

**UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DIREKTER ANTIALLERGISCHER EFFEKTE
VON FEXOFENADIN AN VERSCHIEDENEN ZELLSYSTEMEN**

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Regina Sabine Amon
aus Tübingen

Marburg/Lahn 2002

Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am

1. 5. 2002 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Heldmaier

Zweitgutachter: Prof. Lingelbach

Tag der mündlichen Prüfung am 15. 5. 2002

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Allergien	1
1.2	Einteilung der Allergien nach Coombs und Gell	2
1.3	IgE-vermittelte Krankheitsbilder	3
1.3.1	Urtikaria	3
1.3.2	Atopische Erkrankungen	4
1.3.2.1	Atopische Dermatitis	4
1.3.2.2	Allergisches Asthma bronchiale	5
1.3.2.3	Rhinitis allergica	5
1.4	Pathogenese der IgE-vermittelten Reaktion	5
1.5	Effektorzellen der Sofortallergie	7
1.5.1	Mastzellen und basophile Leukozyten	7
1.5.1.1	Ontogenese und Vorkommen	8
1.5.1.2	Morphologie und Färbeverhalten	9
1.5.1.3	Mediatoren	11
1.5.1.4	Rezeptoren	16
1.5.2	Eosinophile Leukozyten	18
1.5.2.1	Historischer Hintergrund	18
1.5.2.2	Ontogenese und Vorkommen	19
1.5.2.3	Morphologie und Färbeverhalten	19
1.5.2.4	Mediatoren	21
1.5.2.5	Rezeptoren	23
1.6	Histaminrezeptoren	23
1.6.1	H ₁ -Rezeptorantagonisten (Antihistaminika)	25
1.6.2	Fexofenadin	29

2. Fragestellung und Ziele

3. Material und Methoden

3.1	Puffer und Lösungsmittel	34
3.2	Immunologische und nichtimmunologische Liberatoren	35
3.3	Untersuchungen zum Zellpriming	35
3.4	Isolierung basophiler Leukozyten	36
3.4.1	Isolierung aus Vollblut	36
3.4.2	Isolierung aus <i>buffy coats</i>	37
3.4.3	Weiterverarbeitung des Leukozytenkonzentrats	37
3.4.4	Anreicherung	38
3.5	Isolation eosinophiler Leukozyten	39
3.6	Leukozyten aus Blut von Patienten mit atopischer Dermatitis	39
3.7	Zellaktivierung	39

3.8	Experimente zur Signaltransduktion	40
3.8.1	Proteinkinase C	40
3.8.2	Proteinkinasetests	41
3.8.3	cAMP-abhängige Proteinkinase	42
3.8.4	Tyrosinkinase	42
3.8.5	Proteintyrosinphosphatase(CD45 Rezeptorphosphatase)	43
3.9	Mediatormessung	43
3.9.1	Histamin	43
3.9.2	Leukotrien C ₄	44
3.9.3	Eosinophiles kationisches Protein	45
3.9.4	Interleukin 4	45
3.10	<i>Ex vivo-in vitro</i> Experimente	46
3.11	Statistische Tests	46
4.	Ergebnisse	47
4.1	Experimente mit isolierten basophilen Leukozyten	47
4.1.1	IgE-vermittelte Histaminfreisetzung	47
4.1.2	IgE-vermittelte Freisetzung von IL-4	48
4.1.3	Interleukin-3-induziertes Priming	49
4.1.4	LTC ₄ -Produktion	50
4.2	Experimente mit isolierten eosinophilen Leukozyten	51
4.2.1	Aktivierung mit Kalziumionophor A23187	51
4.2.2	Weitere Untersuchungen zur A23187-Aktivierung	53
4.2.3	Reversibilität der Inhibition	55
4.2.4	Kinetik der Inhibition	56
4.2.5	Ko-Stimulation mit A23187 und GM-CSF	58
4.3	Aktivierung von Leukozyten atopischer Spender	59
4.4	<i>Ex vivo – in vitro</i> Experimente	60
4.4.1	A23187-vermittelte ECP-Freisetzung	60
4.4.2	Histaminfreisetzung	62
4.5	Experimente zu Elementen der Signaltransduktion	64
4.5.1	Proteinkinase C	64
4.5.2	c-AMP-abhängige Proteinkinase A	65
4.5.3	scr-Tyrosinkinase	65
4.5.4	Proteintyrosinphosphatase (CD45 Phosphatase)	66
5.	Diskussion	68
5.1	Wirkung von Fexofenadin auf allergische Effektorzellen	68
5.1.1	Wirkung auf basophile Leukozyten und Mastzellen	68
5.1.2	Wirkung auf eosinophile Leukozyten <i>in vitro</i>	71
5.1.3	Wirkung auf eosinophile und basophile Leukozyten <i>in vivo</i>	73
5.2	Vergleich zu anderen H ₁ -Rezeptorantagonisten	74

5.3	Wirkungsweise an allergischen Zellen	76
5.4	Interaktion von Fexofenadin mit der Signaltransduktion	80
5.5	Klinische Relevanz der Beobachtungen	82
5.6	Andere pharmakologische Ansätze	85
5.7	Bewertung und Ausblick	85
6. Zusammenfassung		88
7. Literatur		90
Abkürzungen		103
Danksagung		
Lebenslauf		

1. Einleitung

1.1 Allergien

Allergische Erkrankungen gehören besonders im Kindes- und Jugendalter zu den großen Gesundheitsproblemen unserer Gesellschaft. Zwar führen sie selten zum Tode, beeinträchtigen jedoch durch ihre Chronizität und Schwere nachhaltig die Lebensqualität der Betroffenen.

1906 prägte der Wiener Pädiater von Pirquet den Begriff der Allergie, den wir heute als eine spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit verstehen.

Der oftmals synonym gebrauchte Begriff der „Atopie“, 1923 von Coca und Cook eingeführt, bezeichnet zunächst einen Formenkreis häufig zusammenhängender Erkrankungen: Asthma bronchiale, Rhinitis allergica (Heuschnupfen) und atopische Dermatitis (synonym: endogenes Ekzem, Neurodermitis).

Aufgrund der genetischen Veranlagung mit allergischer Disposition tragen 24 – 32 Millionen Menschen in Deutschland ein Allergierisiko. Davon entwickeln im Laufe ihres Lebens ungefähr 12 Millionen eine allergische Rhinitis, etwa 6 Millionen zeigen Symptome einer atopischen Dermatitis und ungefähr 4 Millionen erkranken an allergischem Asthma bronchiale [The International Study of Asthma and Allergies in Childhood, 1998].

Die Ursachen für die Entstehung einer Allergie und die messbare Zunahme in den vergangenen zwei Jahrzehnten sind multifaktoriell. Neben der genetischen Veranlagung spielen der persönliche Lebensstil, gesellschaftliche Veränderungen und Umweltfaktoren eine krankheitsbegünstigende Rolle (z.B. Familiengröße, frühkindliche Infekte, Stillzeit, Ernährung, Bauweise, Umweltverschmutzung, Nikotinexposition und zahlreiche andere Faktoren) [Kulig et al., 1999, Barnes, 2000, Halken et al., 2000].

1.2 Einteilung der Allergien nach Coombs und Gell

Normalerweise schützt unser Immunsystem den Körper vor eindringenden Fremdproteinen und Mikroorganismen. Schon beim ersten Kontakt werden diese durch spezifische und unspezifische Abwehrreaktionen unschädlich gemacht. Anders bei Allergikern. Das Wort Allergie leitet sich aus den griechischen Wörtern *allos* (anders) und *ergos* (Arbeit) ab. Das Immunsystem „arbeitet anders“. Beim Erstkontakt mit einem Fremdstoff, dem Allergen, entwickelt sich statt einer Immunität eine Überempfindlichkeit, eine sog. Sensibilisierung. Während der Erstkontakt noch klinisch stumm verläuft, kommt es bei jedem weiteren Kontakt zumeist zu einer überschießenden Reaktion des Immunsystems, der sog. allergischen Reaktion.

Nach Coombs und Gell [Coombs und Gell, 1975] werden allergische Reaktionen in vier Haupttypen eingeteilt:

Typ I – Soforttyp

Durch übermäßige Bildung von Antikörpern vom Typ des Immunglobulins E (IgE) nach dem Erstkontakt mit dem Allergen kommt es Sekunden bis Minuten (selten auch Stunden) nach dem Zweitkontakt zu einer überschießenden Entzündungsreaktion, der sog. anaphylaktischen Reaktion. Typische Reaktionen des Körpers sind – je nach primär betroffenem Organ – beispielsweise Augenjucken/-tränen, Niesanfalle, Nasenlaufen, Atemnot, rote Flecken (Flush) oder Quaddeln (Urtikaria) an der Haut, aber auch Durchfälle und Kreislaufbeschwerden.

Der sog. anaphylaktische Schock ist die Maximalform des Soforttyps aufgrund einer Generalisierung der allergischen Reaktion und kann im schlimmsten Fall zum Tod führen.

Dieser Reaktionsverlauf hat für den Hintergrund der vorliegenden Arbeit besondere Bedeutung und wird unter Abschnitt 1.4 näher erläutert.

Typ II – Zytotoxischer Typ

IgG- und IgM-Antikörper richten sich gegen Oberflächenstrukturen von Zellen. Meist innerhalb von Minuten bis Stunden nach dem Allergenkontakt werden diese Zellen zerstört (Beispiel: Blutgruppenunverträglichkeiten).

