleistet.

3.2.2.2 Chromatographische Trennbedingungen und Detektion

Ziel war es, eine HPLC-Methode zu entwickeln, die geeignet war, ca. 100 Proben pro Versuch zuverlässig und hintereinander messen zu können. In Anlehnung an SAITO et al. (1992) wurde folgendes Protokoll erstellt.

110 µl von den Ussingkammerexperimenten bzw. 110 µl von den Standards wurden mit 10 µl N-Acetylcystein (NAC)-Lösung (100 mg NAC / ml 3 N NaOH) versetzt und in den auf 4 °C gekühlten Autosampler (Waters 717 Autosampler, Eschborn, BRD) gestellt. Von den nun 120 µl wurden 100 µl automatisch auf die HPLC-Säule injiziert. Die Säule war eine EC 125/4 Reprosil-Pur C18 CAQ mit 5µm Partikelgröße und gegenüber alkalischem Puffer bis pH 11 stabil. Zum Schutz der Säule wurde eine Vorsäule aus demselben Material vorgeschaltet: CC 10/4 Reprosil-Pur C18 AQ 5 µm (beide von Trentek, Gerlingen, BRD). Sobald die Probe mit dem Laufmittel in Kontakt trat, kam es zur Derivatisierung und Trennung von Histamin und 1-Methylhistamin. Das Laufmittel enthielt 30 mmol/l $\text{Na}_2\text{Ba}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in HPLC-Wasser gelöst und war mit Methanol im Verhältnis 60:40 (v/v) gemischt. Zusätzlich wurde dem Laufmittel 0,2 mM *ortho*-Phtaldialdehyd (OPA) zugegeben. Die Fließgeschwindigkeit des Laufmittels war 1,5 ml/min (Waters 510 HPLC Pump, Eschborn, BRD). Im Anschluss an die Trennung wurden die Derivate mit einem Fluoreszenzdetektor (Waters 470 Fluorescence Detector, Eschborn, BRD) detektiert (Excitation: 350 nm; Emmision: 450 nm). Um die Trennbedingungen konstant zu halten, wurde die Trennsäule mittels Säulenofen (Jetstream, Firma Thermotechnic Products, Langenzersdorf, Österreich) konstant auf 25 °C temperiert.

3.2.2.3 Verlaufskontrolle

Um den Verlauf der HPLC-Analyse zu überprüfen, wurde vor und nach jeder Probenanalysenreihe immer eine Eichreihe à sechs Konzentrationen analysiert. Alle Eichreihen zeigten eine vergleichbare Linearität, Präzision und Genauigkeit. Anhand ihrer Regressionsgleichungen wurden die Konzentrationen der entsprechenden Proben errechnet wie unter Abschnitt 3.2.2.4 beschrieben.

3.2.2.4 Berechnung der Fluxraten aus den Werten der HPLC-Analyse

Die Formel, um aus den Messwerten der HPLC-Analyse die Fluxrate zu errechnen, wurde auf dieselbe Art hergeleitet, wie die Formel für die aus Radioaktivitätsmesswerten bestimmten Fluxraten. So gilt wieder, dass die Fluxrate die absolute Menge an Teilchen einer Substanz darstellt, die zwischen den Zeitpunkten t_0 und t_1 , die Epithelseite gewechselt hat und abhängig ist von der zur Verfügung stehenden Epithelfläche A und der Zeitdauer zwischen t_0 und t_1 , Δt :

$$(9) \quad J_{HPLC} = \frac{X_1 - X_0}{\Delta t * A}$$

J_{HPLC} , Fluxrate

X_0 , absolute Teilchenmenge in der Ussingkammerhälfte von Histamin bzw. 1-MH zum Zeitpunkt t_0

X_1 , absolute Teilchenmenge in der Ussingkammerhälfte von Histamin bzw. 1-MH zum Zeitpunkt t_1

Δt , Fluxdauer = $t_0 - t_1$

A , Epithelfläche, die für den Flux zur Verfügung steht

Berechnung der absoluten Teilchenmenge bei t_0 :

Zum Zeitpunkt t_0 erfolgt die Probennahme P_0 mit dem Volumen V_{P0} .

Die Probenkonzentration wird mit der HPLC bestimmt und die absoluten Teilchen, auf das verbliebene Gesamtvolumen der Ussingkammerhälfte ($V_{t0} = V_G - 2 * V_{P0}$) bezogen, errechnet.

$$(10) \quad X_0 = K_0 * V_{t0}$$

K_0 , Konzentration von Histamin bzw. 1-MH zum Zeitpunkt t_0

Berechnung der absoluten Teilchenmenge von Histamin bei t_1 :

Zum Zeitpunkt t_1 erfolgt die Probennahme P_1 .

Die Probenkonzentration wird mit der HPLC bestimmt und die absoluten Teilchen auf das Volumen V_{t1} zurück gerechnet, $V_{t1} = V_{t0} + V_A$

V_A , Auffüllvolumen, das nach P_0 zugegeben wurde, um den hydrostatischen Druck zwischen der mukosalen und serosalen Ussingkammerhälfte gleich zu halten.

$$(11) \quad X_1 = K_1 * V_{t1}$$

X_1 = absolute Teilchenmenge von Histamin bzw. 1-MH zum Zeitpunkt t_1

K_1 = Konzentration von Histamin bzw. 1-MH zum Zeitpunkt t_1

Nun können Formel (10) und (11) in Formel (9) eingesetzt werden:

$$(12) \quad J_{HPLC} = \frac{K_1 * V_{t1} - K_0 * V_{t0}}{\Delta t * A}$$

3.3 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Der statistische Vergleich der Ergebnisse begann mit dem Test auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov's Test mit Korrektur nach Lilliefors) und auf Gleichverteilung (Levene's Median Test). Erfüllten die Daten beide Kriterien, so wurden parametrische Tests angewendet. Für den Vergleich zweier Versuchsgruppen wurde der ungepaarte t -Test eingesetzt. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test (SNK) durchgeführt. Fiel der Test auf Normal- und Gleichverteilung negativ aus, so wurden zwei Versuchsgruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-Rangsummentests verglichen. Mehrere Gruppen wurden durch die rangorientierte Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis und dem anschließenden SNK verglichen. Die Wahrscheinlichkeitswerte (P) wurden mit Hilfe der Computer-Software Jandel SigmaStat® 2.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) bzw. Microsoft Excel® 97 (Fa. Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) errechnet. Diese Programme wurden auch für die Ermittlung linearer Korrelationskoeffizienten und der Regressionsparameter (Achsenabschnitt, Steigung) verwendet.

Alle Werte werden als arithmetische Mittelwerte zusammen mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) oder der Standardabweichung (SD) dargestellt. Wahrscheinlichkeitswerte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen und sind entsprechend gekennzeichnet. Höhere Signifikanzniveaus als $P < 0,05$ werden nicht

gesondert angegeben. Die Stichprobenanzahl "n" beziffert die verwendete Anzahl an Epithelien pro Versuch, während "N" die Anzahl der für diese Beobachtung verwendeten Versuchstiere wiedergibt. Die Ergebnisabbildungen wurden mit der Computer-Software Jandel SigmaPlot® 7.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Organischer Kationentransport über isolierte Dickdarmepithelien

Über isolierte Darmepithelien des proximalen Kolons des Schweins wurden die Fluxraten von Cholin und Histamin mit Hilfe der radioaktiven Tracermethode erfasst. Cholin wird als klassische Modellsubstanz in Transportstudien von organischen Kationen verwendet (BUDIMAN et al. 2000; ARNDT et al. 2001). Die Fluxratenmessungen vom organischen Kation Cholin zeigen modellhaft, in welchem Umfang das Kolonepithel organische Kationen transportiert. Bei den Fluxratenmessungen vom organischen Kation Histamin konnte in den zunächst durchgeführten Untersuchungen die intraepitheliale Verstoffwechslung noch nicht berücksichtigt werden, da Histamin beidseits in hoher Konzentration zugegeben wurde. Die gemessenen Radioaktivitätswerte der Histaminfluxraten stellen sowohl Histamin als auch seine Kataboliten dar, die bei der Permeation über das Epithel entstehen. Histamin und seine Kataboliten werden im Folgenden als Hist-rad bezeichnet, zur Unterscheidung vom reinen Histamin, das in späteren Versuchen mit Hilfe der HPLC bestimmt wurde.

4.1.1 Cholintransport in Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten

Durch die beidseitige Zugabe von Cholin in jeweils gleicher Konzentration konnte ein chemischer Gradient als Triebkraft für eine passive Cholindiffusion ausgeschlossen werden. Elektrische Triebkräfte wurden durch den Short-circuit-Modus der Voltage Clamp Anlage ausgeschlossen. Um die Fluxraten erfassen zu können, wurde einer der beiden Kammerhälften zusätzlich 35 kBq ^3H -markiertes Cholin zugegeben. Tritt unter diesen Bedingungen ein Nettofluxraten von Cholin auf, so kann dieser auf aktive Transportprozesse zurückgeführt werden.

Die unidirektionalen Fluxraten nahmen mit zunehmender vorgelegter Konzentration (3, 30, 300 und 3000 μM) zu. Dabei war die SM-Fluxrate von Cholin bei allen vorgelegten Konzentrationen unwesentlich größer als die entsprechende MS-Fluxrate. Daraus resultierte eine geringe Nettosekretion von Cholin, wobei nur bei einer Konzentration von 30 μM der Unterschied zwischen der SM- und der MS-Fluxrate statistisch abgesichert werden konnte ($P < 0,05$; s. Tab. 2).

Tab. 2: Fluxraten von Cholin unter gradientenfreien Bedingungen und bei unterschiedlichen Konzentrationen

Vorgelegte Konzentration von Cholin (μM)	MS-Fluxrate ($\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	SM-Fluxrate ($\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	Netto-Fluxrate ($\text{nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)
3000	129,43 \pm 8,82	138,22 \pm 11,06	-8,78 \pm 16,37
300	9,71 \pm 1,00	11,96 \pm 1,21	-2,25 \pm 1,58
30	0,93 \pm 0,09	1,15 \pm 0,11	-0,22 \pm 0,04 *
3	0,097 \pm 0,005	0,125 \pm 0,016	-0,028 \pm 0,018

Anmerkungen zu Tabelle 2: Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; n = 9, N = 5; * MS- und SM-Fluxrate sind signifikant von einander verschieden, $P < 0,05$; t-Test

4.1.2 Hist-rad-Fluxraten in Abwesenheit eines elektrochemischen Gradienten

Um herauszufinden, ob Histamin über das Dickdarmepithel aktiv transportiert wird, wurde der elektrochemische Gradient, als treibende Kraft für eine passive Histamindiffusion, aufgehoben. Dazu wurde zum Einen im Short-circuit-Modus untersucht und zum Anderen wurden gleiche Mengen (50 μM) an Histamin sowohl auf der mukosalen als auch auf der serosalen Seite vorgelegt. Diese Mengen wurden entweder auf der mukosalen oder auf der serosalen Seite mit 106 kBq ^3H -markiertem Histamin versetzt.

Die Hist-rad-Fluxrate von der serosalen zur mukosalen Seite war signifikant größer als die korrespondierende MS-Fluxrate ($P < 0,05$). Es zeigte sich also beim Hist-rad eine Nettosekretion über das Darmepithel (s. Abb. 5, Kontrolle). Diese Versuchseinstellung ließ jedoch noch keinen Rückschluss auf die Verstoffwechslung von Histamin zu.

4.1.3 Einfluss vom organischen Kation MPP auf die Hist-rad-Fluxraten

Parallel zu den im vorherigen Abschnitt nur mit Histamin behandelten Epithelien wurde weiteren Epithelien zusätzlich 1 mM MPP auf der serosalen Seite zugegeben. MPP ist, ähnlich wie Cholin, ein klassisches Modellkation (GRÜNDEMANN et al. 1997; KOEPESELL et al. 1998), das Histamin von seinen Bindungsstellen an möglichen Transportproteinen verdrängen könnte. Während zwischen den MS-Fluxraten der Kontrolle und den MPP-behandelten Epithelien kein Unterschied zu erkennen war, verringerte sich die SM-Fluxrate nach Zugabe von MPP signifikant ($P < 0,05$; s. Abb. 5).

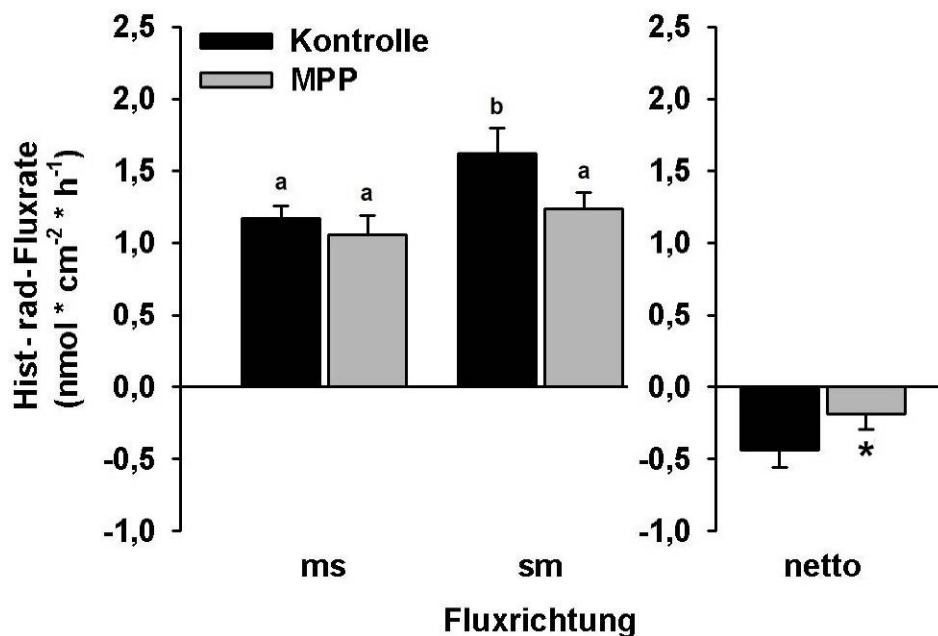


Abb. 5: Hemmung der Hist-rad-Sekretion nach Zugabe von MPP

Als Kontrolle wurden beidseits 50 μ M Histamin vorgelegt. Parallel dazu wurden den Epithelien zusätzlich zum Histamin serosal 1 mM MPP zugegeben.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM; $n = 15$, $N = 7$; unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Graphen kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied [$P < 0,05$; One-way ANOVA on Ranks, SNK]; * kennzeichnet eine signifikant von Null verschiedene Nettofluxrate [$P < 0,05$; t -Test].

4.2 Entwicklung einer HPLC-Methode für die Analyse von Histamin und 1-MH

In den bisher beschriebenen Versuchen wurde die Histaminfluxrate nur mit der Tracermethode bestimmt. Die daraus errechenbare Hist-rad-Fluxrate sagt nichts darüber aus, wie groß die nativen Histaminanteile und die Anteile der Stoffwechselprodukte von Histamin an der Hist-rad-Fluxrate sind. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte nun die Histaminverstoffwechslung näher charakterisiert werden. Dazu war es nötig, eine Methode zu etablieren, die die Analyse von Histamin und seinem ersten Stoffwechselprodukt 1-MH ermöglicht. SAITO et al. (1992) beschrieben eine Methode zur Analyse von Histamin und 1-MH in Nahrungsmitteln, sowie zur Bestimmung von freigesetztem Histamin aus peritonealen Mastzellen bei Ratten. Die Bestimmung von Histamin und 1-MH basiert darauf, dass die beiden Substanzen, während sie über eine reversed phase C18 Säule laufen, sowohl derivatisiert als auch getrennt werden. Die Derivatisierungsmittel *ortho*-Phtaldialdehyd (OPA) und N-Acetylcystein (NAC) wurden im Originalprotokoll von SAITO et al. (1992) direkt in das Laufmittel (Acetonitril: 50 mM

Boraxpuffer, v/v) in einer Konzentration von jeweils 1 mM zugegeben. Die Derivatisierung von Histamin und 1-MH mit OPA und NAC führt dann zu fluoreszierenden Verbindungen, die mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors detektiert werden können. Die HPLC-Methode von SAITO et al. (1992) war in den eigenen Untersuchungen jedoch zum Einen nicht sensitiv genug und lieferte zum Anderen keine reproduzierbaren Ergebnisse. Sie musste daher erheblich modifiziert werden, wobei das endgültige Protokoll im Kap. 3.2.2.2 bereits beschrieben wurde.

4.2.1 Modifizierung der HPLC-Methode von SAITO et al. (1992)

Im Unterschied zu den Aussagen von SAITO et al. (1992) konnte in den eigenen Untersuchungen keine reproduzierbare Quantifizierung von Histamin und 1-MH erreicht werden, wenn OPA und NAC zusammen im Laufmittel gelöst worden waren. Letzteres führte zu einer immer weiter ansteigenden Basislinie, die kein Plateau erreichte und kleinere Peaks maskierte. Der Anstieg der Basislinie konnte auf die Reaktion von OPA, NAC und Acetonitril zu fluoreszierenden Verbindungen zurückgeführt werden. Nach Austausch des Lösungsmittels Acetonitril gegen Methanol war der Anstieg der Basislinie etwas vermindert, jedoch nicht vollständig aufgehoben. Deshalb wurden OPA und NAC getrennt: Das NAC wurde direkt zu den Proben zugegeben und nur das OPA wurde im Laufmittel gelöst. Die weiterhin existierende Interaktion von OPA und NAC resultierte in einem breiten Peak am Anfang des Chromatogramms (wie z.B. in Abb. 6A erkenntlich), die jedoch mit den Histamin- und Methylhistaminpeaks nicht interferierte. Weiterhin konnte die OPA-Konzentration von 1 mM auf 0,2 mM ohne nachteilige Effekte reduziert werden. Die Fließgeschwindigkeit, wurde von 0,5 ml/min auf 1,5 ml/min und das Injektionsvolumen um das 10-fache auf 100 µl erhöht. Durch diese beiden Maßnahmen konnte die Laufzeit auf 11 Minuten gekürzt und die Bestimmungsgrenze deutlich herabgesetzt werden.

Als Puffersubstanz wurde der Boraxpuffer von SAITO et al. (1992) beibehalten. Allerdings konnte die Boraxkonzentration von 50 mM auf 30 mM herabgesetzt werden, ohne dass es zu einer Peakverzerrung kam. Der pH des Laufmittels lag mit 9,1 - 9,3 im alkalischen Bereich und musste nicht gesondert eingestellt werden. SAITO et al. (1992) konnten zeigen, dass es ab einem pH-Wert von $\geq 8,5$ zur Bildung stabiler Fluoreszenzverbindungen kam und keine Änderungen der Peakfläche mehr auftraten.

Auf eine Probenaufbereitung (wie z. B. eine Extraktion aus Gewebematerial) konnte verzichtet werden, da die Pufferproben aus den Ussingkammerexperimenten für eine direkte Analyse mittels HPLC geeignet waren.

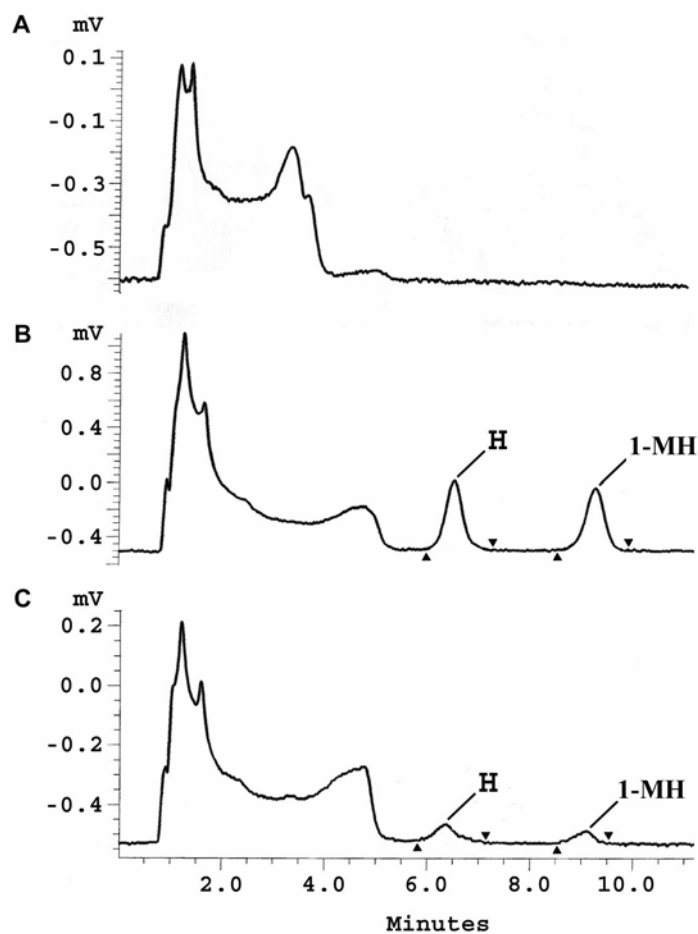


Abb. 6: Beispiele von HPLC-Chromatogrammen

- A) Analyse von reinem Puffer, d.h. von 100 μ l Kalium-Phosphat-Puffer (25 mM; pH 7,4) mit 9,1% (v/v) einer NAC-Lösung (100 mg NAC ad 1 ml 3 N NaOH)
- B) Peaks von je 0,5 μ M Histamin (H) bzw. 1-Methylhistamin (1-MH)
- C) Peaks an der Quantifizierungsgrenze von Histamin bzw. 1-Methylhistamin (je 0,05 μ M)

4.2.2 Validierung der HPLC-Methode

Die Validierung wurde nach den Vorgaben von "Validation of Chromatographic Methods" (SWARTZ und KRULL 1998) und den Empfehlungen von der Konferenz über "Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies" (SHAH et al. 1992) durchgeführt. Die Validierungsschritte sind im Folgenden dargestellt.

4.2.2.1 Spezifität

Die Spezifität einer Methode wird dadurch definiert, dass die interessierende Substanz in der Probenlösung genau und spezifisch gemessen werden kann, vor allem, wenn andere Substanzen in der Probenlösung die Messung des Analyten gegebenenfalls stören könnten (SWARTZ und KRULL 1998).

Um die Spezifität zu überprüfen, wurde eine Probe analysiert, die aus blankem Puffer bestand. Der Puffer war derselbe, wie derjenige, der in der Ussingkammer verwendet wurde. Zum Vergleich wurde auch der Kalium-Phosphat-Puffer analysiert. Parallel zum reinen Puffer wurde jeweils auch Puffer mit Histamin und 1-MH versetzt. Abb. 6A zeigt ein Chromatogramm von reinem Puffer. Der erste, breite Peak resultierte aus der Interaktion zwischen NAC und OPA. Nach ca. 5,5 min konnten jedoch keine interferierenden Peaks endogenen Ursprungs mehr festgestellt werden. Dies war unabhängig davon, ob es sich um den Kalium-Phosphat-Puffer oder den Inkubationspuffer der Ussingkammerversuchen handelte. Abb. 6B zeigt ein Chromatogramm mit einer guten Basislinientrennung zwischen dem Histamin- und dem 1-Methylhistaminpeak. Die Retentionszeiten betragen $6,43 \pm 0,05$ min für Histamin und $9,22 \pm 0,10$ min für 1-MH ($n = 9$). Die beiden Analyten konnten folglich spezifisch und mit sehr guter Trennschärfe in ein und derselben Probe erfasst werden.

4.2.2.2 Linearität

Die Linearität einer Methode erfordert, dass das gemessene Signal einer Substanz, in diesem Fall ist es die Peakfläche, direkt proportional zur der Substanzkonzentration in der Probe ist. Diese Linearität muss innerhalb des Messbereiches gewährleistet sein (SWARTZ und KRULL 1998). Das Detektorsignal wurde über einen Bereich von $0,05 - 0,5$ μM mit sechs Eichlösungsstandards unter den Bedingungen, wie unter Abschnitt 3.2.2.2 beschrieben, gemessen. Die linearen Korrelationskoeffizienten lagen bei $> 0,99$, d. h., dass sowohl die Eichgerade von Histamin, als auch die von 1-MH eine ausgezeichnete Linearität zeigte.

Das Verhältnis zwischen der Peakfläche (y_{H} , $y_{\text{1-MH}}$) und der Konzentration von Histamin oder 1-MH (x_{H} , $x_{\text{1-MH}}$; in μM) konnte mit den in Tabelle 3 aufgeführten linearen Regressionsgleichungen beschrieben werden.

Tab. 3: Lineare Regressionsgleichungen der Eichgeraden von Histamin und 1-MH

Substanz	Eichgerade	Korrelationskoeffizient (r)	n
Histamin	$y_H = (21.392 \pm 484)x_H + (355 \pm 147)$	0,999	9
1-Methylhistamin	$y_{1-MH} = (21.581 \pm 283)x_{1-MH} + (144 \pm 86)$	1,000	9

Anmerkungen zu Tabelle 3: Die angegebenen Werte repräsentieren MW \pm SD von 9 unabhängigen Eichgeraden

x_H ; x_{1-MH} = Peakfläche von Histamin bzw. 1-Methylhistamin

y_H ; y_{1-MH} = Histamin bzw. 1-Methylhistaminkonzentration

Die y-Achsenabschnitte waren nicht signifikant von Null verschieden. Die Steigungen waren für Histamin und 1-Methylhistamin gleich (Abb. 7), was auf eine gleich gute Derivatisierung der beiden Substanzen hindeutete.

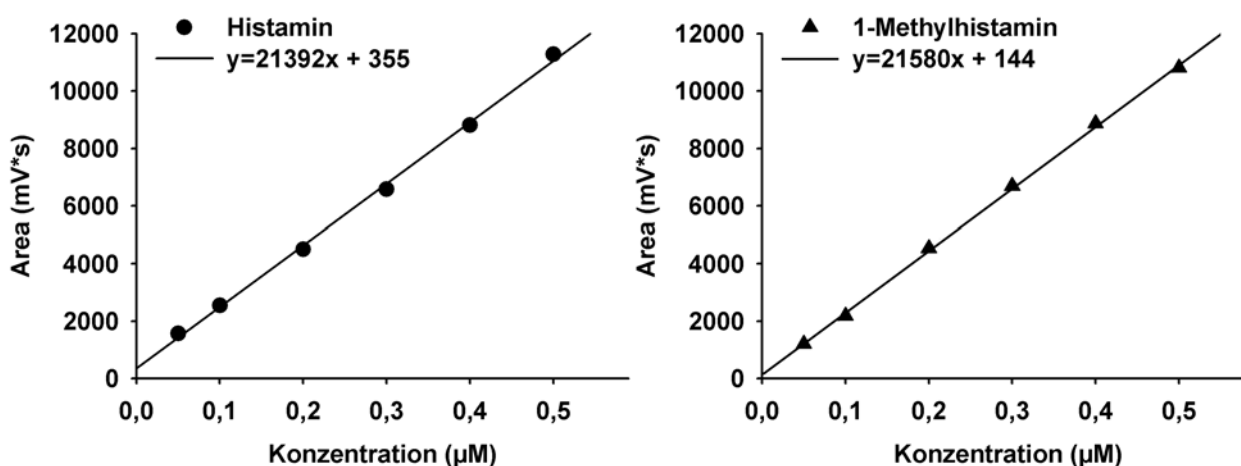


Abb. 7: Beispiel einer Eichgeraden von Histamin und 1-MH über einen Konzentrationsbereich von 0,05 - 0,5 μ M

Dargestellt sind die Mittelwerte; SD sind kleiner als die gezeigten Symbole; n = 9 für jede Konzentration.

4.2.2.3 Präzision und Genauigkeit

Die Wiederholbarkeit einer analytischen Messung wird als Präzision bezeichnet; sie wird durch die relative Standardabweichung (RSD, relative standard deviation [%]) ausgedrückt. Die Genauigkeit ist ein Maß für die Exaktheit einer HPLC Methode, in dem sie den Unterschied zwischen der eingewogenen und der gemessenen Substanzkonzentration darstellt; sie wird durch den relativen Fehler der Quantifizierung (RE, relative error [%] of quantification) ausgedrückt (SWARTZ und KRULL 1998).

Sowohl Präzision als auch Genauigkeit wurden über wiederholte Messungen von Histamin- und 1-Methylhistamineichstandards ($n = 3$ für jede Konzentration) bestimmt. Die Mehrfachmessungen wurden entweder an einem Tag zur Bestimmung der Intratagesvariabilität oder an drei aufeinander folgenden Tagen zur Bestimmung der Intertagesvariabilität durchgeführt. Nach SHAH et al. (1992), sollten die relative Standardabweichung (RSD [%]) und der relative Fehler (RE [%]) 15 % nicht überschreiten. Nur nahe an der Quantifizierungsgrenze (LOQ, limit of quantification) wird eine Abweichung von 20 % akzeptiert (SHAH et al. 1992). Diesen Anforderungen wird die Methode gerecht (s. Tab. 4 und 5, in denen die Ergebnisse für die Intra- und Intertagesvariabilität dargestellt sind).

Tab. 4: Intratagesvariabilität der Histamin- und 1-Methylhistaminbestimmung

Eingewogene Konzentration (μM)	Gemessene Konzentration (μM) ^a	RSD [%] ^b	RE [%] ^c
Histamin			
0,2	0,219 \pm 0,007	3,21	9,59
0,3	0,317 \pm 0,006	2,02	5,58
0,5	0,527 \pm 0,004	0,67	5,42
1-Methylhistamin			
0,2	0,213 \pm 0,026	12,30	6,25
0,3	0,321 \pm 0,014	4,43	6,95
0,5	0,535 \pm 0,032	6,00	6,94

Anmerkungen zu Tabelle 4: ^a Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SD von 3 Messungen am selben Tag

^b Relative Standardabweichung

^c Relativer Fehler

Tab. 5: Intertagesvariabilität der Histamin- und 1-Methylhistaminbestimmung

Eingewogene Konzentration (μM)	Gemessene Konzentration (μM) ^a	RSD [%] ^b	RE [%] ^c
Histamin			
0,3	0,292 \pm 0,011	3,63	-2,54
0,4	0,387 \pm 0,008	2,18	-3,36
0,5	0,454 \pm 0,007	1,48	-9,24
1-Methylhistamin			
0,3	0,328 \pm 0,040	12,12	9,44
0,4	0,434 \pm 0,041	9,34	8,43
0,5	0,518 \pm 0,059	11,38	3,65

Anmerkungen zu Tabelle 5: ^a Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SD von 3 Messungen an 3 aufeinanderfolgenden Tagen

^b Relative Standardabweichung

^c Relativer Fehler

4.2.2.4 Quantifizierungsgrenze

Abbildung 6C zeigt ein Chromatogramm an der Bestimmungsgrenze von Histamin (H) und 1-MH. Die Quantifizierungsgrenze betrug 0,05 μM , da bei dieser Konzentration das Signal-Rausch-Verhältnis bei 10:1 lag.

4.3 Endogene Freisetzung von Histamin und 1-MH

Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass die Epithelien Histamin aus Mastzellen während der Inkubation in den Ussingkammern freisetzen (AHRENS et al. 2002; ASCHENBACH et al. 2002). Um die endogene Freisetzung von Histamin und gegebenenfalls von 1-MH erfassen zu können, wurden Epithelien ohne Histaminvorlage zeitparallel zu den Versuchsgruppen, denen Histamin vorgelegt worden war, inkubiert. Die Proben wurden mit der neu entwickelten HPLC-Methode (s. Abschnitt 3.2.2) analysiert. Eine Histaminfreisetzung konnte sowohl mukosal ($0,18 \pm 0,12 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$; $n = 6$; $N = 6$) als auch serosal ($0,20 \pm 0,05 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$; $n = 6$; $N = 6$) nachgewiesen werden, wobei unter Kontrollbedingungen kein Unterschied zwischen mukosaler und serosaler

Freisetzung von Histamin zu erkennen war. Im Gegensatz dazu konnte 1-MH ausschließlich in den Proben der serosalen Seite ($0,13 \pm 0,11 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$; $n = 6$; $N = 6$) nachgewiesen werden (s. auch Abb. 9, Kontrolle). Im Folgenden wurden die Fluxraten von reinem Histamin und die Appearance von 1-MH immer um deren entsprechende endogene Freisetzung korrigiert.

4.4 Permeation von Histamin über isolierte Dickdarmepithelien

4.4.1 Histaminsekretion

Die HPLC-Analyse ermöglichte es zu überprüfen, ob die Sekretion, die sich bei der Hist-rad-Fluxrate zeigte (s. Abb. 5), auch auf eine Sekretion vom nativen Histamin zurückzuführen ist. Da die Histamin- und die Hist-rad-Fluxraten in MS- und in SM-Richtung jeweils an gepaarten Epithelien gemessen wurden (Definition s. Kap. 3.1.2.3), war ein Vergleich zwischen beiden Fluxrichtungen möglich. Die Abbildung 8 zeigt, dass die Histaminfluxrate in SM-Richtung signifikant höher als die Histaminfluxrate in die MS-Richtung war ($P < 0,05$). Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass natives Histamin vom Dickdarmepithel sezerniert wird (s. Abb. 8).