Typ III – Immunkomplextyp

Im Blut zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe lösen innerhalb von Minuten bis Stunden (selten auch Tagen) nach dem Allergenkontakt durch Bindung von Komplementfaktoren C3a und C5a (Anaphylatoxine) Entzündungsprozesse aus (Beispiel: allergische Vaskulitis).

Typ IV – Spättyp

Im Gegensatz zu den drei vorgenannten Allergietypen sind bei der Allergie vom Spättyp keine Antikörper, sondern T-Lymphozyten Ursache der allergischen Reaktion. Nach Erstkontakt mit dem Allergen sind diese Zellen sensibilisiert und führen bei Zweitkontakt nach mehreren Tagen zu einer Entzündungsreaktion (z. B. allergisches Kontaktekzem bei Modeschmuckunverträglichkeit).

Von besonderem Interesse sind im Rahmen dieser Arbeit IgE-vermittelte allergische Erkrankungen von denen einige nachfolgend kurz vorgestellt werden.

1.3 IgE-vermittelte Krankheitsbilder

IgE-vermittelte Krankheitsbilder haben gemeinsam, dass Mastzellen und basophile Leukozyten über die auf der Oberfläche exprimierten IgE-Rezeptoren zahlreiche Mediatoren freisetzen, die für die Pathogenese dieser Erkrankungen bedeutsam sind.

1.3.1 Urtikaria

Bei der Urtikaria (Nesselsucht; *Urtica dioica*, lat. = Brennnessel) bilden sich als Hautausschlag Quaddeln, die mit Juckreiz und Rötung einhergehen. Neben zahlreichen unspezifischen Auslösern kann die Urtikaria IgE-abhängig beispielsweise durch Nahrungsmittel (z.B. Milcheiweiß, Fisch, Weizen), Arzneimittel (z.B.

Penicillin) oder Insektengifte (z. B. Biene, Wespe) verursacht werden.

Zu den nicht IgE-abhängigen Urtikariaerkrankungen zählen die physikalischen Urtikariaformen (z.B. Kälteurtikaria, Druckurtikaria) [Palma-Carlos und Jordao, 1991] und die Kontakturtikaria, die nur an Hautarealen auftritt, die mit der auslösenden Substanz Kontakt hatte (z.B. Brennessel, Insektenstiche, Quallen). Die genauen Mechanismen der Quaddelbildung sind hierbei zumeist unklar [Oliver, 1991].

1.3.2 Atopische Erkrankungen

1.3.2.1 Atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis ist eine häufige, zur Chronizität neigende Dermatose mit variantenreichem klinischen Erscheinungsbild, das mit starkem Juckreiz einhergeht [Rudikoff und Lebwohl, 1998]. Die Erkrankung verläuft schubartig. Außer Gesicht und Hals sind besonders häufig die Beugen der großen Gelenke betroffen. Die betroffenen Hautareale neigen zu Infektionen mit Staphylokokken und Viren [Kapp, 1995]. Zum Ausbruch der Erkrankung tragen Nahrungsmittelallergene, Innenraumallergene (z.B. Hausstaubmilben), Hautirritationen, psychische und zahlreiche andere Faktoren bei [Böhm und Bauer, 1997; Rothenberger 1998].

In chronischen Hautläsionen bei atopischer Dermatitis finden sich vermehrt Mastzellen [Mihm et al., 1976], der Histamingehalt in diesen Arealen ist erhöht [Ring et al., 1983]. Auch basophile Leukozyten spielen in der Akutphase der atopischen Dermatitis eine Rolle [Mitchell et al., 1982]. Das 1976 von Lichtenstein und Conroy aufgestellte Konzept der *altered releasability* der Basophilen von Atopikern, also einer gegenüber Zellen von Gesunden verstärkten Mediatorfreisetzung, konnte durch zahlreiche Untersuchungen bestätigt werden [Marone et al., 1986, Casolaro et al., 1990].

1.3.2.2 Allergisches Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronisch-obstruktive Lungenerkrankung, die durch Bronchokonstriktion mit entzündlichen Veränderungen, bronchialer Hyperreaktivität und sekundärem fibrotischen Umbau des Lungengewebes bei langjähriger Bestehensdauer charakterisiert ist. Es wird ausgelöst durch Allergene wie Tierhaare, Hausstaubmilben, Federn, Pollen, Schimmelpilze. Häufig findet die Sensibilisierung im frühen Kindesalter statt [Kroegel und Matthys, 1992, Hoshino und Nakamura, 1997].

1.3.2.3 Rhinitis allergica

Bei der allergischen Rhinitis handelt es sich um ein Krankheitsbild, das sich in erster Linie an der Nasenschleimhaut unter Einbeziehung der Konjunktiven (Rhinokonjunktivitis), aber auch der Nebenhöhlen, abspielt. Zu den Kardinalsymptomen zählen Juck- und Niesreiz, Rhinorrhoe und nasale Obstruktion [White und Kaliner, 1992].

Neben dem Hauptmediator, dem Histamin, sind zahlreiche andere Botenstoffe an der Entstehung der Erkrankung beteiligt [White und Kaliner 1992].

Das Auftreten kann saisonal (Pollinose, Heuschnupfen) wie auch ganzjährig (z.B. durch Milben, Tierhaare, Bettfedern, Berufsallergene) vorkommen. In bis zu 40 % der Fälle kommt es zu einem „Etagenwechsel“ mit der Folge eines Asthma bronchiale [Howarth et al., 1991].

1.4 Pathogenese der IgE-vermittelten Reaktion

Über die Pathogenese der IgE-vermittelten Reaktion sind wir heute gut informiert.

Immunglobuline sind die Antigenrezeptoren der B-Zellen (B-Lymphozyten). Sie werden auf der Zelloberfläche reifer B-Zellen exprimiert sowie von terminal-differenzierten B-Zellen, den Plasmazellen, produziert und als Antikörper ins Blut abgegeben. Immunglobuline sind Glykoproteine, die aus zwei identischen Schwereketten (H = „heavy chain“) und zwei identischen

Leichtketten (L = „light chain“) bestehen. Ihr Molekulargewicht beträgt zwischen 25.000 und 70.000 Da.

Cysteinreste bilden Brücken zwischen den Ketten eines Immunglobulins. Das Enzym Papain spaltet zwei identische Fragmente, welche Antigenbindungsfähigkeit besitzen (Fab-Fragmente) von einem nicht antigenbindenden Fc-Fragment.

Reife B-Zellen exprimieren IgE auf der Zelloberfläche, welches frei im Serum in nur sehr geringen Mengen nachweisbar ist. Es wird über das Fc-Fragment an den Fc_εRI-Rezeptor an Mastzellen und basophile Leukozyten gebunden (Abbildung 1).

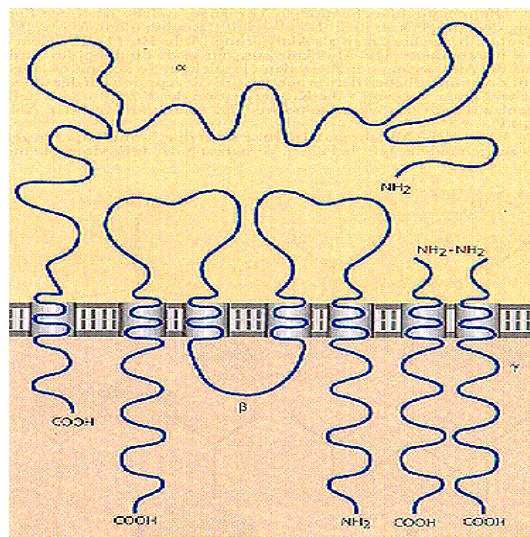


Abbildung 1. Der Fc_ε-Rezeptor [nach Brostoff, 1991]

Phylogenetisch ist IgE wichtig für die Abwehr von Parasiten (z.B. Würmer) und spielt eine wichtige Rolle bei der Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (Typ I). Einige Antigene (Allergene), wie z.B. Pollen, Milben, Tierhaare, Schimmelpilze, Nahrungsmittel können bei prädisponierten Menschen die Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern induzieren. Diese binden über Fc_εRI-Rezeptoren an Mastzellen und basophile Leukozyten (Sensibilisierung). Bei Reexposition mit dem Allergen kommt es zur exozytotischen Ausschleusung bzw. Neubildung von Entzündungsmediatoren aus diesen Zellen (siehe folgender Abschnitt) innerhalb von Sekunden bis Minuten.

1.5 Effektorzellen der Sofortallergie

1.5.1 Mastzellen und basophile Leukozyten

Mastzellen und basophile Leukozyten spielen bei der Auslösung der allergischen Sofortreaktionen eine zentrale Rolle.

Mastzellen sind ortsständige Gewebezellen, die durch zelltypische, mediatorhaltige, zytoplasmatische Granula, metachromatisches Färbverhalten, Expression hochaffiner Rezeptoren für IgE ($Fc_{\epsilon}RI$) und exozytotische Ausschleusung von Histamin und anderen Mediatoren nach Bindung von Antigen charakterisiert werden können [Wedemeyer und Galli, 2000]. Ähnliche Eigenschaften weisen die primär in der Zirkulation befindlichen basophilen Leukozyten auf.