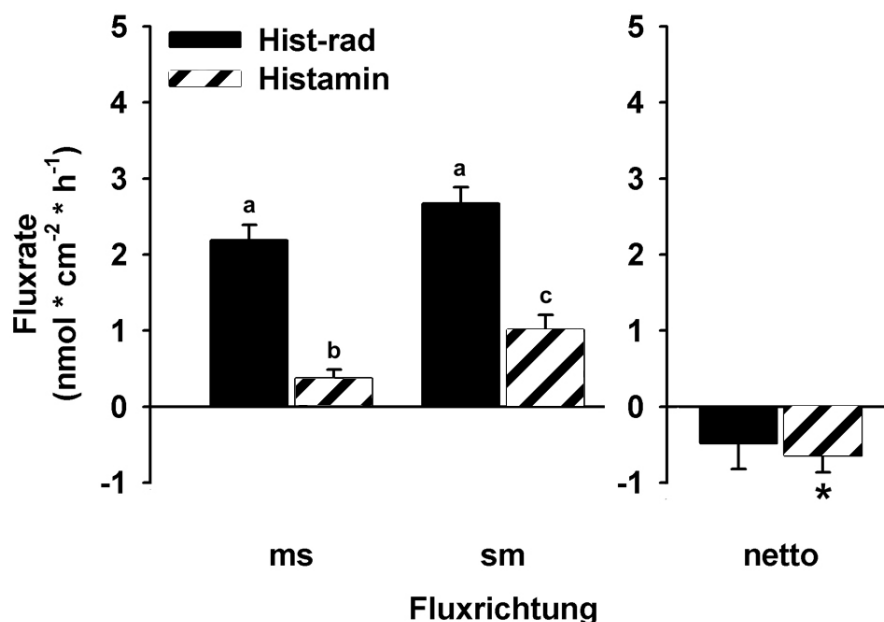


Abb. 8: Fluxraten von Hist-rad und Histamin über das Dickdarmepithel

Es wurden entweder mukosal oder serosal 100 μM Histamin vorgelegt. Die Histaminfluxrate wurde um die entsprechende endogene Freisetzung korrigiert.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM; $n = 9$, $N = 7$; unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Graphen kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied [$P < 0,05$; One-way ANOVA, SNK]; * kennzeichnet eine signifikant von Null verschiedene Nettofluxrate [$P < 0,05$; t -Test].

4.4.2 Umfang der Histaminverstoffwechslung während der Permeation über isolierte Dickdarmepithelien

Während seiner Permeation über das Dickdarmepithel wird Histamin zum Teil enzymatisch abgebaut. So war unter Kontrollbedingungen die Hist-rad-Fluxrate in beiden Fluxrichtungen größer als die entsprechende Histaminfluxrate ($P < 0,05$). Die Differenz zwischen der Hist-rad-Fluxrate und der Histaminfluxrate entspricht der Verstoffwechslungsrate von Histamin bei seiner Permeation über das Epithel. In der MS-Fluxrichtung wurde Histamin zu $77,7 \pm 10,9$ % verstoffwechselt. In der SM-Fluxrichtung lag die Verstoffwechslungsrate von Histamin bei $64,1 \pm 7,2$ % (s. Abb. 8).

4.5 Verstoffwechslung von Histamin und daran beteiligte Enzyme

Für die Verstoffwechslung von Histamin werden vor allem zwei Enzyme verantwortlich gemacht: die Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) und die Diaminoxidase (DAO). In den folgenden Experimenten wurde untersucht inwieweit diese beiden Enzyme eine Rolle bei der Histaminverstoffwechslung in isolierten Dickdarmepithelien spielen.

4.5.1 Einfluss von Amodiaquin und Aminoguanidin auf die endogene Freisetzung von Histamin und 1-MH

Da Amodiaquin (AD) bzw. Aminoguanidin (AG), Hemmstoffe der HNMT bzw. der DAO, prinzipiell die endogene Freisetzung von Histamin und 1-MH beeinflussen können, wurden einige Epithelien mukosal und serosal mit jeweils $100 \mu\text{M}$ AD bzw. AG versetzt. Die Abbildung 9A zeigt, dass es hinsichtlich der mukosalen Histaminfreisetzung innerhalb der Dauer einer Fluxperiode keinen Unterschied zwischen der Kontrolle und den mit AD oder AG behandelten Epithelien gab. Hinsichtlich der serosalen Histaminfreisetzung war diese bei den Epithelien mit AD oder AG gegenüber der Kontrolle tendenziell erhöht. Aufgrund der hohen Standardabweichung liess sich diese Erhöhung aber nicht statistisch absichern. Abbildung 9B stellt die endogene Freisetzung von 1-MH dar. 1-MH wurde, wie bei den Kontrollepithelien, nur auf der serosalen Epithelseite freigesetzt, unabhängig davon, ob den Epithelien AD oder AG zugegeben worden war. Dabei führte die Zugabe von AG zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von 1-MH gegenüber der Kontrolle ($P < 0,05$).

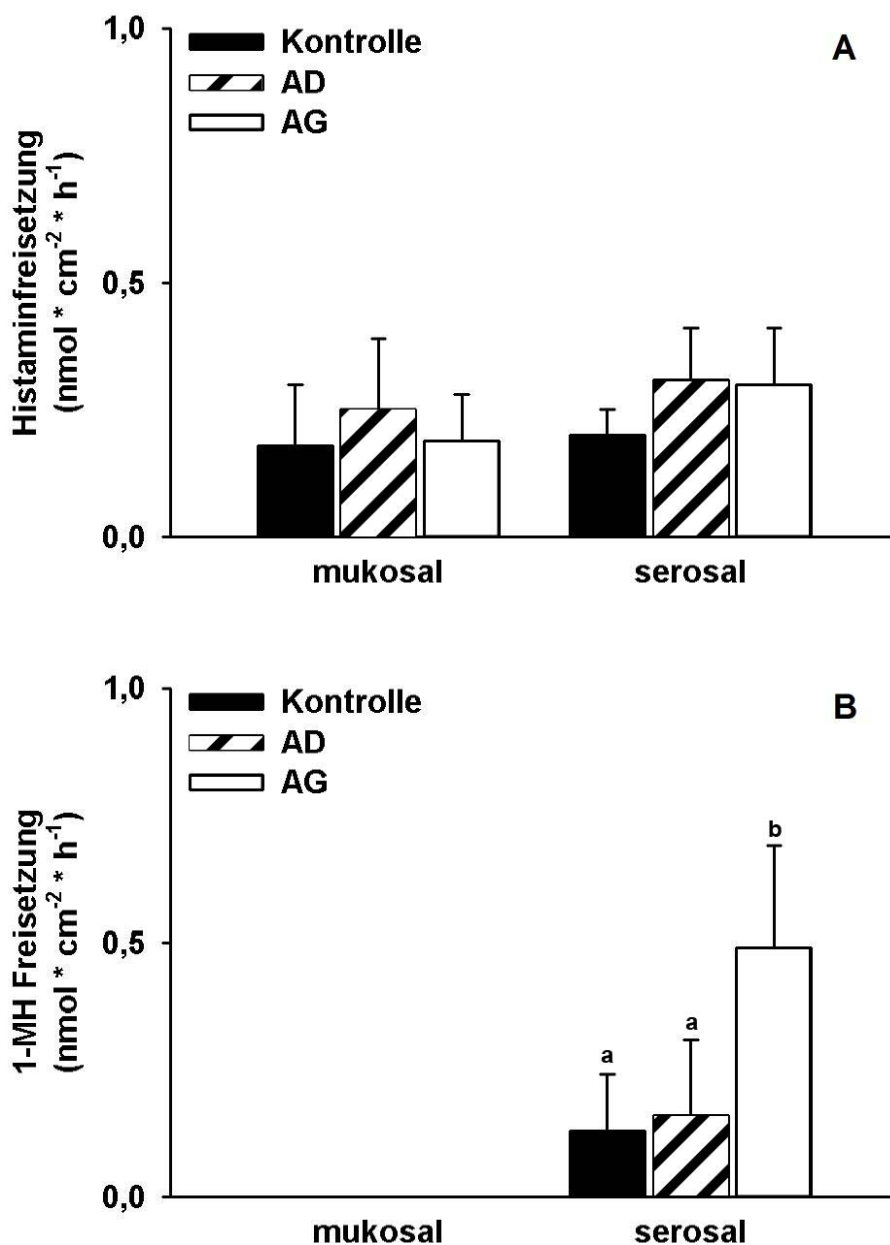


Abb. 9: Endogene Freisetzung von A) Histamin und B) 1-MH in An- oder Abwesenheit von Amodiaquin oder Aminoguanidin

Als Kontrolle dienten Epithelien, denen weder AD noch AG zugesetzt worden war. Parallel dazu wurde den Epithelien beidseitig $100 \mu\text{M}$ Amodiaquin bzw. Aminoguanidin zugegeben.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM; $n = 6$, $N = 6$; unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Graphen kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied [$P < 0,05$; RM ANOVA on Ranks, SNK].

4.5.2 Einfluss von Amodiaquin und Aminoguanidin auf die Verstoffwechslung von exogenem Histamin

Um herauszufinden, zu welchem Anteil die beiden Enzyme HNMT und DAO an der Verstoffwechslung von exogenem Histamin beteiligt sind, wurde in parallelen Ansätzen einigen Epithelien AD (Hemmstoff der HNMT) bzw. AG (Hemmstoff der DAO) zugesetzt.

Bei den Epithelien, die mit AD behandelt wurden, stiegen die Histaminfluxraten in beiden Fluxrichtungen signifikant gegenüber der Kontrolle an, so dass die Histaminverstoffwechslung von $81,6 \pm 7,9 \%$ auf $54,4 \pm 8,9 \%$ (in MS-Richtung) bzw. von $77,4 \pm 7,8 \%$ auf $52,3 \pm 4,6 \%$ (in SM-Richtung) sank ($P < 0,05$; s. Abb. 10). Die serosale Appearance von 1-MH war nach mukosalem Histaminzusatz unter der Wirkung von AD signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt ($P < 0,05$; s. Abb. 10A).

Die Behandlung mit AG führte dazu, dass die Histaminfluxrate in MS-Richtung zwar signifikant zur Kontrolle anstieg ($P < 0,05$), aber dennoch signifikant erniedrigt gegenüber den Epithelien blieb, die mit AD behandelt worden waren ($P < 0,05$). Die Verstoffwechslungsrate betrug unter der Einwirkung von AG $75,0 \pm 7,1 \%$ in MS-Richtung. In SM-Richtung sank die Verstoffwechslungsrate auf $48,8 \pm 13,9 \%$ und war damit signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt ($P < 0,05$), aber nicht signifikant unterschiedlich zu den Epithelien, denen AD zugesetzt worden war (s. Abb. 10). Die serosale 1-MH-Appearance stieg nach mukosalem Histaminzusatz bei den Epithelien, die mit AG behandelt worden waren, auf das 2,5-fache an im Vergleich zur Kontrolle. Die Appearance von 1-MH war damit unter der Einwirkung von AG signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht ($P < 0,05$; s. Abb 10A).

1-MH konnte auch nach serosaler Histaminzugabe ausschließlich serosal bestimmt werden. Dabei war die serosale Appearance von 1-MH nach Zugabe von AD signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt ($P < 0,05$). Nach der Zugabe von AG stieg die serosale Appearance von 1-MH um das 1,4-fache an im Vergleich zur Kontrolle ($P < 0,05$). Die serosale 1-MH Appearance war nach serosaler Zugabe von Histamin sowohl bei den Kontrollepithelien als auch nach Zugabe von AD oder AG signifikant größer im Vergleich zur jeweiligen 1-MH Appearance nach mukosaler Histaminzugabe ($P < 0,05$; s. Abb. 11).

Die Hist-rad-Fluxraten unterschieden sich nicht signifikant innerhalb der Behandlungsgruppen (s. Abb. 10).

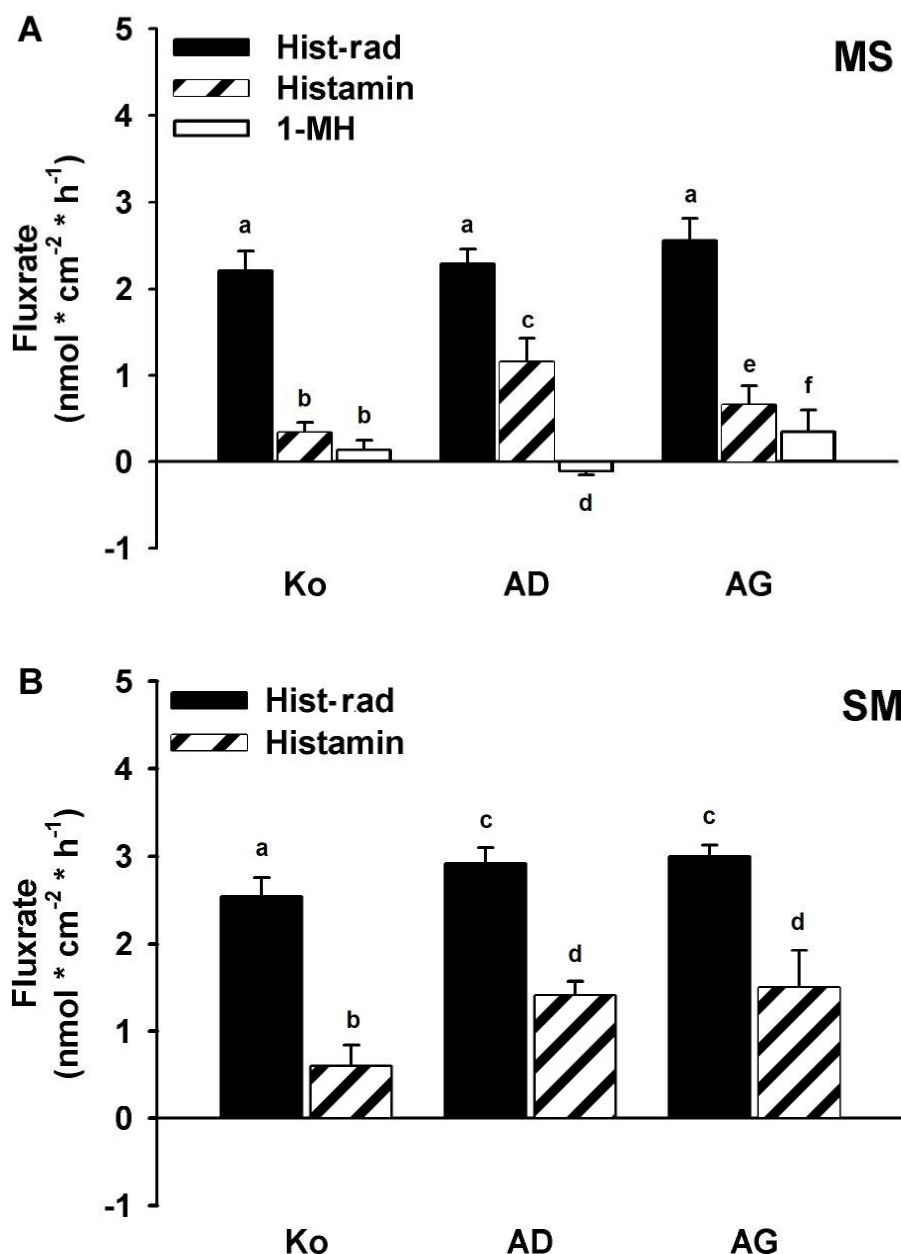


Abb. 10: Hist-rad-Fluxraten, Histaminfluxraten und die serosale Appearance von 1-MH unter dem Einfluss von Amodiaquin bzw. Aminoguanidin A) nach mukosaler Vorlage bzw. B) nach serosaler Vorlage von Histamin

Als Kontrolle wurden mukosal 100 μ M Histamin vorgelegt. Parallel dazu wurden den Epithelien beidseitig 100 μ M Amodiaquin bzw. Aminoguanidin zugegeben. Die Histaminfluxrate und die 1-MH-Appearance wurden um die entsprechenden endogenen Freisetzungen korrigiert.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM; n = 12, N = 7; unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Graphen kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied [P < 0,05; One-way ANOVA on Ranks, SNK].

In der Abbildung 10B ist die Appearance von 1-MH für die SM-Fluxrichtung nicht dargestellt, da sich die Fluxraten in der SM-Richtung aus den Proben der mukosalen Seite ergeben. 1-MH wurde jedoch ausschließlich serosal gefunden, weswegen die Appearance von 1-MH nur in der MS-Fluxrichtung zusammen mit der Hist-rad- und der Histaminfluxrate dargestellt ist.

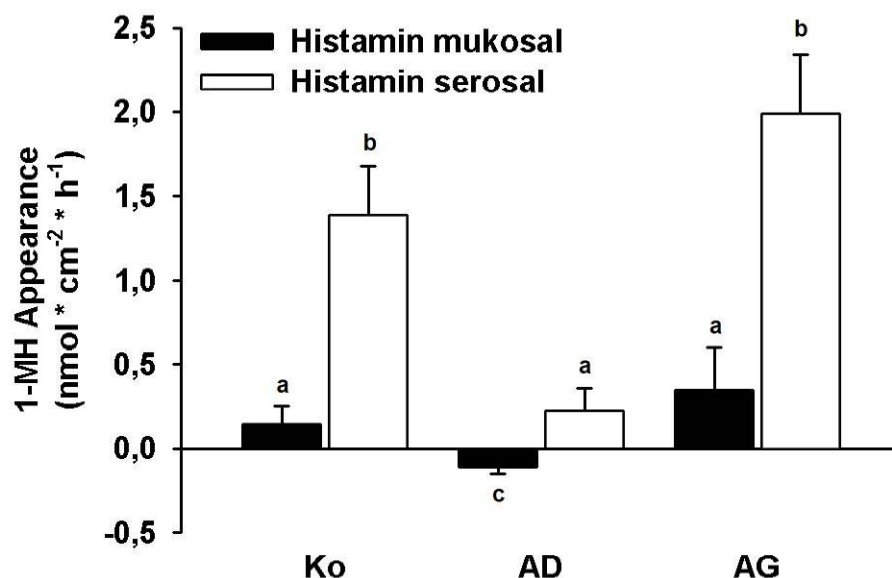


Abb. 11: Serosale Appearance von 1-MH unter dem Einfluss von Amodiaquin bzw. Aminoguanidin nach mukosaler bzw. serosaler Vorlage von Histamin

Als Kontrolle wurden mukosal bzw. serosal 100 μ M Histamin vorgelegt. Parallel dazu wurden den Epithelien beidseitig 100 μ M Amodiaquin bzw. Aminoguanidin zugegeben. Die 1-MH-Appearance wurde um die entsprechende endogene Freisetzung korrigiert.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM; $n = 12$, $N = 7$; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied [$P < 0,05$; One-way ANOVA on Ranks, SNK].