Im Jahr 1863 wurde die Mastzelle erstmals in den Aufzeichnungen von Friedrich von Recklinghausen erwähnt. Dieser beobachtete Mastzellen an ungefärbten Präparaten des Froschmesenteriums [von Recklinghausen, 1863]. 1878 beschrieb Paul Ehrlich in seiner Dissertation die metachromatische Anfärbbarkeit der Mastzelle und des basophilen Granulozyten, wobei er den Namen „Mastzelle“ prägte, weil diese Zelle mit ihren zahlreichen Granula wie gemästet aussah [Ehrlich, 1878 und 1879].

Im folgenden Jahrhundert nahm das Interesse und das Wissen über diese Zellen ständig zu. Riley und West entdeckten das Histamin als Bestandteil der Zellgranula [Riley und West, 1953].

Nach Entdeckung der IgE-Rezeptoren auf der Mastzelloberfläche [Ishizaka, 1971] wurde der Zusammenhang mit der Allergen- bzw. Antigen-vermittelten Mediatorfreisetzung deutlich.

Die allergische Immunantwort ist durch eine Vielfalt von zellulären und molekularen Interaktionen charakterisiert. Um den Stellenwert der basophilen Leukozyten zu verdeutlichen, soll dies hier kurz erläutert werden: Inhalationsallergene dringen durch den Respirations-, aber auch durch den Gastrointestinaltrakt oder durch die Haut in den Organismus ein und werden durch

Makrophagen, dendritische Zellen, Langerhans- oder B-Zellen aufgenommen. Nach Phagozytose und Prozessierung der Allergene werden diese sog. Allergen-spezifischen T-Helfer(TH)-Zellen Typ2 präsentiert [Prinz, 1993]. Diese setzen im aktivierten Zustand die Interleukine IL-3, IL-4, IL-5 und IL-10 frei. Der direkte Kontakt von TH2-Zellen mit B-Zellen aktiviert diese und IL-4 bewirkt, dass die B-Zellen von der IgM-Produktion auf die Synthese von IgE umstellen (Antikörperklassenwechsel). Die IgE-Antikörper werden mittels des Fc_εR1-Rezeptors von Mastzellen und Basophilen aufgenommen, was nach erneutem Allergenkontakt zur Aktivierung der Mediatorfreisetzung und damit zur klinischen Manifestation der allergischen Reaktion führt. Da Mastzellen und Basophile zur Produktion von IL-4 befähigt sind, können sie selbständig die IgE-Produktion induzieren.

So haben sich Mastzellen und basophile Leukozyten anhand der Forschungsergebnisse als fundamentale Komponenten der Pathogenese allergischer Erkrankungen erwiesen.

1.5.1.1 Ontogenese und Vorkommen

Bei Säugetieren finden sich Mastzellen besonders gehäuft an begrenzenden Oberflächen des Organismus, also in der Haut und Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes und des Tracheobronchialsystems. Diese Verteilung bringt Mastzellen mit Parasiten und Umweltallergenen, wie Pollen, Hausstaubmilben, Tierepithelien aber auch Nahrungsmitteln in Kontakt.

Der Ursprung der Mastzelle aus dem Knochenmark wurde in verschiedenen Studien an Mäusen nachgewiesen [Schwartz und Huff, 1993]. Mastzellen stammen von CD34+ Stammzellen ab [Agis et al., 1993]. Vorläufer sind c-kit+, CD34+, CD14- und CD17-Kolonie bildende Zellen [Agis et al., 1993]. Sie kommen im Knochenmark und im peripheren Blut vor. Mastzellvorläufer binden über ihren c-kit-Tyrosinkinase-Rezeptor an den wahrscheinlich wichtigsten Wachstumsfaktor für Mastzellen, *Stem*

Cell Factor, und differenzieren so zu Mastzellen [Kitamura et al., 1993].

Im Gegensatz zu den ortsständigen Gewebemastzellen zirkulieren die basophilen Leukozyten im Blut. Sie repräsentieren 0,5 – 1% der gesamten Leukozyten im Blut des menschlichen Organismus (ca. 15 Zellen/nl). Unter bestimmten Bedingungen, z.B. in der Spätphase (sog. *Late phase reaction*) der allergischen Typ I-Reaktion, können sie vorübergehend in das Bindegewebe migrieren und dort die Aufgabe einer Immunantwort übernehmen. Wie bei anderen Zellen der leukozytären Reihe liegt der Ursprung der Basophilen ebenfalls im Knochenmark. Auch sie stammen von pluripotenten, CD34+ hämatopoetischen Stammzellen ab. Sie differenzieren unter dem Einfluss von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, wie IL-3, IL-5 und Granulozyten Makrophagen-Colonie stimulierendem Faktor (GM-CSF) zu reifen Blutzellen [Metcalf et al., 1992].

1.5.1.2 Morphologie und Färbeverhalten

Die reife Mastzelle hat eine kuboide bis spindelförmige Kontur und ist eine im Vergleich zu anderen Bindegewebszellen große Zelle mit einem Durchmesser von 8 bis 20 µm. Der Basophile ist 7 bis 10 µm groß und hat eine unregelmäßige Oberfläche. Der relativ kleine Zellkern der Mastzellen ist im Gegensatz zu basophilen Leukozyten oval, nicht segmentiert, zentral lokalisiert und enthält weniger kondensiertes Chromatin. Elektronenmikroskopisch fallen 500 bis 1000 dichtgepackte Granula in beiden Zellpopulationen auf. Der Gehalt an Granula kann bis zu 40 % des gesamten Zellvolumens betragen [Schwartz und Austen, 1988]. Der Basophile hat weniger aber dafür größere Granula (Durchmesser bis zu 1,2 µm) als die Mastzelle. Basophilengranula sind meist membrangebunden und enthalten elektronendichte Partikel. Mastzellgranula bestehen aus inkompletten, konzentrischen Membranen, welche gitterartige Strukturen bilden [Weidner und Austen, 1990; Tkaczyk und Gilfillan, 2001].

Basophile Leukozyten und Mastzellen lassen sich mit basischen Farbstoffen wie Toluidinblau charakteristisch metachromatisch anfärben. Dies beruht auf dem Gehalt an stark sauren, polyanionischen Proteoglykanen in den Granula.



Abbildung 2. Hautmastzelle *in situ* (x4.600)

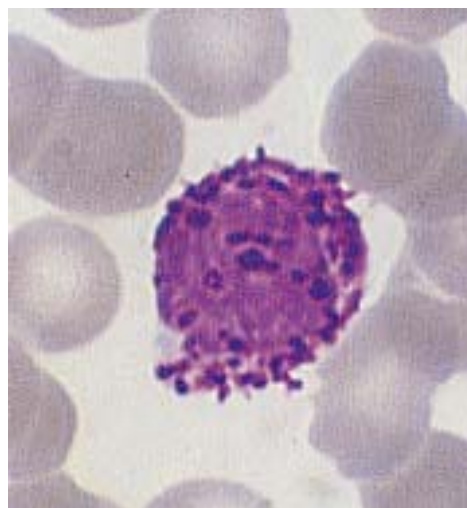


Abbildung 3. Basophiler Granulozyt

1.5.1.3 Mediatoren

Die Mediatoren der Mastzellen und der basophilen Leukozyten lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: man unterscheidet sog. präformierte, d.h. in aktiver Form intragranulär gespeicherte und neugenerierte, d.h. nach Zellaktivierung *de novo* synthetisierte Mediatoren. Der sicherlich bekannteste präformierte Mediator ist das Histamin. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Mediatoren dargestellt.

Tabelle 1. Mediatoren in Mastzellen und basophilen Leukozyten*

<u>Substanzklasse</u>	<u>Mastzellen</u>	<u>Basophile</u>
Biogene Amine	Histamin	Histamin
Proteoglykane	Heparin Chondroitinsulfat E	Chondroitinsulfat A
Proteasen	Tryptase Chymase Carboxypeptidase	in sehr geringer Konzentration
Lipidmediatoren	Prostaglandin D ₂ Leukotrien C ₄ , D ₄ , E ₄	Leukotrien C ₄ , D ₄ , E ₄
Zytokine	TNF-alpha IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 IL-8, IL-10, IL-13, IL-16	TNF-alpha IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13

* Auswahl

Histamin

Im menschlichen Organismus ist Histamin (β -Imidazolethylamin) das einzige biogene Amin in den Granula von Mastzellen und Basophilen [Cavanah und Casale, 1993]. Der Histamingehalt in menschlichen Basophilen beträgt 1-3 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen, in menschlichen Mastzellen ist er 5 bis 10 mal höher. Serotonin als biogenes Amin findet sich nur in Nagermastzellen.

Die Synthese des Histamins erfolgt direkt in Mastzellen aus Histidin mit Hilfe der Histidindecarboxylase und wird als präformierter Mediator bei saurem pH-Wert in den Granula „gelagert“. Unter diesen Bedingungen ist das kationische Histamin an negativ

geladene Carboxyl- oder Sulfatgruppen der Proteoglykan-Protein-Matrix gebunden. Bei der Degranulation nach Zellaktivierung wird Histamin freigesetzt, indem es durch Kationenaustausch mit extrazellulärem Natrium bei neutralem pH-Wert von dem Proteoglykanmolekül dissoziiert. Extrazelluläres Histamin wird innerhalb von Minuten nach Freisetzung durch die N-Methyltransferase und die Diaminoxidase (Histaminase) zu N-Methylhistamin bzw. Imidazolessigsäure metabolisiert (Abbildung 4). Es wirkt primär lokal, hat jedoch bei Aktivierung durch große Antigenmengen bzw. im Zustand einer hochgradigen Sensibilisierung auch systemische Wirkungen.