4.6 Intraepitheliale Kompartimentierung der Histaminverstoffwechslung

Bei der HPLC-Analyse fiel auf, dass die Konzentration von 1-MH in der serosalen Inkubationslösung der zweiten Probenahme (170 ± 30 nmol/l; $n = 12$, $N = 7$) im Vergleich zur ersten Probenahme (40 ± 10 nmol/l; $n = 12$, $N = 7$) sprunghaft angestiegen war. Bei beiden Proben stand dem Epithel 60 min lang exogenes Histamin von serosal zur Verfügung. Der sprunghafte Anstieg könnte daran gelegen haben, dass 1-MH erst intrazellulär angereichert wurde, bevor es zur serosalen Freisetzung kam. Eine intrazelluläre Anreicherung könnte beispielsweise in Vesikeln erfolgen, was wiederum für die Verstoffwechslung bedeutsam sein könnte, da die DAO in Vesikeln gespeichert wird

(SCHWELBERGER et al. 1999). Um zu überprüfen, ob der vesikuläre Transport bei der intraepithelialen Histaminverstoffwechslung von Bedeutung ist, wurde N-Ethylmaleimid (NEM) einigen Epithelien zugesetzt. NEM verhindert die Fusion von Vesikeln untereinander und mit der Zellmembran (BLOCK et al. 1988; BECKERS et al. 1989) und hemmt damit den vesikulären Transport.

4.6.1 Einfluss von NEM auf die endogene Freisetzung von Histamin und 1-MH

Da AG, NEM und AG plus NEM prinzipiell auf die endogene Freisetzung von Histamin und 1-MH einwirken können, wurden Epithelien ohne Histaminvorlage zeitparallel zu den Versuchsgruppen, denen Histamin vorgelegt worden war, inkubiert. Neben der Kontrolle für die endogene Freisetzung wurde einigen Epithelien mukosal und serosal jeweils AG, NEM oder AG plus NEM zugesetzt. Die Abbildung 12A zeigt, dass die mukosale endogene Freisetzung von Histamin nicht signifikant von den zugegebenen Substanzen beeinflusst worden ist. Tendenziell lässt sich eine erhöhte Freisetzung von Histamin bei den Epithelien beobachten, die AG plus NEM zugesetzt bekommen haben. Aufgrund der hohen Standardabweichung konnte diese Erhöhung nicht statistisch abgesichert werden.

Bei der endogenen Freisetzung von Histamin auf der serosalen Seite fällt auf, dass durch NEM die Freisetzung von Histamin geringer ausfällt als bei der Kontrolle ($P < 0,05$). Wurde jedoch zusätzlich zum NEM AG zugegeben, erhöhte sich die Freisetzung von Histamin tendenziell gegenüber der Kontrolle (s. Abb. 12A).

In Abbildung 12B ist die endogene Freisetzung von 1-MH dargestellt. 1-MH wurde wieder nur auf der serosalen Epithelseite freigesetzt. Es war kein Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen bezüglich der endogenen Freisetzung von 1-MH zu erkennen.

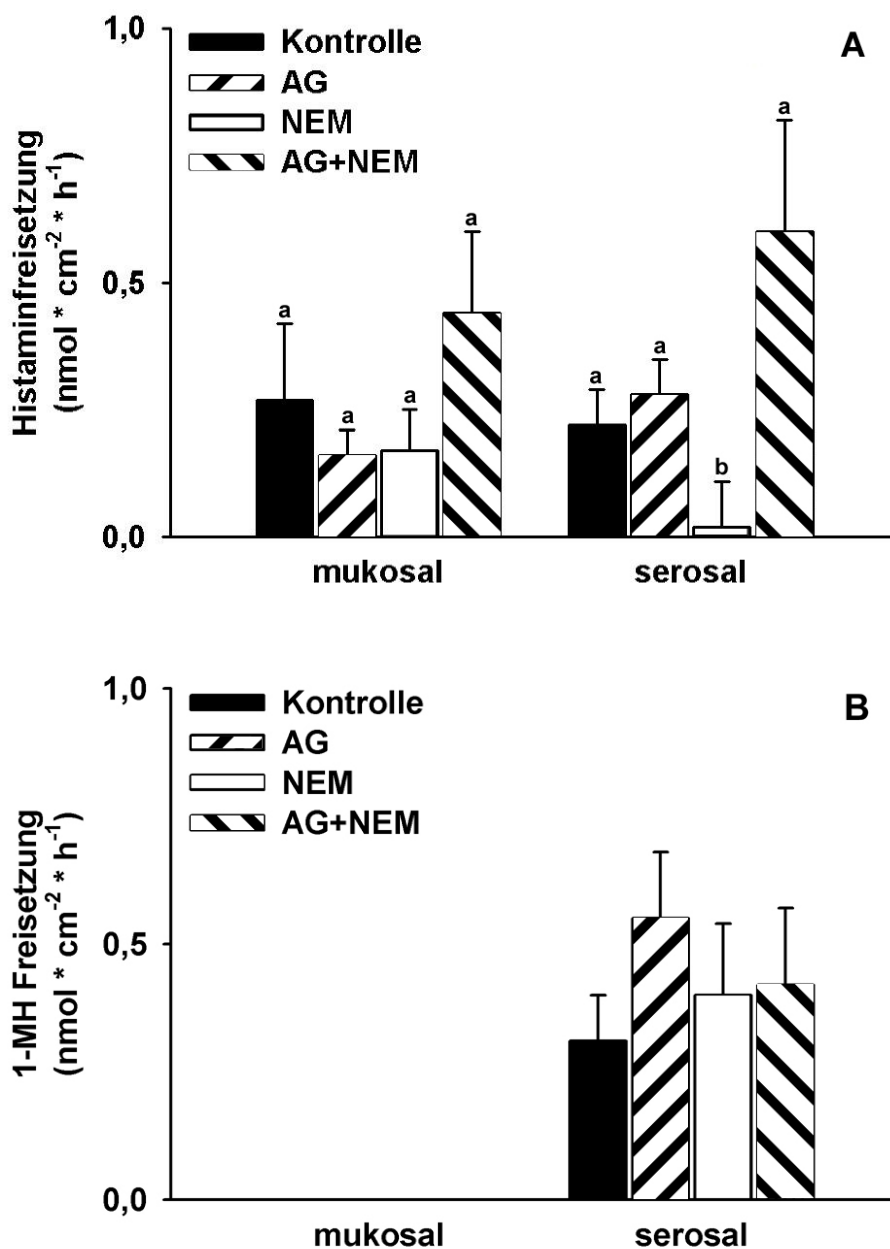


Abb. 12: Endogene Freisetzung von A) Histamin oder B) 1-MH in An- oder Abwesenheit von Aminoguanidin, NEM oder NEM plus Aminoguanidin

Als Kontrolle wurden Proben von Epithelien genommen, die nicht behandelt worden waren. Parallel dazu wurden den Epithelien beidseitig 100 μ M Aminoguanidin, 1 mM NEM oder 100 μ M Aminoguanidin plus 1 mM NEM zugegeben.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM; n = 9, N = 9; unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Graphen kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied [P < 0,05; One-way ANOVA on Ranks, SNK].

4.6.2 Wirkung von NEM auf den Transport von Histamin und 1-MH

In beiden Fluxrichtungen waren die Hist-rad-Fluxraten der einzelnen Behandlungsgruppen nicht signifikant voneinander verschieden. Die Hist-rad-Fluxrate war bei allen Versuchsgruppen sowohl in der MS- als auch in der SM-Fluxrichtung signifikant größer als die entsprechende Histaminfluxrate ($P < 0,05$; s. Abb. 13).

Unter Kontrollbedingungen lag der Histaminanteil an der Hist-rad-Fluxrate bei $21,6 \pm 11,4$ % in der MS-Fluxrichtung und bei $34,6 \pm 13,9$ % in der SM-Richtung. 1-MH wurde wiederum nur in den Proben der serosalen Seite gefunden. Dabei lag bei der Kontrolle der Anteil von 1-MH an der Hist-rad-Fluxrate in der MS-Richtung bei $7,4 \pm 8,1$ %. Wurde Histamin serosal zugegeben, stieg die Appearance von 1-MH bei der Kontrolle signifikant gegenüber der mukosalen Histaminzugabe an ($P < 0,05$; s. Abb. 14).

Die Zugabe von AG bewirkte, dass die Histaminfluxrate sowohl in der MS- als auch in der SM-Fluxrichtung signifikant gegenüber der Kontrolle anstieg ($P < 0,05$). Die Appearance von 1-MH stieg dabei tendenziell an, unabhängig davon ob Histamin mukosal oder serosal zugegeben worden war (s. Abb. 14).

Durch die Zugabe von NEM kam es zu signifikant erniedrigten Histaminfluxraten in beiden Fluxrichtungen im Vergleich zur Kontrolle und den mit AG behandelten Epithelien ($P < 0,05$; s. Abb. 13). Die Appearance von 1-MH sank ebenfalls signifikant gegenüber der Kontrolle und den mit AG behandelten Epithelien auf Nullniveau ab ($P < 0,05$). Dies war unabhängig davon, ob Histamin mukosal oder serosal zugegeben worden war (s. Abb. 13 und Abb. 14).

Bei den Epithelien, die mit AG und NEM behandelt worden waren, kam es zu einem signifikanten Anstieg der Histaminfluxrate im Vergleich zur Kontrolle sowohl in MS- als auch in SM-Richtung ($P < 0,05$; s. Abb. 13). Dagegen blieb die Appearance von 1-MH gegenüber der Kontrolle und den mit AG behandelten Epithelien signifikant erniedrigt ($P < 0,05$). Ob Histamin mukosal oder serosal zugegeben worden war, hatte darauf keinen Einfluss (s. Abb. 14).

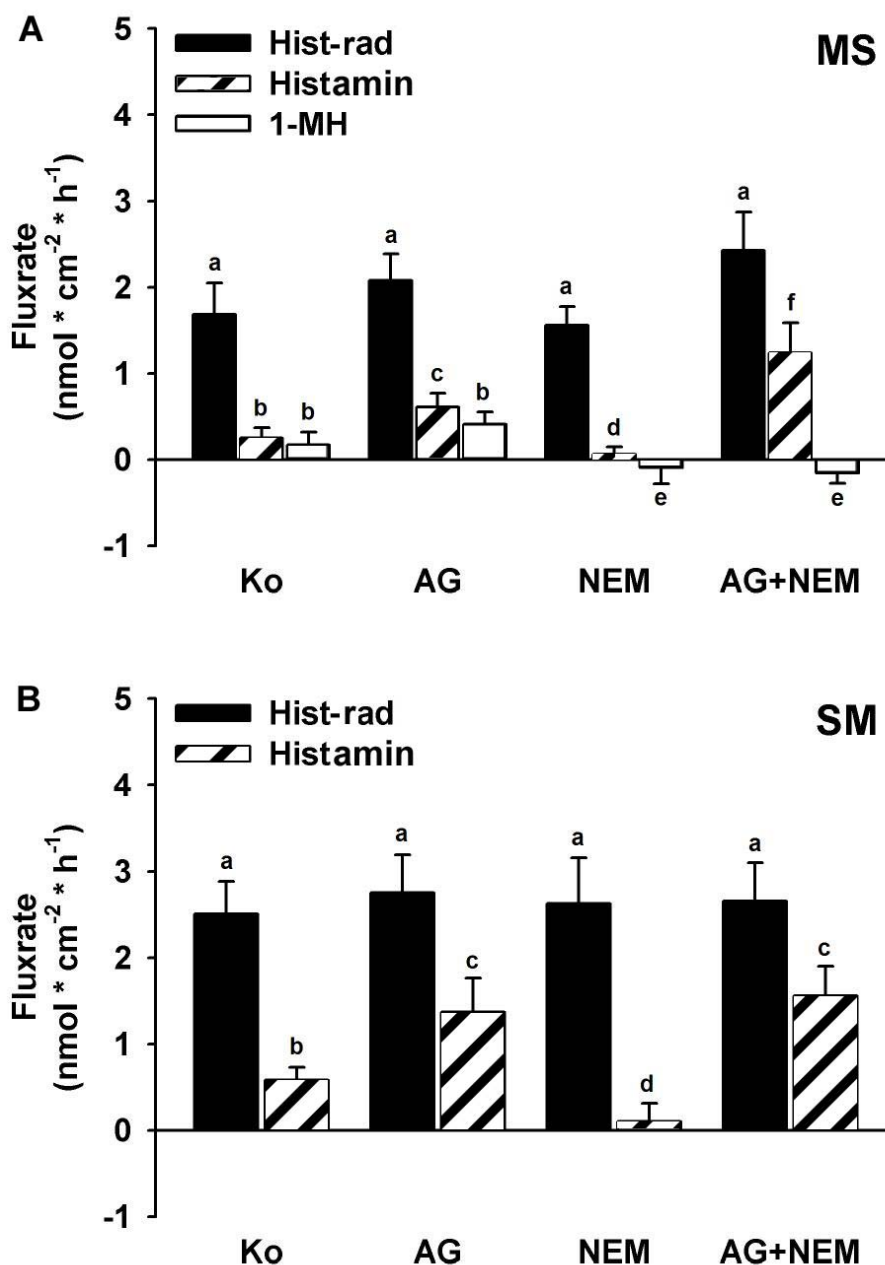


Abb. 13: Hist-rad-Fluxraten, Histaminfluxraten und die Appearance von 1-MH unter dem Einfluss von Aminoguanidin, NEM oder Aminoguanidin und NEM zusammen A) nach mukosaler bzw. B) nach serosaler Vorlage von Histamin

Als Kontrolle wurden mukosal 100 μ M Histamin vorgelegt. Parallel dazu wurden den Epithelien beidseitig 100 μ M Aminoguanidin, 1 mM NEM oder 100 μ M Aminoguanidin plus 1 mM NEM zugegeben. Die Histaminfluxraten und die 1-MH-Appearance wurden um die entsprechenden endogenen Freisetzungen korrigiert.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM; n = 9, N = 9; unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Graphen kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied [P < 0,05; One-way ANOVA on Ranks, SNK].

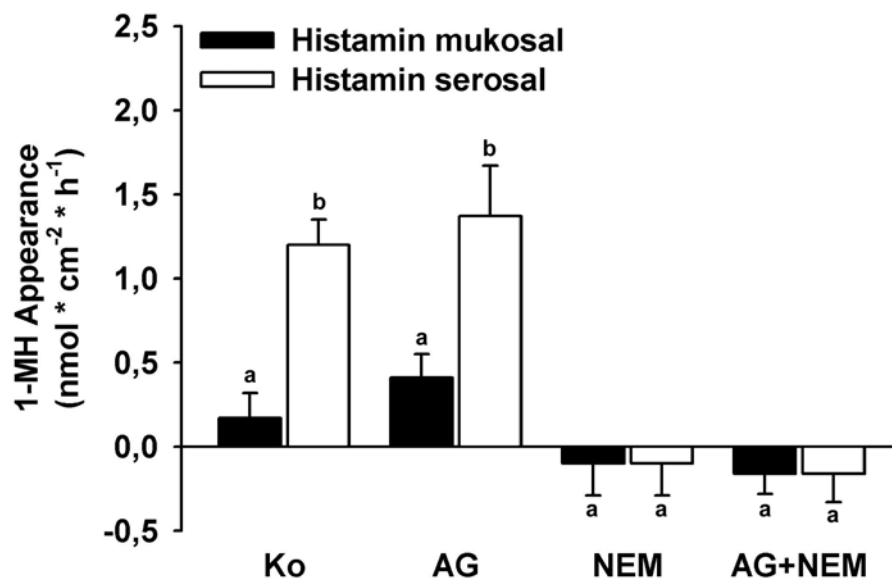


Abb. 14: Gegenüberstellung der serosalen 1-MH-Appearance nach mukosaler bzw. serosaler Vorlage von Histamin

Als Kontrolle wurden mukosal oder serosal 100 μ M Histamin vorgelegt. Parallel dazu wurden den Epithelien beidseitig 100 μ M Aminoguanidin, 1 mM NEM oder 100 μ M Aminoguanidin plus 1 mM NEM zugegeben. Die 1-MH-Appearance wurde um die entsprechenden endogenen Freisetzungen korrigiert.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM; n = 9, N = 9; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied [P < 0,05; RM ANOVA on Ranks, SNK].