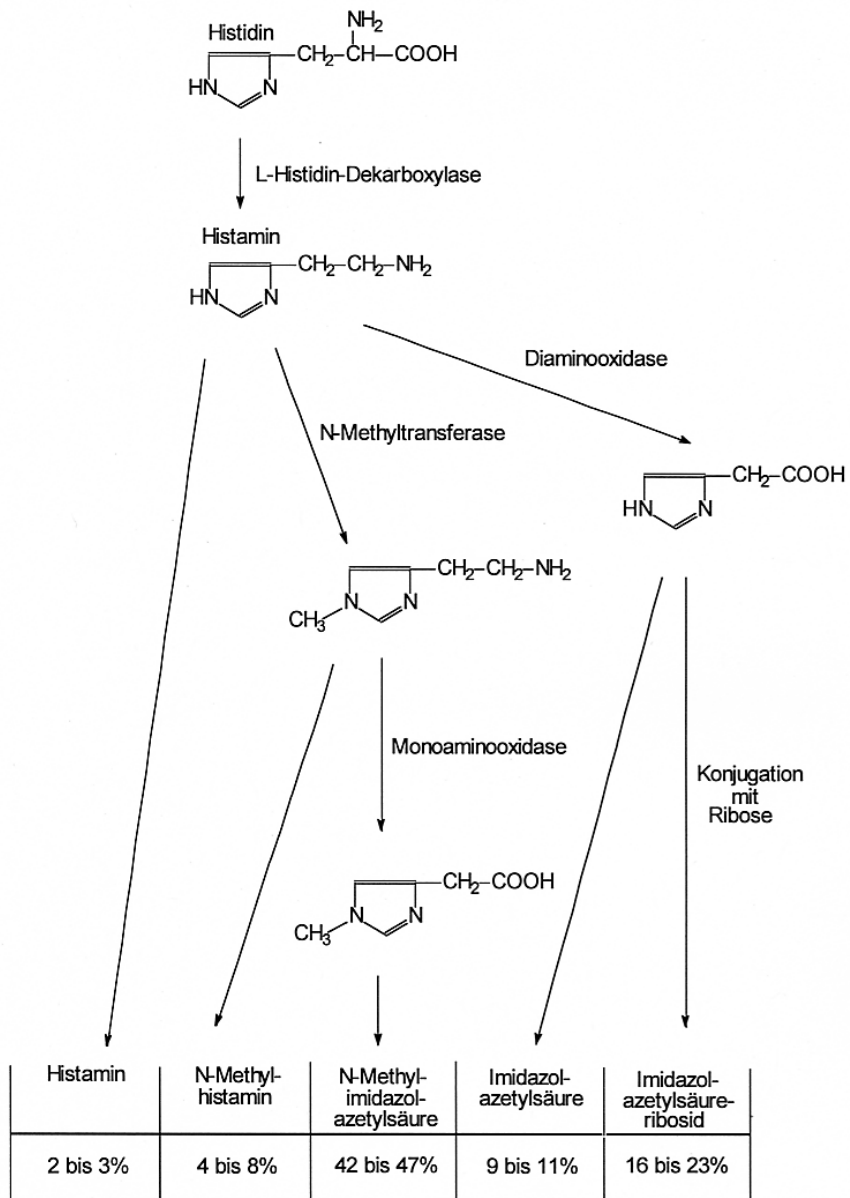


Abbildung 4. Schematische Darstellung des Histaminstoffwechsels

Proteoglykane

Die metachromatischen Färbereigenschaften von Mastzellen beruhen auf Bindung basischer Farbstoffe an negativ geladene Proteoglykanmoleküle in den Granula. Prinzipiell unterscheidet man dabei Heparin und Chondroitinsulfat. In Mastzellen findet sich Heparin und Chondroitinsulfat E, in Basophilen Chondroitinsulfat A. Proteoglykane enthalten einen proteinreichen Kern mit sich wiederholenden Serin-Glycin-Sequenzen, an die Glycosaminoglycan-Seitenketten gebunden sind, welche aus sulfatierten Disacchariden aufgebaut sind [Schwartz und Huff, 1993]. Die Bedeutung dieser Moleküle ist noch nicht geklärt, es wird eine Regulation des pH-Wertes sowie eine Stabilisierung von Proteasen und Histamin vermutet. Biologische Wirkungen von Heparin, wie Förderung der Angiogenese, Antikoagulation oder Stimulation der Migration von Endothelzellen machen eine Wirkung auf das Gerinnungssystem wahrscheinlich.

Neutrale Proteasen

Neutrale Proteasen sind Enzyme, die bei neutralem pH-Wert Peptidbindungen spalten. Diese Enzyme machen den Hauptproteinanteil in den Granula menschlicher Mastzellen aus. Tryptase ist eine Endopeptidase und mastzellspezifisch. Das Enzym wird bei der Degranulation parallel zum Histamin freigesetzt. Chymase ist in den Granula an Heparin oder Chondroitinsulfat gebunden. Carboxypeptidase ist wie Chymase nur in menschlichen Mastzellen zu finden. Die genaue Funktion dieser präformierten Proteasen ist noch nicht bekannt. Es wird eine Bedeutung in der (Patho-)Physiologie der Mastzelle vermutet [Amon und Wolf, 1994].

Arachidonsäuremetabolite

Arachidonsäure wird nach Zellaktivierung aus Membranphospholipiden mittels Phospholipase A₂, Phospholipase C und Diacylglycerollipase freigesetzt. Arachidonsäure wird dann entweder über den

Zyklooxygenaseweg in Prostaglandine und Thromboxane oder über den Lipoxygenaseweg in Leukotriene, auch Eicosanoide genannt, verstoffwechselt [Schwartz und Austen, 1988] (Abb. 5).

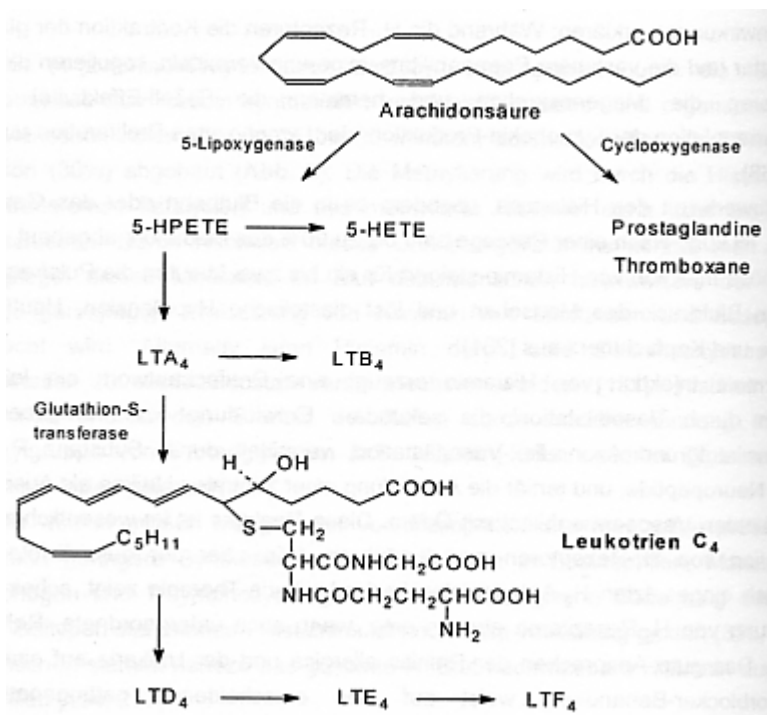


Abbildung 5. Schematische Darstellung des Arachidonsäurestoffwechsels

Zyklooxygenaseprodukte

Die Zyklooxygenase ist ein Hämprotein, das über relativ instabile Zwischenprodukte (PGG₂ und PGH₂) die Bildung von PGH₂, PGD₂ und TXA₂ katalysiert. Deren Abbauprodukte spielen für die Mastzellbiologie nur eine untergeordnete Rolle. Hautmastzellen bilden fast ausschließlich PGD₂, während Basophile nur LTC₄ synthetisieren. Die biologischen Effekte von PGD₂ sind Vasodilatation, Bronchokonstriktion und Verstärkung der histamininduzierten Gefäßpermeabilität [Siraganian, 1993].

Lipoxygenaseprodukte

Lipoxygenasen sind eine Gruppe eisenhaltiger Dioxygenasen. Bei der Metabolisierung der Arachidonsäure über die 5-

Lipoxygenase kommt es über ein Zwischenprodukt zur Bildung des LTA₄. Zellen, welche eine Epoxidhydrolase besitzen, können aus LTA₄ dann LTB₄ bilden. Dies ist eine chemotaktische Substanz für Neutrophile und Eosinophile, wird aber von Mastzellen nur in geringem Maße gebildet. In relevanten Mengen wird LTC₄, LTD₄ und LTE₄ in Hautmastzellen und Basophilen gebildet. Die biologischen Wirkungen sind mit denen des Histamins vergleichbar [Schwartz und Huff, 1993].