5 Diskussion

5.1 HPLC-Analyse

Die Tracermethode lässt keine Unterscheidung zwischen Histamin und seinen Stoffwechselprodukten zu, da die Tritium-Markierung vom Histamin auf seine Abbauprodukte übergeht. Für die Untersuchung der Histaminfluxraten und der Histaminverstoffwechslung ist diese Unterscheidung jedoch nötig. Daher wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine HPLC-Methode entwickelt, die eine getrennte Bestimmung von Histamin und 1-MH ermöglichte. Von den verschiedenen Kataboliten wurde 1-MH deshalb gewählt, weil es ausschließlich durch HNMT-katalysierte Methylierung entsteht.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten Histamin und 1-MH zu bestimmen. Eine einfache und empfindliche Methode ist der Radioimmunoassay (RIA) (EZEAMUZIE et al. 1990). Allerdings ist der RIA für die Bestimmung von 1-MH kommerziell nicht mehr erhältlich. Eine andere Methode besteht darin, Histamin und 1-MH mit Hilfe der Gaschromatographie nachzuweisen. Dafür müssen die beiden Substanzen jedoch in einen flüchtigen Zustand überführt werden. Dies wird dadurch erreicht, dass Histamin und 1-MH derivatisiert werden, was dann allerdings ein relativ großes Probenvolumen erfordert (5 ml; MARTENS-LOBENHOFFER und NEUMANN 1999). Zusätzlich liegt die untere Bestimmungsgrenze bei der Gaschromatographie im mikromolaren Bereich (MARTENS-LOBENHOFFER und NEUMANN 1999). Dagegen benötigt die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion ein geringeres Probenvolumen (30 µl; SAITO et al., 1992). Die Bestimmungsgrenze liegt zudem im nanomolaren Bereich. Die HPLC-Methode von SAITO et al. (1992) schien für die eigenen Untersuchungen besonders geeignet, da durch die on-line Derivatisierung eine minimale Probenvorbereitung zu erwarten war. Allerdings musste das ursprüngliche Protokoll von SAITO et al. (1992) erheblich modifiziert werden (Methanol statt Acetonitril, reduzierte Borax-Pufferkonzentration und reduzierte OPA-Konzentration im Laufmittel und die Trennung der Derivatisierungsmittel OPA (im Laufmittel) und NAC (in den Proben); s. Abschnitt 4.2.1). Die Validierung nach SHAH et al. (1992) und SWARTZ und KRULL (1998) ergab, dass die Intra- und Intertagesvariabilität innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen waren. Zusammengefasst, es konnte eine einfache, präzise und genaue HPLC-Methode etabliert werden, die eine zügige, quantitative Bestimmung von Histamin und 1-MH in

Pufferlösungen erlaubt.

5.2 Organischer Kationentransport über isolierte Dickdarmepithelien

Anhand der radioaktiv gemessenen Fluxraten in Abwesenheit von Gradienten konnte gezeigt werden, dass das Dickdarmepithel Cholin in der SM-Richtung nur marginal mehr transportiert als in der MS-Richtung (s. Tab. 2). Da der Plasmaspiegel für Cholin in engen Grenzen gehalten wird (BLIGH 1952), könnte die wenn auch geringe Sekretion von Cholin durch das Dickdarmepithel eine regulatorische Funktion besitzen. Im Gegensatz dazu konnte für die Darmepithel-Zelllinie Caco-2 gezeigt werden, dass sie Cholin absorbieren kann (CROWE et al. 2002). Allerdings repräsentieren die Caco-2-Zellen funktionelle Eigenschaften eher des Dünndarms und nicht des Dickdarmes.

Im Gegensatz zum Cholin zeigte sich eine deutliche Sekretion bei der Hist-rad-Fluxrate: unter gradientenfreien Bedingungen war die Hist-rad-Fluxrate in SM-Richtung signifikant größer als in MS-Richtung (s. Abb. 5). Um zu überprüfen, inwieweit die Sekretion bei der Hist-rad-Fluxrate von der basolateralen Aufnahme von Histamin abhängt, wurde das organische Kation MPP serosal zugegeben. Tatsächlich konnte durch die serosale Zugabe von MPP die Hist-rad-Fluxrate in SM-Richtung signifikant erniedrigt werden (s. Abb. 5). Dies lässt darauf schließen, dass MPP Histamin von seiner Bindungsstelle am Transportprotein verdrängt hat. MPP ist ein organisches Kation, das als klassisches Modellsubstrat für Transportstudien eingesetzt wird, vor allem in solchen, in denen die Organischen Kationentransporter (OCT) charakterisiert werden (GRÜNDEMANN et al. 1997; KOEPESELL et al. 1998). Im Dünndarm konnte der OCT funktionell und molekularbiologisch nachgewiesen werden (hOCT1: MARTEL et al. 2001; rOCT3: KEKUDA et al. 1998). Auf mRNA-Ebene konnte der porcine OCT1 im Dün- und Dickdarm von Schweinen nachgewiesen werden (Dr. Kerstin Honscha, Veterinär-Physiologisches Institut Leipzig, persönliche Mitteilung 2003). Eine Verdrängung von Histamin durch MPP, wie sie im Rahmen dieser Studie erfolgte, könnte demnach auf einen basolateral lokalisierten OCT hinweisen. Eventuell könnte dafür der OCT1 in Frage kommen, da im menschlichen Jejunum der OCT1 basolateral immunhistochemisch nachgewiesen worden ist (MÜLLER et al. 2005). Allerdings kann MPP auch als Substrat für andere Transportmoleküle in Frage kommen, so z. B. für den vesikulären Monoamintransporter VMAT 1 bzw. 2 (STERN-BACH et al. 1992).

Da die Sekretion von Hist-rad durch MPP gehemmt werden konnte, kann man weiterhin

den Schluss ziehen, dass ein effizienter Aufnahmemechanismus für Histamin an der basolateralen Membran vorhanden sein muss. Unter *in vivo* Bedingungen könnte der basolaterale Aufnahmemechanismus für Histamin dazu dienen, Histamin aus dem Organismus zu entfernen und einer Verstoffwechslung in den Darmzellen zuzuführen. Damit stellt sich die Frage, ob sich die anhand der radioaktiven Fluxraten postulierte transepitheliale Sekretion auch auf das native Histamin übertragen lässt. Mit Hilfe der neu etablierten HPLC-Methode konnte gezeigt werden, dass die SM-Fluxrate von Histamin unter Kontrollbedingungen signifikant größer ist als seine MS-Fluxrate (s. Abb. 8). Für natives Histamin kann deshalb die oben gestellte Frage positiv beantwortet werden.

5.3 Histaminverstoffwechslung

5.3.1 Freisetzung und Verstoffwechslung von endogenem Histamin

Histamin wurde in annähernd gleichen Mengen mukosal und serosal freigesetzt. Dabei war die endogene Freisetzung von Histamin auf der serosalen Epithelseite tendenziell etwas höher, wenn die HNMT oder DAO der Epithelien gehemmt worden war (s. Abb. 9A). Diese, wenn auch geringen und nicht signifikanten Erhöhungen der Histaminfreisetzung deuten auf die Beteiligung der Enzyme HNMT und DAO am Abbau von endogenem Histamin hin. Diese Schlussfolgerung deckt sich mit den Ergebnissen der Studie von ASCHENBACH et al. (2002), bei denen sowohl vor allem serosal eine Erhöhung der Histaminfreisetzung zu beobachten war, wenn HNMT oder DAO gehemmt worden waren.

Die vermehrte Freisetzung von 1-MH nach der Hemmung der DAO durch AG belegt ebenfalls die Beteiligung der DAO an der Verstoffwechslung von Histamin (s. Abb. 9B). Dass die Hemmung der HNMT durch AD nicht zu einer verminderten Freisetzung von 1-MH gegenüber der Kontrolle führte, könnte daran liegen, dass schon das vor der HNMT-Hemmung gebildete 1-MH in den Proben gemessen wurde (s. Abb. 9B).

5.3.2 Verstoffwechslung von exogenem Histamin

Mit der Tracermethode konnte radioaktiv-markiertes Histamin und dessen Abbauprodukte, die dann ebenfalls radioaktiv-markiert waren (zusammengefasst als Hist-rad), bestimmt werden. Darüber hinaus konnte mit der neuentwickelten HPLC-Methode (s. Abschnitt 3.2.2) Histamin selbst und sein Abbauprodukt 1-MH analysiert und damit die Histaminverstoffwechslung detailliert untersucht werden.

SCHNEIDER et al. (1989) ermittelten *in vivo* eine Konzentration von ca. 100 μM Histamin im Darmchymus von Schweinen. Unter *in vitro* Bedingungen in der Ussingkammer konnte festgestellt werden, dass bei einer solchen Konzentration ca. 80 % des Histamin beim Übertritt über das Epithel verstoffwechselt werden (s. Abb. 10A). Dies stimmt mit den Ergebnissen von AHRENS et al. (2002) und ASCHENBACH et al. (2002) überein, die *in vitro* eine Verstoffwechselungsrate von ca. 80 % in MS-Richtung über das Darmepithel von Schweinen feststellen konnten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Darmepithel eine hohe Kapazität besitzt, um exogenes Histamin zu verstoffwechseln und damit zu entgiften. Dass Schweine in der Lage sind, hohe Konzentrationen von Histamin oral aufzunehmen ohne klinische Symptome zu zeigen, beschrieben SATTLER et al. (1988) in einer *in vivo* Studie. Die vorliegende Arbeit konnte nun zeigen, dass das Darmepithel maßgeblich dazu beiträgt, Schweine vor einer Histaminintoxikation zu schützen.

Die hauptsächlich an der Histaminverstoffwechslung beteiligten Enzyme, Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) und Diaminoxidase (DAO), konnten in dieser Studie funktionell nachgewiesen werden. Amodiaquin und Aminoguanidin sind anerkannte Hemmstoffe der beiden Enzyme (Amodiaquin: BARTH et al. 1975; HORTON et al. 2005; Aminoguanidin: BIEGANSKI et al. 1980, 1983; KUSCHE et al. 1975c; SCHULER 1952). Andere Enzyme (z. B. Monoaminoxidase oder Benzylaminoxidase), die den Abbau von Histamin katalysieren könnten, wurden nicht berücksichtigt, da sie in der Literatur als unwirksam bzw. quantitativ unbedeutend beim Abbau von Histamin beschrieben wurden (KUSCHE et al. 1975b, 1975c, 1982; NAKOS und GOSSRAU 1995; OKADA et al. 1979).

Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass sich bei einer Hemmung der HNMT die Verstoffwechslung von Histamin auf fast 50 % reduzierte (s. Abb. 10A und 10B). Das deutet auf eine effiziente Hemmung der Methylierung von Histamin zu 1-MH durch Amodiaquin hin. Darüberhinaus konnte damit die Beteiligung der HNMT an der Histaminverstoffwechslung im Dickdarmepithel der Schweine nachgewiesen werden. Diese eigenen Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von ASCHENBACH et al. (2002) überein, die ebenfalls eine Beteiligung der HNMT am Histaminabbau aufzeigen konnten. Allerdings konnten ASCHENBACH et al. (2002) nur indirekt, durch die fehlende Differenz zwischen Hist-rad- und Histaminfluxraten, auf den gehemmten Histaminabbau schließen. In der vorliegenden Arbeit konnte nun zusätzlich die fehlende Methylierung von Histamin durch die neuentwickelte HPLC-Methode aufgezeigt werden; 1-MH war nach der HNMT-Hemmung nur in verschwindend geringen Mengen in den Proben nachweisbar (s. Abb. 10A und Abb. 11). Diese *in vitro* Untersuchungen finden ihre Entsprechung in den *in vivo*

Untersuchungen an Ratten von HUI und TAYLOR (1985), die zeigen konnten, dass nach Hemmung der HNMT im Urin keine Ausscheidung von 1-MH mehr nachweisbar war.

Obwohl die deutliche Abnahme der 1-MH Freisetzung nach AD-Zugabe auf eine effektive Hemmung der HMNT hindeutet, blieb ein signifikanter Unterschied zwischen der Hist-rad~ und der Histaminfluxrate bestehen (s. Abb. 10A). Dies kann damit erklärt werden, dass die DAO trotz der Hemmung der HNMT weiterhin funktionfähig blieb und Histamin abbauen konnte. Histamin kann außer durch Methylierung (BROWN et al. 1959) auch durch oxidative Desaminierung (KUSCHE et al. 1975c) abgebaut werden.

Die Möglichkeit Histamin sowohl über die Methylierung als auch über die oxidative Desaminierung entgiften zu können, scheint Spezies-übergreifend möglich zu sein. So scheint bei Ratten die oxidative Desaminierung von Histamin durch die DAO von einer gleichzeitigen Hemmung der HNMT nicht beeinflusst zu werden (HUI und TAYLOR 1985). Die mit dem Urin ausgeschiedene Menge an Imidazolessigsäure (sie entsteht beim direkten Abbau von Histamin durch die DAO) unterschied sich nicht zwischen den Ratten, deren HNMT gehemmt worden war und den Kontrolltieren (HUI und TAYLOR 1985).

Allerdings scheint die oxidative Desaminierung von Histamin durch die DAO im Colon des Schweines eine etwas geringere Rolle zu spielen. In den eigenen Untersuchungen wurde durch die Hemmung der DAO wurde die Verstoffwechslung von Histamin in MS-Richtung nur wenig eingeschränkt (von 82 % bei der Kontrolle auf 75 % nach der Zugabe von AG). Dagegen sank die Verstoffwechslung von Histamin in MS-Richtung während der Hemmung der HNMT auf fast 50 % ab (s. Abb. 10A). Das bedeutet, dass die DAO alleine Histamin nicht so effizient abbauen konnte wie die HNMT. Es kann zudem angenommen werden, dass während der Hemmung der DAO die HNMT Histamin weiterhin verstoffwechseln kann. Die HPLC-Analyse unterstützt diese Annahme: 1-MH wurde während der DAO-Hemmung signifikant mehr nachgewiesen im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 10A und 11). AHRENS et al. (2002) und ASCHENBACH et al. (2002) konnten ebenfalls eine eingeschränkte, aber nicht vollständig blockierte Histaminverstoffwechslung nach der Zugabe von AG feststellen.

Ein Teil der Differenz zwischen der Hist-rad~ und der Histaminfluxrate nach AG-Applikation könnte auf eine Restaktivität der DAO zurückzuführen sein. In der Studie von HUI und TAYLOR (1985) konnte, ebenfalls nach der Hemmung der DAO mit AG, noch vier Stunden nach der Applikation von Histamin und AG Imidazolessigsäure im Urin von Ratten nachgewiesen werden; erst acht Stunden später war dies nicht mehr möglich.

Die eigenen Ergebnisse weisen somit der HNMT nicht nur eine Beteiligung, sondern

darüber hinaus eine Schlüsselrolle bei der Entgiftung von exogenem Histamin im Dickdarmepithel der Schweine zu.

Bislang ist aber eher die DAO als zentral für den Histaminstoffwechsel beschrieben. Die Verabreichung von AG verringerte die Lebenszeit von Mini-pigs, Hund und Kaninchen nach einer künstlich zugefügten Ischämie im Dünndarm um ca. ein Drittel (KUSCHE et al. 1975b, 1979). SATTLER et al. (1988) konnten durch die orale Gabe von Histamin bei Schweinen nur dann klinische Symptome hervorrufen, wenn diese zuvor AG bekommen hatten. In einem weiteren Versuch konnten trotz der Hemmung der DAO die klinischen Symptome durch Antihistaminika (eine Kombination von H1- und H2-Rezeptorantagonisten) verhindert werden (SATTLER et al. 1989). Diese Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung einer funktionierenden Histaminverstoffwechslung durch die DAO. Es blieb allerdings bei diesen *in vivo* Untersuchungen unbekannt, ob hierbei die Enzymblockade im Darmepithel oder in nachgeschalteten Organen (z.B. Blut, Leber) die gesteigerte Histamintoxizität bedingte. Außerdem wurden vergleichbare Untersuchungen mit Hemmung der HNMT bisher nicht durchgeführt.

Die Hist-rad-Fluxraten der Kontroll-, AD- und der AG-Versuchsgruppe unterschieden sich nicht voneinander (s. Abb. 10). Das war zu erwarten, da sich innerhalb der Hist-rad-Fluxraten nur das Verhältnis zwischen Histamin und seinen Stoffwechselprodukten ändern sollte. Dieser Befund wurde auch von ASCHENBACH et al. (2002) beschrieben. Bei den *in vivo* Untersuchungen von HUI und TAYLOR (1985) unterschieden sich die Ausscheidungsmengen von der Radioaktivität zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (Histamingabe alleine oder mit AG) ebenfalls nicht.

5.4 Serosale Appearance von 1-MH

Bereits bei den Epithelien, denen kein exogenes Histamin zugefügt worden war, zeigte sich, dass bei allen Versuchsgruppen 1-MH ausschließlich in Proben bestimmt werden konnte, die von der serosalen Epithelseite stammten (s. Abb. 9B). Bei den Epithelien, deren DAO durch AG gehemmt worden war, zeigte sich ein tendenzieller Anstieg in der 1-MH-Freisetzung (s. Abb. 9B). Damit wird auch bei der endogenen Freisetzung von 1-MH deutlich, dass die DAO im Darmepithel der Schweine für den Abbau von 1-MH verantwortlich ist. Wurde die DAO gehemmt, kann sich 1-MH anreichern und wird in höherem Maße in die serosale Inkubationslösung ausgeschleust.

Ebenso zeigten die HPLC-Analysen bei den Proben von Epithelien, denen exogenes Histamin sowohl mukosal als auch serosal vorgelegt worden war, dass das Abbauprodukt

1-MH vom Epithel des Dickdarmes ausschließlich nach serosal abgegeben wurde (s. Abb. 10A, 10B und 11). Dieser Befund ist bislang nur von Untersuchungen an der Magenschleimhaut von Kaninchen, in denen 1-MH ebenfalls nur serosal vorgefunden wurde (LOISELLE und WOLLIN 1993), bekannt.

Die Versuche zur serosalen Appearance von 1-MH geben indirekt einen Hinweis darauf, dass Histamin tatsächlich bevorzugt von serosal in die Epithelzellen aufgenommen wird, wie schon die Hemmung der Hist-rad-Sekretion durch MPP vermuten ließ (s. Abb. 5). Wenn nämlich Histamin serosal vorgelegt worden war, dann war bei der Kontrollgruppe die 1-MH-Appearance um fast das 10-fache größer als nach mukosaler Histaminvorlage. Bei der Versuchsgruppe, die mit AG behandelt worden war, erhöhte sich die 1-MH-Appearance um ca. das 6-fache, wenn Histamin serosal und nicht mukosal vorlag (s. Abb. 11).

Darüber hinaus unterstreichen diese Ergebnisse die Vermutung von ASCHENBACH et al. (2002), dass Histamin erst von mukosal nach serosal über die Tight-junctions gelangen muss, bevor die Epithelzellen es aufnehmen können, d.h., dass die Tight-junctions eine physikalische Barriere für luminales Histamin darstellen.

Die höhere Appearance von 1-MH nach Hemmung der DAO im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 10A) kann darauf zurückgeführt werden, dass 1-MH unter Kontrollbedingungen zu einem großen Teil von der DAO weiter abgebaut werden konnte. Dass die DAO der Schweine 1-MH als Substrat akzeptiert, konnten KUSCHE et al. (1975c) zeigen. Unter den Bedingungen dieser Versuche desaminierte die pDAO 1-MH zu ca. 50 % im Vergleich zur Desaminierungsrate von Histamin. Allerdings lag der pH-Wert bei den Versuchen von KUSCHE et al. (1975c) bei 7,5 - 8,0. Für die menschliche DAO wird beschrieben, dass sie 1-MH sogar 1,8x so schnell wie Histamin abbaut (BIEGANSKI et al. 1980); der pH-Wert lag bei diesen Versuchen bei 7,0 und damit deutlich niedriger als bei den Versuchen von KUSCHE et al. (1975c). Da die Enzymaktivität pH-abhängig ist, könnte das die unterschiedliche Desaminierungsrate zwischen beiden Untersuchungen erklären. Geht man darüberhinaus davon aus, dass die DAO in sekretorischen Vesikeln lokalisiert ist (SCHWELBERGER et al. 1999) und der pH in solchen Vesikeln anfänglich sauer und später neutral ist (ORCI et al. 1987), so ist für eine intravesikuläre DAO eine präferentielle Verstoffwechslung von 1-MH zu erwarten. Dies könnte angesichts der im nächsten Kapitel dargelegten intraepithelialen Kompartimentierung der Histaminverstoffwechslung durchaus bedeutsam sein.

5.5 Intraepitheliale Kompartimentierung der Histaminverstoffwechslung

Eine Stunde nach serosaler Zugabe von exogenem Histamin lag die Konzentration von 1-MH in der serosalen Inkubationslösung sehr nahe an der Bestimmungsgrenze (s. Kap. 4.6). Eine Stunde später stieg die Konzentration von 1-MH sprunghaft an. Dieser sprunghafte Anstieg der 1-MH Konzentration legte die Vermutung nahe, dass 1-MH erst intrazellulär angereichert wurde, bevor es zur serosalen Freisetzung kam. Solch eine Anreicherung könnte in Vesikeln stattfinden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde bei den Versuchen zur intrazellulären Kompartimentierung untersucht, ob 1-MH über Vesikel aus den Zellen nach serosal ausgeschleust wird. Dazu wurde den Epithelien N-Ethylmaleimid (NEM) zugesetzt. NEM bindet an den NEM-sensitiven Faktor (NSF) (BLOCK et al. 1988). Das NSF-Protein ist dafür verantwortlich, dass es zur Fusion der Vesikelmembran mit der äußeren Zellmembran kommt. Dabei ist unerheblich, wo der Vesikel abgeschnürt wird, ob vom endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat (BECKERS et al. 1989). Die Ergebnisse zeigen, dass in Epithelien, die mit NEM behandelt worden waren, die 1-MH Freisetzung vollständig unterdrückt werden konnte (s. Abb. 13). Dies war unabhängig davon, ob Histamin mukosal oder serosal vorgelegt worden war. Auch bei der Versuchsgruppe, bei der zusätzlich zur NEM-Zugabe die DAO und damit der weitere Abbau von 1-MH gehemmt worden war, war kaum 1-MH in den Proben nachweisbar (s. Abb. 13A und 14).

Bevor man das Ausbleiben der 1-MH-Appearance nach Zugabe von NEM jedoch auf einen intravesikulären Transport zurückführt, muss ausgeschlossen werden, dass NEM nicht mit der Bildung von 1-MH interferiert. Um dieses Problem aufzuklären, können die Versuche zur direkten Hemmung der HNMT mit AD (Versuchsserie Nr. 3; s. Abschnitt 4.5.2) herangezogen werden. In der Versuchsserie Nr. 3 führte die Hemmung der HNMT nicht nur zu einer verminderten Appearance von 1-MH, sondern auch zu einem deutlich eingeschränkten Histaminabbau, was an der signifikant erhöhten Histaminfluxrate erkenntlich war (s. Abb. 10). Dieser Anstieg der Histaminfluxrate war bei der Versuchsgruppe, bei der NEM zugegeben worden war, nicht zu erkennen. Im Gegenteil: der Histaminabbau schien sogar stimuliert worden zu sein (s. Abb. 13). Folglich kann eine direkte Hemmung der HNMT durch NEM ausgeschlossen werden. In der Literatur ist belegt, dass NEM die HNMT nicht hemmt (LINDAHL 1960).

Die Tatsache, dass 1-MH von Epithelien mit NEM-Behandlung nicht freigesetzt wird, deutet somit auf einen vesikulären Transport von 1-MH hin. In Weiterführung dieses

Gedankens ist auch eine Beteiligung des vesikulären Transportes bei der Histaminverstoffwechslung denkbar. Eine intravesikuläre Verstoffwechslung von 1-MH scheint sinnvoll zum Schutze der Zelle zu sein. Wie bei der oxidativen Desaminierung von Histamin zu Imidazolessigsäure (NAKOS und GOSSRAU 1995), wird zelltoxisches H_2O_2 auch beim oxidativen Abbau von 1-MH frei.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die DAO intravesikulär lokalisiert ist (SCHWELBERGER et al. 1999). Die DAO hat N-gebundene Oligosaccharidketten, was daraufhin deutet, dass die DAO ein sekretorisches Enzym ist (SCHWELBERGER und BODNER 1997). Darüber hinaus fanden SCHWELBERGER et al. (1998a, 1998b) in immunhistochemischen Färbungen von Schnitten der Niere, des Dün- und Dickdarms von Schweinen, dass die DAO in vesikulären Strukturen nahe der basalen Plasmamembran lokalisiert ist. Es liegt folglich die Vermutung nahe, dass die Vesikeln in denen 1-MH zur basolateralen Zellmembran geschleust wird zumindest teilweise identisch sind mit den Vesikeln, in denen die DAO gespeichert ist. Nach diesem Modell könnte die Histaminverstoffwechslung wie folgt ablaufen. Nach bevorzugt basolateraler Aufnahme würde Histamin zunächst im Zytosol methyliert, das entstehende 1-MH dann in Vesikeln aufgenommen und dort von der DAO weiter verstoffwechselt werden.

In der Versuchsgruppe, in der zusätzlich zum NEM-Zusatz, die DAO gehemmt worden war, stieg die Histaminfluxrate zwar höher an als bei der Versuchsgruppe, bei der nur AG zugesetzt worden war. Das kann aber damit erklärt werden, dass sich durch die blockierte DAO 1-MH zwar anreichern, aber durch den gehemmten vesikulären Transport nicht aus der Zelle freigesetzt werden konnte. Dieser Rückstau von 1-MH in den Zellen könnte im Sinne einer negativen Rückkoppelung zur Hemmung der HNMT geführt und damit den Histaminabbau vermindert haben. Die negative Rückkopplung von 1-MH auf die HNMT konnten BROWN et al. (1959) anhand aufgereinigter HNMT aus Gewebe vom Meerschweinengehirn zeigen. Die Methylierungsreaktion von Histamin zu 1-MH durch die HNMT war um 40 % reduziert, wenn 100 μM 1-MH zum Reaktionsgemisch zugegeben worden war. Dieses Ergebnis wird durch Ergebnisse von BARTH et al. (1973b) unterstützt, die bei aufgereinigter HNMT aus der Magenschleimhaut von Schweinen eine halbmaximale Hemmkonzentration für die HNMT von 100 μM 1-MH herausfanden. Die DAO wird vermutlich nicht durch NEM gehemmt (ZEIDAN et al. 1980).

In den Untersuchungen zur endogenen Freisetzung von Histamin wurden auf der mukosalen Seite keine Einflüsse der Hemmstoffe festgestellt. Tendenziell ist die endogene Freisetzung von Histamin sowohl mukosal als auch serosal höher bei den Epithelien, die

NEM und AG vorgelegt bekommen haben, als bei den übrigen Epithelien (s. Abb. 12A). Dies könnte, wie bei den Fluxraten, auf den verminderten Abbau von 1-MH, dessen fehlende Appearance und daraufhin negative Rückkoppelung der HNMT zu erklären sein. Bei den Epithelien, die nur NEM zugesetzt bekommen haben, ist die serosale endogene Histaminfreisetzung sehr niedrig (s. Abb. 15A); ob das auf einen stimulierten Histaminabbau zurückzuführen ist, bleibt Spekulation.

5.6 Schlussfolgerungen

Die fehlende Toxizität von lumenalem Histamin bei gesunden Schweinen kann aufgrund der vorliegenden Arbeit auf folgende Sachverhalte zurückgeführt werden.

Histamin kann über das Darmepithel sezerniert werden (vgl. Abschnitt 4.1.2 und 4.3). Das lässt den Schluss zu, dass das Darmepithel in der Lage ist exkretorisch-detoxifizierende Aufgaben zu übernehmen, ähnlich der Niere. Hierbei spielt die aktive basolaterale Aufnahme von Histamin eine entscheidende Rolle.

Es kann nur wenig Histamin von mukosal nach serosal übertreten. Folglich kann auch nur wenig Histamin basolateral aufgenommen werden, was durch die geringeren Mengen an 1-MH nach mukosaler Zugabe im Vergleich nach serosaler Zugabe von Histamin deutlich wird. Dies weist darauf hin, dass das Darmepithel neben der exkretorischen Funktion eine physikalische Barriere gegenüber exogenem Histamin darstellt.

Obwohl die Barrierefunktion des Epithels funktionabel ist, muss selbst unter physiologischen Bedingungen davon ausgegangen werden, dass geringe Mengen an Histamin von mukosal nach serosal übertreten (s. Abb. 10A, Kontrolle). Dieses Histamin und endogen freigesetztes Histamin (s. Abb. 9A) müssen entgiftet werden. Die vorliegenden Ergebnisse (s. Abb. 5, 8 und 11) deuten auf einen effektiven serosalen Aufnahmemechanismus am Darmepithel hin, durch den Histamin seiner Verstoffwechslung zugeführt wird.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass im Gegensatz zu der in der Literatur (SATTLER et al. 1988; SATTLER und LORENZ 1990) hervorgehobene Bedeutung der DAO, die HNMT im Dickdarmepithel der Schweine eine Schlüsselrolle spielt. Ohne die HNMT ist die Verstoffwechslung von Histamin stark eingeschränkt, was bei einer Hemmung der DAO nicht in demselben Umfang der Fall ist.

Es kann also geschlussfolgert werden, dass im Darmepithel der Schweine vorzugsweise eine sequenzielle Histaminverstoffwechslung stattfindet. Die Bedeutung der DAO bei der

sequenziellen Histaminverstoffwechslung im Darmepithel der Schweine liegt darin, 1-MH, das Abbauprodukt von Histamin durch die HNMT, weiter abzubauen und so die rückwirkende Hemmwirkung von 1-MH auf die HNMT zu verhindern.

Die Ergebnisse der Versuche zur intraepithelialen Kompartimentierung deuten zudem daraufhin, dass 1-MH teilweise serosal ausgeschleust wird, ohne weiter abgebaut zu werden oder aber intravesikulär dem Abbau durch die DAO zugeführt wird.

6 Zusammenfassung

Vivica von Vietinghoff-Scheel

Intestinale Mechanismen zum Schutz vor Histamin-bedingten Intoxikationen beim Schwein

Veterinär-Physiologisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Dezember 2006

66 Seiten, 14 Abb., 5 Tab., 121 Lit., 2 Anlagen

Schlüsselwörter: Histamin, Schwein, Ussingkammer, Histaminverstoffwechslung, 1-Methylhistamin, HPLC, Fluxstudie

Schweine werden mit hohen Mengen an Histamin konfrontiert, die sich im Lumen ihres Dickdarmes befinden. Dieses Histamin ist einerseits als endogenes Histamin in Mastzellen in der *Tela submucosa* gespeichert. Andererseits wird durch die bakterielle Synthese exogenes Histamin im Darmchymus angereichert. Dabei kann die Histaminkonzentration im Darmlumen bis zu 10^5 -fach größer sein als im Blut. Da ein Übertritt von Histamin in die Zirkulation zur Schocksymptomatik bis hin zum Tode führen würde, ist anzunehmen, dass das Darmepithel der Schweine eine Histaminintoxikation verhindert.

Zur Klärung dieser Annahme wurden *In vitro* Untersuchungen an Darmepithelien des proximalen Kolons vom Schwein mit Hilfe der Ussingkammer-Technik durchgeführt. Unter gradientenfreien Bedingungen war die Hist-rad-Fluxrate (enthält sowohl natives Histamin als auch dessen radioaktiv-markierte Stoffwechselprodukte) von der serosalen zur mukosalen (SM) Epithelseite signifikant höher als die Fluxrate von der mukosalen zur serosalen (MS) Epithelseite. Das deutet auf eine Sekretion von Histamin und/oder seinen Kataboliten über das Darmepithel hin. Die Differenz zwischen der SM- und der MS-Fluxrate verschwand nach der serosalen Zugabe von 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP), ein organisches Kation. Die Hist-rad-Sekretion beruht somit wesentlich auf der Effizienz basolateraler Aufnahmemechanismen für Histamin.

Vergleichend durchgeführte Fluxstudien mit Cholin (ein anderes organisches Modellkation) deuten auf eine vorwiegend passive Permeation von Cholin über das Dickdarmepithel hin.

Um detailliert erfassen zu können, inwieweit die Histaminverstoffwechslung beim Übertritt über das Epithel eine Rolle spielt, wurde eine HPLC-Methode entwickelt, die es ermöglicht, sowohl Histamin als auch sein Abbauprodukt 1-Methylhistamin (1-MH) in derselben Probe zu bestimmen. Die Methode beruht auf einer zeitsparenden on-line

Derivatisierung von Histamin und 1-MH mit *ortho*-Phtaldialdehyd (OPA).

Die funktionellen Studien zeigen, dass Histamin bei seiner Permeation sowohl in MS- als auch in SM-Richtung, zu einem hohen Prozentsatz vom Darmepithel verstoffwechselt wird. Der Umfang der Verstoffwechslung konnte durch die Anwesenheit von Amodiaquin (AD), einem Hemmstoff der Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) signifikant mehr reduziert werden als durch eine Hemmung der Diaminoxidase (DAO) mit Aminoguanidin (AG). Die Hist-rad-Fluxrate wurde von den verschiedenen Substanzzugaben nicht beeinflusst.