Zytokine und Chemokine

Nach Antigenbindung wurden in Nagermastzellen und humanen Mastzellen unter anderem eine verstärkte m-RNA Expression bzw. eine Freisetzung für folgende Zytokine und Chemokine demonstriert: IL-1, -3, -4, -5, -6, -8, -10, -12, -13, -16, GM-CSF, TNF- α , *monocyte chemotactic protein-1*, -5, *vascular endothelial growth factor* und zahlreiche andere Faktoren [Wedemeyer und Galli, 2000; Henz et al., 2001]. Bei humanen Basophilen wurde die Freisetzung von IL-4 und IL-13 nachgewiesen [Gibbs und Amon, 1995].

Zytokine dienen der Modulation entzündlicher Vorgänge, der Regulation der IgE-Synthese und zahlreicher anderer zentraler immunologischer Funktionen, der Hämatopoese, der Angiogenese und der Wachstumsregulation zahlreicher Zellen. Die Produktion der Zytokine zeigt eine andere Kinetik (Stunden) als die Freisetzung von präformierten Mediatoren (Sekunden bis wenige Minuten) bzw. die Bildung von Arachidonsäuremetaboliten (Minuten), so dass man von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen ausgehen kann [Gibbs und Amon, 1995].

1.5.1.4 Rezeptoren

Basophile und Mastzellen exprimieren eine Vielzahl von Rezeptoren und Oberflächenstrukturen (Tabelle 2).

Tabelle 2. Rezeptoren und Oberflächenstrukturen von Mastzellen und basophilen Leukozyten *

Struktur	Klassifikation	Basophile	Mastzellen
IgE-Rezeptor	Fc ϵ RI	+	+
Fc ϵ RII	CD32w	+	—
<u>Zytokinrezeptoren</u>			
IL-1R II	CD121b	+	?
IL-2 R-alpha	CD25	+	—
IL-3 R	CD123	+	—
IL-4 R	CD124	+	—
IL-5 R	CD125	+	—
IL-8 R	CD128	+	—
IFN- α -Rezeptor	CD118	+	—
IFN- γ -Rezeptor	CD119	+	—
<u>Adhäsionsrezeptoren</u>			
CD40-Ligand	CD40L	+	?
Leukosialin	CD43	+	+
<u>Komplementrezeptoren</u>			
CR1	CD35	+	—
C5a	CD88	+	+
C3a+b		+	+
<u>Sonstige Rezeptoren</u>			
NGF-Rezeptor	CD40	+	—
c-kit-Rezeptor	CD117	+	+
Leukozytenantigen	CD45	+	+
Histamin H ₂ -Rezeptor		+	—
FMLP-Rezeptor		+	+

* Auswahl; Abkürzungen: CD: *Cluster of differentiation*; IFN: Interferon; NGF: *Nerve growth factor*; FMLP: Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin

Wie erwähnt, zeichnen sich Mastzellen und Basophile durch die Expression des hochaffinen IgE-Rezeptors (Fc ϵ RI) an der Zelloberfläche aus, über den die IgE-vermittelte Mediatorokaskade in Gang gesetzt wird. Der Vorgang von der Fc ϵ RI-vermittelten Stimulation bis zur Freisetzung der Mediatoren benötigt Minuten bis einige Stunden und ist

konzentrationsabhängig bezüglich des Antigens. Experimentell werden meist anti-IgE-Antikörper verwendet.

Auf der Zelloberfläche von Basophilen hat man zwischen 10^4 und 10^6 Fc_ϵ -Rezeptoren und etwa ebenso viele IgE-Moleküle nachgewiesen. Basophile von Menschen mit hohem Serum-IgE-Spiegel – zu denen die meisten Betroffenen mit Rhinitis allergica, Asthma bronchiale oder atopischer Dermatitis gezählt werden – exprimieren vermehrt Rezeptoren und haben vermehrt IgE gebunden [Siraganian, 1993].

Auf Makrophagen, Monozyten, Thrombozyten, B- und T-Lymphozyten und eosinophilen Leukozyten wurde auch ein niedrigaffiner IgE-Rezeptor nachgewiesen (Fc_ϵ RII, CD23), der völlig andere biochemische Effekte auslöst und deshalb nicht näher besprochen werden soll.

1.5.2 Eosinophile Leukozyten

1.5.2.1 Historischer Hintergrund

Im Jahr 1879 beschrieb Paul Ehrlich neben den basophilen Leukozyten erstmals auch die eosinophilen Leukozyten, die sich im Gegensatz zu den Basophilen mit dem sauren Anilinfarbstoff Eosin selektiv anfärben ließen [Ehrlich, 1879].

Frühzeitig wurde dem eosinophilen Granulozyten eine Rolle in der Abwehr parasitärer Erkrankungen zugesprochen [Bruijnzeel et al., 1992]. Nachdem lange unbekannt war, dass Eosinophile neben gewebeschützenden auch gewebezerstörende Eigenschaften aufweisen, wurde in den letzten Jahren deutlich, dass dieser Zelltyp durch die Freisetzung unterschiedlicher Mediatoren ein wichtiger Bestandteil physiologischer und pathophysiologischer Prozesse des Immunsystems ist. So findet man beispielsweise eine erhöhte Zahl an Eosinophilen und deren Produkte wie ECP (*Eosinophil cationic protein*) und MBP (*Major basic protein*) im Blut von Patienten mit atopischer Dermatitis [Leifermann, 1991, Halmerbauer et al., 1997]. Auch bei allergischem Asthma bronchiale dominieren Eosinophile im Blut, in der bronchoalveolären Lavage und im Sputum [Pizzichini et

al., 1997, Grootendorst et al., 1997]. Der Nachweis von ECP und MBP in der Bronchialmukosa macht deutlich, dass die Eosinophilen in aktiviertem und degranuliertem Zustand vorliegen [Sanderson, 1992].

1.5.2.2 Ontogenese und Vorkommen

Wie andere Leukozyten, stammen auch Eosinophile von pluripotenten, CD34+ hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab, und differenzieren unter dem Einfluss von Zytokinen (z.B. IL-3 und IL-5) zu reifen Blutzellen.

Insgesamt stellen die Eosinophilen mit 0,5-5 % aller peripheren, weißen Blutzellen einen relativ kleinen Anteil dar. Nach einer durchschnittlichen Aufenthaltsdauer in der Zirkulation von 24-26 Stunden emigrieren die Zellen ins perivaskuläre Bindegewebe, um dort nach etwa 14 Tagen abgebaut zu werden [Weller, 1994]. Unter physiologischen Bedingungen ist der Eosinophile in Speichel und Bronchialflüssigkeit nicht nachweisbar, er kann jedoch bei Allergikern bevorzugt zwischen Oberflächenepithelzellen von Haut, Nasenschleimhaut, Lunge und Magen-Darm-Trakt akkumulieren [Bruijnzeel et al., 1992].

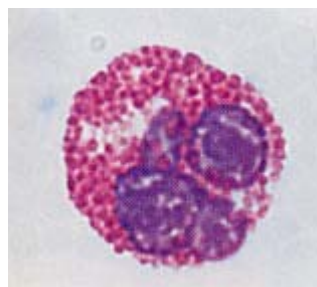


Abbildung 6. Eosinophiler Granulozyt

1.5.2.3 Morphologie und Färbeverhalten

Eosinophile sind runde bis ovoide Zellen mit einem Durchmesser von 12-15 μm und einem zweigelappten Kern. Die Granula lassen sich in drei Typen unterscheiden, die kleinen Granula, die Enzyme wie Arylsulfatase und saure Phosphatase enthalten, primäre und sekundäre Granula, die sich aus den primären

entwickeln. Sie enthalten die basischen Proteine, die für die charakteristische Rotfärbung mit Eosin verantwortlich sind.

Die Effektormechanismen der eosinophilen Leukozyten lassen sich in oxidative und nichtoxidative unterteilen. Die oxidativen Mechanismen umfassen die Bildung toxischer Sauerstoffradikale, mit oder ohne Anwesenheit einer eosinophilen Peroxidase, zu den nichtoxidativen werden Proteine, Enzyme und Zytokine gezählt, die sauerstoffunabhängig produziert werden [Gleich et al., 1993].

Mit Hilfe dieser Mechanismen entfaltet der Eosinophile seine Zytotoxizität gegenüber körpereigenem Gewebe oder seine Abwehrfunktion gegenüber Parasiten.

Tabelle 3. Mediatoren der eosinophilen Leukozyten *

Substanzklasse	
Nichtenzymatische granuläre Proteine	<i>Major basic protein</i> <i>Eosinophil cationic protein</i> <i>Eosinophil protein X</i>
Enzymatische granuläre Proteine	eosinophile Peroxidase Kollagenase Arylsulfatase B β-Glukoronidase
Sauerstoffspezies	H ₂ O ₂ , -O ₂ , -OH-
Lipidmediatoren	<i>Platelet activating factor</i> LTC ₄ , LTB ₄ PGE ₁ , PGE ₂ TXA ₂ , TXB ₂
Zytokine	IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-16, GM-CSF <i>Vascular endothelial growth factor</i> <i>Transforming grows factor</i> <i>Tumor necrosis factor-α</i>

* Auswahl; Abkürzungen: LT: Leukotrien, IL: Interleukin, PG: Prostaglandin, TX: Thromboxan, GM-CSF: *Granulocyte/macrophage colony stimulating factor*

1.5.2.4 Mediatoren

Eosinophil cationic protein

Eosinophil cationic protein (ECP) ist ein granuläres nichtenzymatisches stark basisches Protein mit einem isoelektrischen Punkt um 11. Es liegt in einer Konzentration von etwa $5 \mu\text{g}/10^6$ Zellen vor und hat ein mittleres Molekulargewicht von 21 kDa.