Anhand der gleichzeitigen Bestimmung von 1-MH und Histamin konnte festgestellt werden, dass die serosale Appearance von 1-MH durch die Hemmung der HNMT durch AD signifikant vermindert werden konnte, während die Blockade der DAO durch AG zu einem signifikanten Anstieg führte. Diese Ergebnisse belegen die unmittelbare Beteiligung der HNMT und der DAO an der Histaminverstoffwechslung im porcinen Dickdarmepithel.

1-MH konnte nur auf der serosalen Epithelseite detektiert werden. Ungeachtet der Versuchsgruppen war die serosale Appearance von 1-MH immer größer, wenn Histamin auf der serosalen statt der mukosalen Epithelseite zugesetzt worden war. Das unterstützt die Annahme eines effizienten basolateralen Aufnahmemechanismus für Histamin.

Bei Versuchen zur intraepithelialen Kompartimentierung der Histaminverstoffwechslung zeigte sich, dass 1-MH in den Proben kaum noch nachzuweisen war, wenn der vesikuläre Transport durch N-Ethylmaleimid (NEM) gehemmt worden war. Auch die Präsenz von AG zusätzlich zu NEM erhöhte nicht die Appearance von 1-MH. AG alleine führte zu einem Anstieg der 1-MH-Appearance. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass 1-MH zur DAO in Vesikel geschleusst und dort der Verstoffwechslung zugeführt wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das Darmepithel in der Lage ist, Histamin zu sezernieren. Dadurch kann endogen freigesetztes Histamin nach mukosal abgegeben werden. Gegenüber exogenem Histamin schützt das Darmepithel den Säugetierorganismus dadurch, dass es durch seine Dichtigkeit kaum Histamin von mukosal auf die Blutseite gelangen lässt. Die Mengen an Histamin, die trotzdem nach serosal gelangen, werden zum großen Teil von serosal in die Zellen aufgenommen. Im Darmepithel der Schweine findet sodann eine sequenzielle Histaminverstoffwechslung statt. Zuerst wird Histamin von der HNMT zu 1-MH umgesetzt und dann wird vor allem 1-MH durch die DAO weiter abgebaut. Damit kommt der HNMT eine entscheidende Rolle bei der Entgiftung von Histamin zu. Der oxidative Abbau von 1-MH scheint in vesikulären Strukturen der Zellen stattzufinden.

7 Summary

Vivica von Vietinghoff-Scheel

Intestinal mechanisms to protect pigs from histamine intoxication

Institute of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

66 pp., 14 fig., 5 tables, 121 ref., 2 appendices

Submitted in December 2006

Keywords: histamine, pig, Ussing chamber, histamine catabolism, 1-methylhistamine, HPLC, flux study

Pigs are confronted with high amounts of histamine present in their large intestine. This “endogenous” histamine derives from mast cells of the *Tela submucosa*. Histamine accumulating in the ingesta due to the bacterial metabolism represents the exogenous histamine. The concentration gradient of histamine from the intestinal lumen to the blood side is approximately 10^5 -fold. If histamine reaches the systemic circulation, severe shock symptoms and even death could be the consequence. Therefore, it can be assumed that the epithelium of the large intestine prevents histamine permeation from the gut lumen to the blood side.

To test the assumption, *in vitro* experiments were performed using the Ussing chamber technique. Under gradient-free conditions, the Hist-rad fluxrate (representing histamine together with its catabolites) in serosal to mucosal (SM) direction was significantly greater than from the mucosal to the serosal (MS) side of the epithelium. This points towards a secretory process for histamine and/or its catabolites across the epithelium. After addition of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP, an organic cation), the difference between SM and MS fluxrate was abolished. The secretion of Hist-rad is, therefore, predominantly due to an effective basolateral uptake mechanism.

Comparative fluxrate studies were performed with choline (organic cation). The studies demonstrated a mostly passive permeation of choline across the porcine colonic epithelium.

To understand to what extent the metabolism of histamine takes place during permeation of histamine across the epithelium, it was necessary to develop a sensitive detection method. A HPLC method was established which allows the determination of histamine and 1-methylhistamine (1-MH, a catabolite of histamine) in the same sample. The method is

based on the time-sparing on-line derivatisation of histamine and 1-MH with *ortho*-phthaldialdehyde (OPA).

The results of the Ussing chamber experiments showed that histamine was catabolised to a high amount while permeating across the epithelium in either direction. The catabolism of histamine could be reduced to a significantly higher extent after addition of amodiaquin (AD), an inhibitor of the histamine-N-methyltransferase (HNMT), than after addition of aminoguanidine (AG), an inhibitor of diamine oxidase (DAO). The Hist-rad fluxrate, which represents histamine together with its catabolites, was not affected by inhibition of catabolic enzymes.

The simultaneous determination of 1-MH and histamine showed that the appearance of 1-MH was decreased significantly when HNMT was inhibited, but increased when DAO was blocked. The results proof the participation of HNMT and DAO in the catabolism of histamine in the porcine colonic epithelium.

1-MH could only be determined in samples from the serosal side of the epithelium. The appearance of 1-MH was higher, when histamine was present on the serosal than on the mucosal side. The finding underlines the assumption that an efficient basolateral uptake mechanism for histamine exists.

Experiments concerning intraepithelial compartmentation of histamine catabolism showed that inhibition of vesicular trafficking by N-ethylmaleimide (NEM) abolished the appearance of 1-MH in the samples. This also occurred when AG was applied in combination with NEM. Inhibition of DAO alone caused an increase in 1-MH appearance. This allows concluding that 1-MH was transported into vesicles where DAO then catalyzed the oxidative degradation of 1-MH.

It can be concluded that the intestinal epithelium of the large intestine is capable of secreting histamine. By this way, endogenous histamine can be eliminated into the gut lumen. The organism is protected against exogenous histamine by the tightness of the epithelium. However, the amounts of histamine that still pass from the lumen to the blood side are taken up into the cells on the serosal side of the epithelium. In the epithelium, catabolism of histamine takes place in a sequenced order. First, histamine is degraded by HNMT to form 1-MH and then 1-MH is further degraded by DAO or exported on the serosal side. Degradation of 1-MH appears to take place in vesicular structures in the epithelial cells.

8 Literaturverzeichnis

Ahrens F, Gäbel G, Garz B, Aschenbach JR. Release and permeation of histamine are affected by diamine oxidase in the pig large intestine. *Inflamm Res*. 2002;51(Suppl 1): S83-4.

Ahrens F, Gäbel G, Garz B, Aschenbach JR. Histamine-induced chloride secretion is mediated via H₂-receptors in the pig proximal colon. *Inflamm Res*. 2003;52:79-85.

Albinus M, Sewing KF. Histamine uptake and metabolism in intact isolated parietal cells. *Agents Actions*. 1981;11:223-7.

Andre JM, Schwartz JC. Studies on the inhibition of histamine methylation in mice. *Agents Actions*. 1973;3:172-3.

Arndt P, Volk C, Gorboulev V, Budiman T, Popp C, Ulzheimer-Teuber I, Akhoundova A, Koppatz S, Bamberg E, Nagel G, Koepsell H. Interaction of cations, anions, and weak base quinine with rat renal cation transporter rOCT2 compared with rOCT1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;281:F454-68.

Aschenbach JR, Ahrens F, Garz B, Gäbel G. Paracellular tightness and catabolism restrict histamine permeation in the proximal colon of pigs. *Pflügers Arch*. 2002;445:115-22.

Aschenbach JR, Oswald R, Gäbel G. Gastrointestinal epithelia as barriers to luminal histamine of microbial origin - a review. *Z Gastroenterol*. 1998;36(Suppl. 1):12-7.

Aschenbach JR, Oswald R, Gäbel G. Transport, catabolism and release of histamine in the ruminal epithelium of sheep. *Pflügers Arch*. 2000;440:171-8.

Barnes WG, Hough LB. Membrane-bound histamine N-methyltransferase in mouse brain: possible role in the synaptic inactivation of neuronal histamine. *J Neurochem*. 2002;82: 1262-71.

Barth H, Lorenz W, Niemeyer I. Inhibition and activation of histamine methyltransferase by methylated histamines. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*. 1973a;354:1021-6.

Barth H, Lorenz W, Troidl H. Effect of amodiaquin on gastric histamine methyltransferase and on histamine-stimulated gastric secretion. *Br J Pharmacol*. 1975;55:321-7.

Barth H, Niemeyer I, Lorenz W. Similar actions of methylated histamines and histamine receptor antagonists on gastric histamine methyltransferase. *Agents Actions*. 1973b;3:173-5.

Beckers CJM, Block MR, Glick BS, Rothman JE, Balch WE. Vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the golgi stack requires the NEM-sensitive fusion protein. *Nature*. 1989;339:397-8.

Bieganski T. Biochemical, physiological and pathophysiological aspects of intestinal diamine oxidase. *Acta Physiol Pol*. 1983;34:139-54.

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

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

Bligh J. The level of free choline in plasma. *J Physiol*. 1952;117: 234-40.

Block MR, Glick BS, Wilcox CA, Wieland FT, Rothman JE. Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:7852-6.

Blusztajn JK, Wurtman RJ. Choline and cholinergic neurons. *Science*. 1983;221:614-20.

Brown DD, Tomchick R, Axelrod J. The distribution and properties of a histamine-methylating enzyme. *J Biol Chem*. 1959;234:2948-50.

Budiman T, Bamberg E, Koepsell H, Nagel G. Mechanism of electrogenic cation transport by the cloned organic cation transporter 2 from rat. *J Biol Chem*. 2000;275:29413-20.

Burckhardt G, Wolf NA. Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am J Physiol*. 2002;278:F853-6.

Busch AE, Quester S, Ulzheimer JC, Gorboulev V, Akhoundova A, Waldegger S, Lang F, Koepsell H. Monoamine neurotransmitter transport mediated by the polyspecific cation transporter rOCT1. *FEBS Lett*. 1996;395:153-6.

Contentin J, Boulu P, Schwartz JC. Pharmacological studies on the role of histamine in thermoregulation. *Agents Actions*. 1973;3:177.

Crowe AP, Lockman PR, Abbruscato TJ, Allen DD. Novel choline transport characteristics in Caco-2 cells. *Drug Dev Ind Pharm*. 2002;28:773-81.

- D'Agostino L, D'Argenio G, Ciacci C, Daniele B, Macchia V, Mazzacca G. Diamine oxidase in rat small bowel: distribution in different segments and cellular location. *Enzyme*. 1984;31:217-20.
- Dale HH, Laidlaw PP. Further observations on the action of β -iminazolylethylamine. *J Physiol*. 1910;42:182-95.
- Daniele B, Quaroni A. Polarized secretion of diamine oxidase by intestinal epithelial cells and its stimulation by heparin. *Gastroenterology*. 1990;99:1675-87.
- Dibona DR, Ito S, Berglinth T, Sachs G. Cellular site of gastric acid secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:6689-93.
- Engel K, Wang J. Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter. *Mol Pharmacol*. 2005;68:1397-407.
- Emborg J, Laursen BG, Dalgaard P. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2°C-effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2005;101:263-79.
- Erickson JD, Eiden LE, Hoffman BJ. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:10993-7.
- Erickson JD, Schäfer MK-H, Bonner TI, Eiden LE, Weihe E. Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:5166-71.
- Erjavec F, Stanovnik L. Histamine and calcium secretion in the submandibular gland of the cat evoked by two types of stimulation. *Agents Actions*. 1987;20:188-90.
- Ezeamuzie CI, Igbigbi PS, Asomugha L, Ambakederemo AW, Abila B, Assem ESK. Urine methylhistamine concentrations before and after chloroquine in healthy black subjects. *J Trop Med Hyg*. 1990;93:423-5.
- Gong S, Lu X, Xu Y, Swiderski CF, Jordan CT, Moscow JA. Identification of OCT6 as a novel organic cation transporter preferentially expressed in haematopoietic cells and leukemias. *Exp Hematol*. 2002;30:1162-9.
- Grassl SM. Choline transport in human placental brush-border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1194:203-13.
- Gründemann D, Babin-Ebell J, Martel F, Ording N, Schmidt A. Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK1 cells. *J Biol Chem*. 1997;272:10408-13.

Gutknecht J, Walter A. Histamine, theophylline and tryptamine transport through lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1981;649:149-54.

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

Harle DG und Baldo BA. Structural features of potent inhibitors of rat kidney histamine N-methyltransferase. *Biochem Pharmacol*. 1988;37:385-8.

Hayer-Zillgen M, Bruss M, Bönisch H. Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Br J Pharmacol*. 2002;136:829-36.

Hegazy E, Schwenk M. Choline uptake by isolated enterocytes of guinea pig. *J Nutr*. 1984;114:2217-20.

Hensley K, Kotake Y, Sang H, Pye QN, Wallis GL, Kolker LM, Tabatabaie T, Stewart CA, Konishi Y, Nakae D, Floyd RA. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H₂O₂ generation in liver mitochondria. *Carcinogenesis*. 2000;21:983-9.

Horton JR, Sawada K, Nishibori M, Cheng X. Structural basis for inhibition of histamine-N-methyltransferase by diverse drugs. *J Mol Biol*. 2005;353:334-44.

Hough LB, Domino F. Tele-methylhistamine oxidation by type B monoamine oxidase. *J Pharmacol Exp Ther*. 1979;208:422-8.

Hui JY, Taylor SL. Inhibition of in vivo histamine metabolism in rats by foodborne and pharmacologic inhibitors of diamine oxidase, histamin-N-methyltransferase, and monoamine oxidase. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1985;81:241-9.

Husztli Z. Carrier-mediated high affinity uptake system for histamine in astroglia and cerebral endothelial cells. *Neurosci Res*. 1998;51:551-8.

Jakobsen A-M, Andersson P, Saglik G, Andersson E, Kölby L, Erickson JD, Forssell-Aronsson E, Wängberg B, Ahlman H, Nilsson O. Differential expression of vesicular monoamine transporter (VMAT) 1 and 2 in gastrointestinal endocrine tumours. *J Pathol*. 2001;195:463-72.

Jin H, Koyama T, Hatanaka Y, Akiyama S, Takayama F, Kawasaki H. Histamine-induced vasodilation and vasoconstriction in the mesenteric resistance artery of the rat. *Eur J Pharmacol*. 2006;529:136-44.

- Kapeller-Adler R, Fletcher M. The enzymatic destruction of histamine in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1959;33:1-9.
- Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei Y-J, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem*. 1998;273:15971-9.
- Klocker J, Mätzler SA, Huertz G-N, Drasche A, Kolbitsch C, Schwelberger HG. Expression of histamine degrading enzymes in porcine tissues. *Inflamm Res*. 2005;54(Suppl 1):S54-7.
- Knutson L, Ahrenstedt Ö, Odland B, Hällgren R. The jejunal secretion of histamine is increased in active Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1990;98:849-54.
- Koepsell H, Busch A, Gorboulev V, Arndt P. Structure and function of renal organic cation transporters. *News Physiol Sci*. 1998;13:11-6.
- Kukko-Lukjanov T-K, Panula P. Subcellular distribution of histamine, GABA and galanin in tuberomammillary neurons in vitro. *J Chem Neuroanat*. 2003;25:279-92.
- Kurose Y, Terashima Y. Histamine regulates food intake through modulating noradrenaline release in the para-ventricular nucleus. *Brain Research*. 1999;828:115-8.
- Kusche J, Feussner K-D, Lorenz W. Intestinal monoamine oxidase: does it have a role in histamine catabolism? *Agents Actions*. 1982;12:53-9.
- Kusche J, Lorenz W, Schmidt J. Oxidative deamination of biogenic amines by intestinal amine oxidases: histamine is specifically inactivated by diamine oxidase. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*. 1975a;356:1485-96.
- Kusche J, Lorenz W, Stahlknecht CD, Friedrich A, Schmidt A. Diamine oxidase activity in gastric and duodenal mucosa of man and other mammals with special reference to the pyloric junction. *Agents Actions*. 1978;8:366-71.
- Kusche J, Richter H, Schmidt J, Hesterberg R, Friedrich A, Lorenz W. Diamine oxidases in the small intestine of rabbits, dogs and pigs: separation from a soluble monoamine oxidase, properties and pathophysiological significance in intestinal ischemia. *Agents Actions*. 1975b;5:431-9.
- Kusche J, Richter, Schmidt J, Hesterberg R, Specht C, Lorenz W. Intestinal diamine oxidase: isolation, substrate specificity and pathophysiological significance. *Agents Actions*. 1973;3:182-3.

Kusche J, Schmidt J, Schmidt A, Lorenz W. Diamine oxydase in rabbit small intestine: separation from soluble monoamine oxidases and substrate specificity of the enzymes. *Agents Actions*. 1975c;5:440-1.

Kusche J, Stahlknecht CD, Lorenz W, Reichert G, Dietz W. Comparison of alterations in the histamine-diamine oxidase system during acute intestinal ischaemia in pigs, dogs and rabbits: evidence for a uniform pathophysiological mechanism? *Agents Actions*. 1979;9:49-52.

Müller J, Lips K S, Metzner L, Neubert R H H, Koepsell H, Brandsch M. Drug specificity and intestinal localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochem Pharm*. 2005;70:1851-60.

Lindahl K. The histamine methylating enzyme system in liver. *Acta Physiol Scand*. 1960;49:114-38.

Loiselle J, Wollin A. Mucosal histamine elimination and its effect on acid secretion in rabbit gastric mucosa. *Gastroenterology*. 1993;104:1013-20.

Lorenz W, Barth H, Kusche J, Reimann HJ, Schmal A, Matejka E, Mathias C, Hutzel M, Werle E. Histamine in the pig: determination, distribution, release and pharmacological actions. *Eur J Pharmacol*. 1971;14:155-75.

Mårdh S, Norberg L, Ljungström M, Wollert S, Nyrén O, Gustavsson S. A method for in vitro studies on acid formation in human parietal cells. Stimulation by histamine, pentagastrin and carbachol. *Acta Physiol Scand*. 1985;123:349-54.

Marino M, Maifreni M, Moret S, Rondinini G. The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. *Lett Appl Microbiol*. 2000;31:169-73.

Martel F, Gründemann D, Calhau C, Schömig E. Apical uptake of organic cations by human intestinal Caco-2 cells: putative involvement of ASF transporters. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2001;363:40-9.

Martens-Lobenhoffer J, Neumann HJ. Determination of 1-methylhistamine and 1-methylimidazoleacetic acid in human urine as a tool for the diagnosis of mastocytosis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999;721:135-40.

Melega WP, Howard BD. Choline and acetylcholine metabolism in PC12 secretory cells. *Biochemistry*. 1981;20:4477-83.

Moseley RH, Takeda H, Zuggler LJ. Choline transport in rat liver basolateral plasma membrane vesicles. *Hepatology*. 1996;24:192-7.

- Nakos G, Gossrau R. Visualization of hydrogen peroxide (H₂O₂)-production from histamine. *Ann Anat.* 1995;177:431-8.
- Nilsson B-O, Kockum I, Rosengren E. Inhibition of diamine oxidase promotes uptake of putrescine from rat small intestine. *Inflamm Res.* 1996;45:513-8.
- O'Donnell MC, Ackerman SJ, Gleich GJ, Thomas LL. Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. *J Exp Med.* 1983;157:1981-91.
- Ogasawara M, Yamauchi K, Satoh Y, Yamaji R, Inui K, Jonker JW, Schinkel AH, Maeyama K. Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: organic cation transporters as a histamine transporter and histamine metabolism. *J Pharmacol Sci.* 2006;101:24-30.
- Ohtsu H, Watanabe T. New functions of histamine found in histidine decarboxylase gene knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305:443-7.
- Okada M, Kawashima S, Imahori K. Substrate specificity and reaction mechanism of putrescine oxidase. *J Biochem.* 1979;86:97-104.
- Orci L, Ravazzola M, Anderson RG. The condensing vacuole of exocrine cells is more acidic than the mature secretory vesicle. *Nature.* 1987;326:77-9.
- Panula P, Yang H-YT, Costa E. Histamine-containing neurons in the rat hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984;81:2572-6.
- Porter RK, Scott JM, Brandt MD. Choline transport into rat liver mitochondria. Characterisation and kinetics of a specific transporter. *J Biol Chem.* 1992;21:14637-46.
- Powell Don W. Barrier function of epithelia. *Am J Physiol.* 1981;241:G275-88.
- Rajan PD, Kekuda R, Chancy CD Huang W, Ganapathy V, Smith SB. Expression of the extraneuronal monoamine transporter in RPE and neural retina. *Curr Eye Res.* 2000;20:195-204.
- Riley JF, West GB. The presence of histamine in tissue mast cells. *J Physiol.* 1953;120:528-37.
- Saito K, Horie M, Nose N, Nakagomi K, Nakazawa H. High-performance liquid chromatography of histamine and 1-methylhistamine. *J Chromatogr.* 1992;595:163-8.
- Sattler J, Häfner D, Klotter HJ, Lorenz W, Wagner PK. Food-induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after

oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents Actions*. 1988;23:361-5.

Sattler J, Lorenz W. Intestinal diamine oxidases and enteral-induced histaminosis: studies on three prognostic variables in an epidemiological model. *J Neural Transm Suppl*. 1990;32:291-314.

Sattler J, Lorenz W, Kubo K, Schmal A, Sauer S, Lüben L. Food-induced histaminosis under diamine oxidase (DAO) blockade in pigs: further evidence of the key role of elevated plasma histamine levels as demonstrated by successful prophylaxis with antihistamines. *Agents Actions*. 1989;27:212-14.

Schayer RW, Karjala SA. Ring N methylation; a major route of histamine metabolism. *J Biol Chem*. 1956;221:307-13.

Sessa A, Perin A. Diamine oxidase in relation to diamine and polyamine metabolism. *Agents Actions*. 1994;43:69-77.

Schlumbohm Ch, Menzler M, Harmeyer J. Gastrin und Histamin im Plasma beim Schwein: Einfluss von Stress und Ca-Gehalt der Ration. *Proc Soc Nutr Physiol*. 1999;8:93.

Schneider R, Kreienbring F, Bolduan G, Beck M. Biogene Amine in der Digesta von Schweinen. *Arch Anim Nutr, Berlin*. 1989;39:1021-9.

Schuler W. Zur Hemmung der Diaminoxidase (Histaminase). *Experientia*. 1952;8:230-2.

Schwelberger HG, Bodner E. Purification and characterization of diamine oxidase from porcine kidney and intestine. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1340:152-64.

Schwelberger HG, Dieplinger H, Kohlwein SD. Diamine oxidase and catalase are expressed in the same cells but are present in different subcellular compartments in porcine kidney. *Inflamm Res*. 1999;48(Suppl 1):S81-2.

Schwelberger HG, Hittmair A, Kohlwein SD. Analysis of tissue and subcellular localization of mammalian diamine oxidase by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Inflamm Res*. 1998a;47(Suppl 1):S60-1.

Schwelberger HG, Stalzer B, Maier H, Bodner E. Expression and cellular localisation of diamine oxidase in the gastrointestinal tract of pigs. *Inflamm Res*. 1998b;47(Suppl 1):S62-3.

Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilvery IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, McDowall RD, Pittmann KA, Spector S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Pharm Res*. 1992;9:588-92.

Stern-Bach Y, Keen JN, Bejerano M, Steiner-Mordoch S, Wallach M, Findlay JBC, Schuldiner S. Homology of a vesicular amine transporter to a gene conferring resistance to 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:9730-3.

Strecker A. Über einige neue Bestandteile der Schweinegalle. *Ann Chem Pharmacie*. 1862;183:964-5.

Stuart AE, Morgan JR, Mekeel HE, Kempte E, Callawar J. Selective, activity-dependent uptake of histamine into an arthropod photorezeptor. *Neurosci*. 1996;16:3178-88.

Swartz ME, Krull IS. Validation of chromatographic methods. *Pharm Technol*. 1998;22:104-19.

Tahara A, Nishibori M, Ohtsuka A, Sawada K, Sakiyam J, Saeki K. Immunohistochemical localization of histamine-N-methyltransferase in guinea pig tissues. *J Histochem Cytochem*. 2000;48:943-54.

Taskila K, Saarinen JV, Harvima IT, Harvima RJ. Histamine and LTC₄ in stinging nettle-induced urticaria. *Allergy*. 2000;55:680-1.

Thørboll JE, Skadhauge E. The effect of histamine on ion transport in porcine jejunum. *Comp Biochem Physiol*. 1997;118A:301-4.

Traynor TR, O'Grady SM. Mechanisms of Na and Cl absorption across the distal colon epithelium of the pig. *J Comp Physiol B*. 1992;162:47-53.

Tsuruta Y, Kohashi K, Ohkura Y. Simultaneous determination of histamine and N^ε-methylhistamine in human urine and rat brain by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr*. 1981;224:105-10.

Venza I, Visalli M, Ceci G, Teti D. Quantitative determination of histamine in tears during conjunctivitis by a novel HPLC method. *Ophthalmic Res*. 2004;36:62-9.

Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon MD. Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J Neurosci*. 1996;16:2352-64.

Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Maître L. Methylhistamine: evidence for selective deamination by MAO B in the rat brain *in vivo*. *J Neurochem*. 1977;29:785-90.

Walter A, Gutknecht J. Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes. *J Membr Biol*. 1986;90:207-17.

Weihe E, Eiden LE. Chemical neuroanatomy of the vesicular amine transporters. *FASEB J.* 2000;14:2435-49.

Wollin A. Histamine uptake and its methylation by isolated oxyntic cells. *Clin Invest Med.* 1987;10:136-9.

Wollin A. Uptake and methylation of histamine by dispersed gastric mucosal cells and its possible influence on acid secretion. *Can J Physiol Pharmacol.* 1990;68:71-8.

Yamamura HI, Snyder SH. High affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain. *J Neurochem.* 1973;21:1355-74.

Zeidan H, Watanabe K, Piette LH, Yasunobu KT. Electron spin resonance studies of bovine plasma amine oxidase; Probing of the environment about the substrate-liberated sulfhydryl groups in the active site. *J Biol Chem.* 1980;255:7621-6.

Zeisel SH. Choline: needed for normal development of memory. *J Am Coll Nutr.* 2000;19:528S-31.

Zeisel SH, Da Costa K-A, Franklin PD, Alexander EA, Lamont JT, Sheard NF, Beiser A. Choline, an essential nutrient for humans. *FASEB J.* 1991;5:2093-8.

Zeisel SH, Wurtman RJ. Developmental changes in rat blood choline concentration. *Biochem J.* 1981;198:565-70.

Anlagen

Anlage 1: Verwendete Chemikalien mit Hersteller

Substanz	Hersteller
N-Acetyl-cystein, NAC	Sigma
Aminoguanidin	Sigma
Amodiaquin	Sigma
Aquasafe® 300 Plus	Zinsser
Azetonitril	Roth
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Merck
Carbogengas (95% O ₂ / 5% CO ₂)	Messer-Griesheim
Cholinchlorid	Merck
[Methyl- ³ H]-Cholinchlorid	Amersham Biosciences
N-Ethylmaleimid, NEM	Fluka
D-Glucose·H ₂ O	Merck
HCl	Merck
Histamin·2HCl	Fluka
[2,3- ³ H]-Histamin·2HCl	Amersham Biosciences
KCl	Merck
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Merck
Methanol	Roth
1-Methyl-4-phenylpyridiniumiodid, MPP-iodid	Sigma
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure, MOPS	Sigma
Na-Azetat·3H ₂ O	Merck
Na ₂ Ba ₄ O ₇ ·3H ₂ O	Merck
Na-Butyrat	Merck
NaCl	Merck
NaHCO ₃	Merck
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	Merck
NaOH	Merck
85 %ige <i>ortho</i> -Phosphorsäure	Sigma
<i>ortho</i> -Phtaldialdehyd	Fluka

Anlage 2: Elektrophysiologische Daten von den einzelnen Versuchen zwischen der ersten und der zweiten Probenahme

Kapitel 4.1.1 Versuchsgruppen (n=15; N=7)	G_t der MS-Fluxrate ($mS \cdot cm^{-2}$)	G_t der SM-Fluxrate ($mS \cdot cm^{-2}$)	I_{sc} der MS-Fluxrate ($\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)	I_{sc} der SM-Fluxrate ($\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)
3000 μM Cholin	29,8 \pm 12,2	34,2 \pm 12,9	0,52 \pm 0,21	1,60 \pm 0,60
300 μM Cholin	25,4 \pm 18,0	30,2 \pm 10,7	-0,14 \pm 0,10	0,70 \pm 0,25
30 μM Cholin	17,8 \pm 8,0	27,4 \pm 9,7	1,01 \pm 0,41	0,33 \pm 0,12
3 μM Cholin	33,9 \pm 12,8	22,7 \pm 7,6	2,23 \pm 0,84	0,11 \pm 0,04

Kapitel 4.1.2, 4.1.3 Versuchsgruppen (n=9; N=5)	G_t der MS-Fluxrate ($mS \cdot cm^{-2}$)	G_t der SM-Fluxrate ($mS \cdot cm^{-2}$)	I_{sc} der MS-Fluxrate ($\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)	I_{sc} der SM-Fluxrate ($\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)
Kontrolle	19,0 \pm 2,0	20,2 \pm 2,0	0,52 \pm 0,23	0,69 \pm 0,15
MPP	16,1 \pm 1,3	16,1 \pm 1,5	0,38 \pm 0,13	0,42 \pm 0,13

Kapitel 4.5.1, 4.5.2, 4.5.3 Versuchsgruppen (n=12; N=7)	G_t der MS-Fluxrate ($mS \cdot cm^{-2}$)	G_t der SM-Fluxrate ($mS \cdot cm^{-2}$)	I_{sc} der MS-Fluxrate ($\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)	I_{sc} der SM-Fluxrate ($\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)
Kontrolle	15,2 \pm 4,4	24,4 \pm 7,1	0,92 \pm 0,26	0,73 \pm 0,21
AD	14,6 \pm 4,2	18,5 \pm 5,4	0,86 \pm 0,25	0,50 \pm 0,15
AG	16,5 \pm 4,8	17,5 \pm 5,1	0,96 \pm 0,28	0,47 \pm 0,14
Endogene Freisetzung (n=6; N=6)	G_t ($mS \cdot cm^{-2}$)		I_{sc} ($\mu Eq \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)	
EF	21,0 \pm 6,7		0,42 \pm 0,13	
EF + AD	20,0 \pm 6,3		0,40 \pm 0,13	
EF + AG	34,2 \pm 10,6		0,28 \pm 0,09	

Kapitel 4.6.1, 4.6.2 Versuchsgruppen (n=9; N=9)	G_t der MS-Fluxrate (mS*cm ⁻²)	G_t der SM-Fluxrate (mS*cm ⁻²)	I_{sc} der MS-Fluxrate (μ Eq*cm ⁻² *h ⁻¹)	I_{sc} der SM-Fluxrate (μ Eq*cm ⁻² *h ⁻¹)
Kontrolle	13,3 ± 4,7	15,7 ± 5,5	0,77 ± 0,27	0,94 ± 0,33
AG	16,6 ± 5,9	16,1 ± 5,4	0,84 ± 0,30	0,45 ± 0,16
NEM	13,2 ± 4,4	17,7 ± 5,9	0,17 ± 0,06	0,19 ± 0,07
NEM + AG	16,4 ± 6,2	17,7 ± 6,2	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Endogene Freisetzung (n=9; N=9)	G_t (mS*cm ⁻²)		I_{sc} (μ Eq*cm ⁻² *h ⁻¹)	
EF	13,0 ± 4,9		0,80 ± 0,30	
EF + AG	13,1 ± 4,6		0,72 ± 0,25	
EF + NEM	15,3 ± 5,4		0,33 ± 0,12	
EF + NEM + AG	21,2 ± 7,1		-0,01 ± 0,00	

Anmerkungen zu den Tabellen in Anhang 2: MPP: Methylphenylpyridinium; AD: Amodiaquin; AG: Aminoguanidin; NEM: N-Ethylmaleimid; EF: endogene Freisetzung

Die Tabellen im Anhang 2 stellen die durchschnittlichen Leitfähigkeitswerte (G_t in mS*cm⁻²; MW ± SEM) und Kurzschlussströme (I_{sc} in μ Eq*cm⁻²*h⁻¹; MW ± SEM) der einzelnen Versuchsgruppen zwischen der ersten und der zweiten Probenahme dar.

Danksagung

Ein herzliches Dankeschön sei an dieser Stelle gesagt:

Herrn Prof. Dr. med. vet. habil. G. Gäbel

für die Überlassung des Themas, die fachliche Unterstützung bei der Erarbeitung der Versuchskonzeptionen, die fachliche Betreuung bei der Datenauswertung und der Anfertigung der Dissertationsschrift

Herrn Dr. med. vet. J. R. Aschenbach

für die Zusammenarbeit bei der Erstellung der Versuchskonzeptionen, für die Hilfe bei den Versuchsdurchführungen, die fachliche Betreuung bei der Datenauswertung und der Anfertigung der Dissertationsschrift

Der H. W. Schaumann Stiftung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft

für die finanzielle Absicherung dieser Dissertation durch ein Stipendium bzw. Sachmittel

Frau Dr. med. vet. B. Füll und Frau Dr. rer. nat. I. Buchholz

für die Einführung und die Hilfe bei der Einarbeitung in die HPLC-Analyse

Frau K. Nestler und Frau A. Schmidt-Mähne

für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der Ussingkammer-Versuche

Frau Dr. rer. nat. J. Gottschalk und Frau G. Lochmann

für die Messung der radioaktiven Proben und die Unterstützung bei der Lagerung und Entsorgung der radioaktiven Substanzen

Herrn R. Schaffrath und Herrn W. Schilbach

für die technische Hilfe aller Art, vor allem bezüglich der Ussingkammer

Herrn K. Benson

für die engagierte Pflege der Tiere und die Unterstützung bei der Probengewinnung

Allen MitarbeiterInnen und DoktorandInnen des Veterinär-Physiologischen Instituts

für das angenehme Arbeitsklima und die gegenseitige Hilfe