Eine antikoagulative und antifibrinolytische Aktivität konnte nachgewiesen werden [Venge et al., 1979].

ECP ist helminthotoxisch und kann bei Konzentrationen um 10^{-7} mol/l Schistosomen *in vitro* abtöten. Die Lymphozytenproliferation wird durch ECP dosisabhängig gehemmt. Des Weiteren wird dem Protein eine neurotoxische Aktivität zugesprochen [Fredens et al., 1982]. Im Blutserum Gesunder findet sich ein normaler ECP-Spiegel von $4,5 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{l}$ [Kim et al., 1997]. Erhöhte Werte können bei allergischem Asthma bronchiale und atopischer Dermatitis gemessen werden [Amon et al., 2000].

Allerdings geht ein erhöhter Serumspiegel nicht mit einer Bluteosinophilie einher, sondern stellt wahrscheinlich den Grad der Zellaktivierung dar [Shi et al., 1997].

Major basic protein

Major basic protein (MBP) ist ebenso wie ECP ein nichtenzymatisches granuläres Protein, das mit 50 % den Hauptanteil der granulären Proteine ausmacht. Eosinophile enthalten etwa $9 \mu\text{g}/10^6$ Zellen.

MBP ist toxisch für Parasiten, eine Erhitzung auf $56 \text{ }^\circ\text{C}$ hebt diese Eigenschaft auf [Gleich und Adolphson, 1986]. Das Protein besitzt eine ausgeprägte Zytotoxizität. So konnte gezeigt werden, dass Darm-, Milz-, Hautzellen, periphere Blutzellen, Bronchialepithelzellen und Trachealzilien *in vitro* geschädigt werden [Gleich et al., 1979]. Der Mechanismus, der dieser zellunspezifischen Aggressivität des Proteins zugrunde liegt, besteht in einer Interaktion mit der Lipiddoppelschicht der

Zielzellen. Einzelne Membranliposomen werden zerstört, aggregiert und lysiert [Butterfield et al., 1990].

Eosinophil derived neurotoxin / Eosinophil protein X

Eosinophil derived neurotoxin (EDN) kommt in Eosinophilen in einer Konzentration von etwa $3 \mu\text{g}/10^6$ Zellen vor und gehört auch zu den nichtenzymatischen granulären Proteinen. Im Vordergrund steht die neurotoxische Aktivität, wie auch der Name deutlich macht. Es kann myelinisierte Neurone zerstören.

Eosinophil protein X (EPX) wurde etwas später entdeckt und seine Eigenschaften sind mit denen des EDN zu vergleichen. Es wird davon ausgegangen, dass beide Proteine identisch sind (Peterson und Venge, 1983).

Eosinophile Peroxidase

Die *Eosinophile Peroxidase* (EPO) ist ein granuläres enzymatisches Protein.

Die Enzymsynthese in Eosinophilen ist zeitlich und räumlich von der Freisetzung getrennt. Sie findet im Stadium des Progranulozyten und Myelozyten im endoplasmatischen Reticulum und im Golgi-Apparat statt.

Als Peroxidase katalysiert EPO in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und einem Halogen die Bildung verschiedener aggressiver Substrate (Cl_2 , OCl_2 .)

Eosinophile enthalten EPO in einer Größenordnung von $12-15 \mu\text{g}/10^6$ Zellen.

Lipidmediatoren

In den Eosinophilen findet man, ebenso wie in Basophilen und in Mastzellen, Lipidmediatoren, die auch hier erst nach Aktivierung der Zelle de novo synthetisiert werden. Dies sind in erster Linie LTC_4 , TXA_2 , PAF und die Prostaglandine PGE_2 , D_2 und F_2 .

Sauerstoffradikale

Eosinophile reagieren auf unterschiedliche Zellaktivatoren mit einer fulminanten Erhöhung des Sauerstoffmetabolismus [Roth et al., 1992, Kapp et al., 1994].

Dieser als *Respiratory burst* bezeichnete Vorgang basiert auf der Aktivierung einer membranständigen NADPH-Oxidase, wobei Sauerstoffmetabolite wie Superoxidanionen (O_2^-), Hydroxylradikale ($\cdot OH$) oder Wasserstoffperoxid entstehen (Woschnagg et al., 1996). Organische Moleküle, Mikroorganismen oder auch Säugerzellen können durch die oxidative Wirkung dieser Metabolite zerstört werden.

Zytokine

Als weitere Mediatoren produzieren Eosinophile auch eine große Anzahl an Zytokinen wie IL-1 bis IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und IL-16 [Grewe et al., 1998]. Weiter gelang der Nachweis von *Vascular endothelial growth factor* und anderer Zytokine [Moqbel et al., 1994, Horiuchi und Weller, 1997, Rossi et al., 1998].

1.5.2.5 Rezeptoren

Wie Mastzellen und basophile Leukozyten exprimieren auch Eosinophile auf ihrer Zelloberfläche eine Vielzahl von Rezeptoren und Oberflächenproteinen, die in Tabelle 4 zusammengefasst dargestellt sind.

1.6 Histaminrezeptoren

Im Rahmen der Therapie allergischer Erkrankungen spielt der Einsatz von Histaminrezeptorantagonisten (HRA) eine entscheidende Rolle. Denn die biologischen Effekte des Histamins werden über verschiedene Rezeptoren vermittelt. Man unterscheidet Histamin- H_1 -, H_2 -, H_3 - sowie intrazelluläre Histaminrezeptoren, ein weiterer wurde kürzlich auf mononukleären Zellen und Eosinophilen identifiziert, der H_4 -Rezeptor [Church, 2001].

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die wichtigsten Rezeptortypen und die biologischen Wirkungen des Histamins.

Der für allergische Reaktionen vom Soforttyp so bedeutsame H_1 -Rezeptor wurde im Gehirn, im kardiovaskulären System, im Magen-Darm-, im Urogenital- und im Respirationstrakt und der Haut nachgewiesen.

Tabelle 4. Rezeptoren und Oberflächenantigene eosinophiler Leukozyten *

Rezeptoren	Klassifikation
Komplementrezeptor 1	
Komplementrezeptor 3	
C3a und C5a-Rezeptor	CD88
<i>Leucozyte function associated antigen 1</i>	CD11a
Mac-1/C3bi-Rezeptor	CD11b
Niedrig affiner Fc _ε RII	CD23
Hoch-affiner Fc _ε RI (?)	
εBP (Mac-2)	
IgG-Rezeptor Fc _γ RII	CD32
IgA-Rezeptor	CD89
CCR3 (Eotaxin-Rezeptor)	
RANTES/MIP-1 –Rezeptor	
CCR1, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR2	
IL-1-Rezeptor	CD121a
IL-2-Rezeptor	CD25
IL-3-Rezeptor	CD123
IL-4-Rezeptor	CD124
IL-5-Rezeptor	CDw125
IL-16-Rezeptor	CD4
GM-CSF-Rezeptor	CD116
TNF-Rezeptor	CD120
PAF-Rezeptoren	
Interferon-α	CD118
Interferon-β	
Interferon-γ	CD119
LTB ₄ -Rezeptor	CD153
gp (Glycoprotein) 120 (CD30 Ligand)	CD153
gp 21-28	CD52
gp 28-32	CD69
<i>Fas-antigen/Apoptose-antigen</i>	CD95
<i>Leukocyte common antigen</i>	CD45
<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>	CD43
Glukokortikoidrezeptoren	
Aminopeptidase N-Rezeptor	CD13
Masernvirus-Rezeptor	CD46
Hyaluronsäurerezeptor	CD44

* Auswahl; Abkürzungen: PAF: *Platelet activating factor*, siehe Tab. 3

In der dritten der sieben transmembranen Domänen des Rezeptors wurde ein Aspartatrest gefunden, der wahrscheinlich für die Bindung der Aminogruppe des Histamins zuständig ist.

Der H₁-Rezeptor vermittelt seine Wirkungen über intrazellulären Anstieg der Kalziumkonzentration [Leurs und Timmermann, 1992]. Innerhalb von 30 Sekunden erreicht die zytosolische Kalziumkonzentration ihren Spitzenwert. Dieser vorübergehende Anstieg geht gewöhnlich in eine verlängerte Erhöhung der Kalziumkonzentration über.

Der H₂-Rezeptor kommt in denselben Geweben vor wie der H₁-Rezeptor [Parsons, 1991].

1.6.1 H₁-Rezeptorantagonisten (Antihistaminika)

Antihistaminika sind seit den vierziger Jahren bei Patienten mit allergischer Rhinitis, Urtikaria und anderen allergischen Erkrankungen in der klinischen Anwendung. In den vergangenen Jahren wurden durch die Entwicklung zunehmend selektiver Histamin H₁-Rezeptorantagonisten Fortschritte bei der Therapie allergischer Erkrankungen erzielt. Dies belegen zahlreiche klinische Studien der letzten Jahre [Day et al., 1997, Thomas et al. 1999, Mason et al., 1999].

Die chemische Struktur der Antihistaminika hat ebenfalls wie Histamin eine Ethylaminseitenkette mit variierenden Substituenten. Die Erhaltung des Moleküllerns des Histamins ermöglicht eine kompetitive Wechselwirkung am Histaminrezeptor [Reider et al., 1998a, Reider et al., 1998b].

Die Substanzen der ersten Generation zeichnen sich wegen hoher Lipophilie bei gleichzeitig geringer Rezeptorselektivität durch zahlreiche Nebenwirkungen aus, da sie die Blut-Hirn-Schranke passieren können und es zu Interaktionen mit den zentralen Histaminrezeptoren kommt [Slater et al., 1999].

Insbesondere Sedierung und anticholinerge Effekte, wie Mundtrockenheit, Harnverhalt oder Zittern schränken bis heute die Alltagstauglichkeit dieser Präparate sehr ein und

veranlassten die pharmazeutische Industrie zur Entwicklung einer neuen Substanzgeneration.

Tabelle 5. Ausgewählte Rezeptortypen und biologische Effekte des Histamins.

H ₁ -Rezeptor	H ₂ -Rezeptor	H ₁ -Rezeptor + H ₂ -Rezeptor	H ₃ - Rezeptor
Tonus der glatten Muskulatur von Bronchien und Darm ↑ Gefäßpermeabilität ↑ cGMP-Spiegel ↑	Magensäuresekretion ↑ Pepsinsekretion ↑ Epithelpermeabilität der Bronchien ↑ Lymphozytäre Zytotoxi- zität ↑ Neutrophilensekretion ↓ Basophilensekretion ↓ cAMP-Spiegel ↑ positive Inotropie Arrhythmie B-Zell Differenzierung ↓ Antikörpersekretion von Plasmazellen ↓	Chemokinese von Eosinophilen und Neutrophilen ↑ <i>triple response</i> ^a Vasodilatation ^b arterielle Hypotonie Kopfschmerzen Flushphänomene Tachykardie positive Chronotropie	Histaminsynthese in präsynaptischen Nervenzellen ↓ Bronchokonstriktion durch Neuropeptide und Cholinergika ↓ Aktivierung von Lungenmastzellen ↓ Ileumkontraktion und Magensäure- sekretion (Meerschwein- chen) ↓

^a unter einer *triple response* (sog. Lewis-Trias) versteht man die Hautreaktion nach intrakutaner Histamininjektion: lokalisiertes Erythem durch Vasodilatation der Arteriolen, Bildung einer Quaddel durch erhöhte vaskuläre Permeabilität der Venolen mit umgebendem Reflexerythem durch Axonreflex-induzierte Vasodilatation; ^b an Gefäßen mit einem Durchmesser > 80 µm wirkt Histamin vasokonstriktorisch

In Tabelle 6 sind einige Vertreter der 2. Generation aufgeführt.

Tabelle 6. Antihistaminika der 2. Generation

Freiname	Handelsname	Zulassung	Abbau
Azelastin	Allergodil [®]	SRA, PRA	CYP ₄₅₀
Ceririzin	Alerid [®] , Zyrtec [®]	SRA, PRA, U, AD	Niere
Lorantadin	Generika	SRA, PRA, U, AD	CYP ₄₅₀
Mizolastin	Mizollen [®] , Zolim [®]	SRA, PRA, U	CYP ₄₅₀
Terfenadin	Generika	SRA, PRA, U, AD	CYP ₄₅₀

Abkürzungen: SRA: saisonale Rhinitis allergica; PRA: perenniale Rhinitis allergica; U: Urticaria; AD: atopische Dermatitis; CYP₄₅₀: Cytochrom P 450 der Leber

Die Erstzulassung des Vertreters der zweiten Generation erfolgte 1982 mit Terfenadin (z.B. Teldane[®]). Diese Substanzen zeigten jedoch Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, insbesondere mit denjenigen, die um das Cytochrom P450 (Isotyp IIIA4), ein Hauptenzym des Abbaus in der Leber, konkurrieren [Simons und Simons, 1999].

Seit 1998 steht mit Fexofenadin (Telfast[®]) das erste Präparat der dritten Generation zur Verfügung, welches diese entsprechenden Nebenwirkungen nicht aufweist [Markham und Wagstaff, 1998, Amon und Zöllinger, 2001]. Diese Substanz wurde aus einem Antihistaminikum der zweiten Generation entwickelt. Seit Februar 2001 sind weitere Vertreter der 3. Generation in Deutschland zugelassen, die in Tabelle 7 aufgeführt sind.

Tabelle 7. Antihistaminika der 3. Generation

Freiname	Handelsname	Zulassung	Abbau
Fexofenadin	Telfast [®] 120, 180	SRA, U	biliär
Levoceterizin	Xusal [®]	SAR, U, PRA	Niere
Des-carboethoxyl- loratadin	Aerius [®]	SRA, U, PRA	CYP ₄₅₀

Abkürzungen: siehe Tabelle 6

Antihistaminika binden an den H₁-Rezeptor und verhindern dadurch, dass Histamin an den Rezeptor bindet und seine Wirkung ausüben kann. Das aus Mastzellen und basophilen Leukozyten freigesetzte Histamin verursacht aufgrund seiner Interaktion mit dem H₁-Rezeptor viele der klinischen Symptome, wie Niesreiz, Juckreiz und Rhinorrhoe. Fexofenadin ist ein hochspezifischer wirkstarker Inhibitor der H₁-Rezeptoren [Paul et al., 1998]. Viele der nichtsedierenden Antihistaminika werden bei ihrer Aufnahme in aktive und nichtaktive Metabolite umgewandelt. Im Gegensatz dazu ist Fexofenadin ohne vorherige Biotransformation voll wirksam.

Neben dieser antagonistischen Wirksamkeit besitzen einige Antihistaminika partiell auch eine inhibierende Wirkung auf die Mediatorfreisetzung aus allergischen Effektorzellen, deren Wirkungsmechanismus aber bislang nicht aufgeklärt ist [DE Vos, 1999, Abdelaziz et al., 2000, Baroody und Naclerio, 2000]. Substanzen der zweiten und dritten Generation sind dabei partiell in der Lage, die Aktivität allergischer Effektorzellen zu supprimieren. Für Fexofenadin liegt bislang eine Arbeit zur anti-allergischen Zusatzwirkung vor, in der eine Hemmung der anti-IgE-induzierten Histaminausschüttung gezeigt werden konnte [Ramachers et al. 1996].

1.6.2 Fexofenadin

Fexofenadinhydrochlorid ist seit 1998 mit dem Namen Telfast[®] als orales Antihistaminikum in Deutschland zugelassen. Es ist ein direkter Metabolit aus der Vorgängersubstanz Terfenadin. Es handelt sich um eine substituierte Benzolessigsäure [Product Monography, 1998]. In Abbildung 7 ist die *In vivo*-Biotransformation von Terfenadin zu Fexofenadin dargestellt. Wenn Fexofenadin verabreicht wird, durchläuft es keine CytochromP450-abhängige Metabolisierung, sondern wird überwiegend unverändert ausgeschieden.

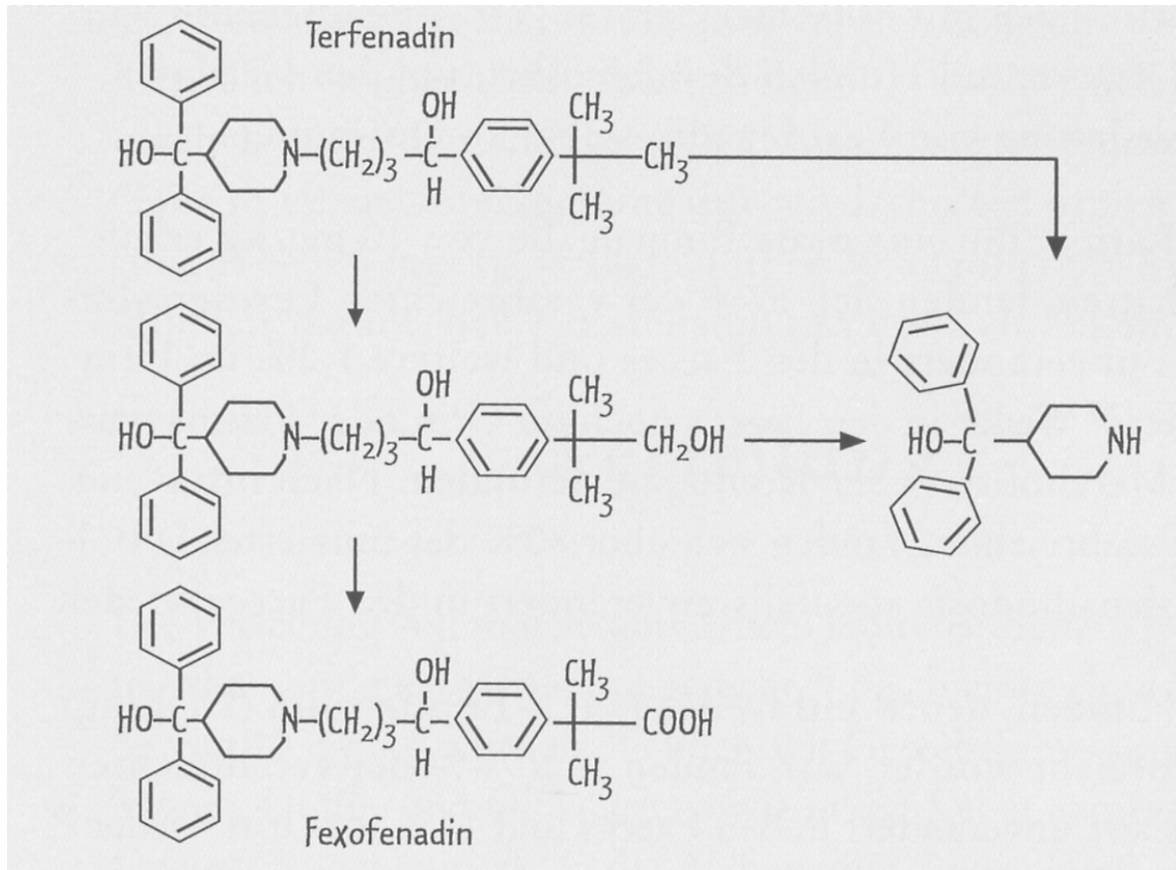


Abbildung 7. Schematische Darstellung der Biotransformation von Terfenadin zu Fexofenadin

Von der chemischen Struktur ist Fexofenadin: 4-[1-Hydroxy-4-(4-(hydroxydiphenylmethyl)-1-piperidiny)butyl]- α,α -dimethylelessigsäurehydrochlorid(\pm), $C_{32}H_{39}NO_4$ HCl.

Das Molekulargewicht beträgt 538,13.

Das Racemat besteht aus zwei pharmakologisch aktiven Isomeren. Das asymmetrische Kohlenstoffatom wird durch einen Stern gekennzeichnet (siehe Abbildung 7).

Verschiedene randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Studien bei Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis haben gezeigt, dass Fexofenadin hinsichtlich der Häufigkeit und des Schweregrades von Niesanfällen, Rhinorrhoe, Juckreiz von Nase oder Gaumen und den Symptom der verstopften Nase der Placebogabe signifikant überlegen waren [Casale et al., 1999, Howarth et al., 1999]. Die Behandlungsdosis beträgt 120 mg/Tag.

Bei Patienten mit chronischer Urtikaria konnte in einer ähnlichen Studie gezeigt werden, dass Fexofenadin in einer Dosierung von 180 mg bzw. 240 mg pro Tag einen signifikant positiven Einfluss auf den „Total symptom score“ (Anzahl der Quaddeln, Ausmaß des Juckreizes) hatten [Finn et al., 1999].

Verschiedene Untersuchungen konnten in den vergangenen Jahren für einige der neueren Antihistaminika antiallergische bzw. antientzündliche Wirkungen demonstrieren, die sich nicht durch die alleinige Blockade der H₁-Rezeptoren erklären ließen [Hofmann et al., 1999].

Diese antiallergischen Zusatzwirkungen besitzen möglicherweise eine große Tragweite, da bislang topische oder systemische Glukokortikosteroide zwar den therapeutischen „Goldstandard“ darstellen und diese jedoch für die Behandlung allergischer Erkrankungen wegen zahlreicher Langzeitnebenwirkungen Einschränkungen sowohl für den Arzt als auch den Patienten aufweisen.

Folgende Mechanismen sind bei der Untersuchung von antiallergischen Zusatzwirkungen von Antihistaminika von besonderem Interesse:

- Hemmung der Chemotaxis von Effektorzellen aus dem Blut in das Zielgebiet der Allergie
- Beeinflussung der Expression von Adhäsionsmolekülen
- Supprimierung der IgE-vermittelten Mediatorfreisetzung aus Mastzellen und Basophilen *in vitro*
- Inhibition der Mediatorfreisetzung aus verschiedenen Effektorzellen *in vivo*
- Supprimierung der Aktivität anderer Zellen allergischer Krankheitsbilder (z.B. eosinophile Leukozyten).

Da Antihistaminika der 2. und 3. Generation klinisch im allgemeinen sehr gut verträglich sind, ist eine zusätzliche Charakterisierung dieser Substanzklasse als „Antiallergika“, deren Wirkung nicht allein auf den Mediator Histamin beschränkt bleibt, sehr wünschenswert.

2. Fragestellungen und Ziele

Mastzellen, basophile und eosinophile Leukozyten produzieren und sezernieren verschiedene (pro)inflammatorische Mediatoren, wie Histamin, Arachidonsäuremetabolite oder ECP. Sie sind in unterschiedliche immunologische Prozesse des Organismus involviert. Für die im Zusammenhang mit diesen Mediatoren auftretenden häufigen Krankheitsbildern, wie Rhinitis allergica oder Urtikaria spielt die pharmakologische Therapie eine zentrale Rolle.

Für die Histaminrezeptorblockade wird Fexofenadin bei diesen Krankheitsbildern eingesetzt. Zusätzlich hat man eine antiallergische Wirkung von Fexofenadin an isolierten humanen Zellen nachweisen können. Diese Wirkungen werden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

Dabei werden im ersten Schritt folgende Aspekte studiert:

- Welche antiallergischen Wirkungen hat Fexofenadin an basophilen und eosinophilen Leukozyten unabhängig vom Histamin H₁-Rezeptor?
- Lässt sich die Freisetzung von allergologisch bedeutsamen Mediatoren, wie Histamin, LTC₄, ECP und Zytokinen dosisabhängig *in vitro* durch Fexofenadin supprimieren?
- Wie sieht die Kinetik dieser Suppression aus?
- Ist eine Hemmung der Mediatorfreisetzung durch Fexofenadin reversibel?

Die genauen Wirkungsmechanismen der H₁-Rezeptor-unabhängigen „antiallergischen“ Wirkungen von Antihistaminika sind bis heute nicht geklärt. Daher sollen im zweiten Schritt folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche Mechanismen liegen diesen Zusatzwirkungen zugrunde?
- Hat Fexofenadin einen Einfluss auf die Elemente der Signaltransduktion in pathophysiologisch bedeutsamen Zellen allergischer Erkrankungen (z.B. Proteinkinasen)?

Im letzten Schritt soll – je nach Ausgang der *In vitro*-Untersuchungen – anhand von *Ex vivo-in vitro*-Experimenten die antiallergische Zusatzwirkung von Fexofenadin verifiziert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Puffer und Lösungsmittel

HEPES-Puffer

137 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Nr. 1.06404)

5,6 mM D-Glucose (Merck, Nr. 1.08337)

10 mM HEPES (Sigma, Deisenhofen, Nr. H3375)

2,7 mM KCl (Merck, Nr. 1.04936)

0,4 mM NaH₂PO₄·xH₂O (Merck, Nr. 1.06346)

0,5 mM MgCl₂·x6H₂O (Merck, Nr. 1.05833)

1,8 mM CaCl₂·x2H₂O (Merck, Nr. 1.02382)

Mit 1 M NaOH (Merck, Nr. 1.06498) wurde der pH-Wert von 7,35 bis 7,4 mit einem pH-Meter (Knick 765) eingestellt.

Lösungsmittel

Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Nr. 1.16743)

Ethanol abs. (Merck, Nr. 1.00986)

Wasser reinst (Merck, Nr. 1.16754)

Brij 35 (Merck, Nr. 1.01894)

Perchlorsäure 60 % (HClO₄, Merck, Nr. 1.00518)

Salzsäure 32 % (HCl, Merck, Nr. 1.00319)

Substanzen für den Histamin-Autoanalyser

HCl 37% p.a. zur Herstellung einer 0,2 M und 0,6 M Lösung, NaOH-Plätzchen p.a. zur Herstellung einer 1 M Lösung mit Zusatz von Brij 35, 1 ml/l und einer 10 %igen NaOH-Lösung

n-Heptan p.a. (Merck, Nr. 1.04365)

n-Butanol p.a. (Merck, Nr. 1.00988)

Methanol p.a. (Merck, Nr. 1.06008)

o-Phthaldialdehyd (OPT, p.a., Fluka, Neu Ulm) muss vor jedem Messvorgang frisch angesetzt werden. Dabei werden 60 mg OPT in 2 ml Methanol gelöst und mit 100 ml Aqua dest. verdünnt.

Standardlösungen von Histamindihydrochlorid (Sigma) werden in 0,1 M HCl angesetzt (5 bis 500 ng/ml) und bei 4 °C aufbewahrt.

Fexofenadin (Telfast®)

Fexofenadinhydrochlorid ist ein feines weißes kristallines Pulver, welches mäßig löslich ist in Wasser und leicht in Ethanol (maximale Löslichkeit 303 mg/ml Ethanol). Es ist bei einer Temperatur von <math><30\text{ °C}</math> mehr als 18 Monate stabil.

Für die Versuche wurde eine 10^{-4} M Stammlösung angesetzt, die mit warmen HEPES-Puffer weiter verdünnt wurde. Für die Stammlösung wurde eine entsprechende Menge Fexofenadin abgewogen und in wenig Ethanol ($< 1\text{ ml}</math>) gelöst und mit warmen ($37\text{ °C}</math>) HEPES-Puffer auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Für jeden Versuch wurde die Stammlösung frisch angesetzt. Kontrollen mit der äquivalenten Ethanolverdünnung hatten keinen Einfluss auf das Versuchsergebnis.$$

3.2 Immunologische und nichtimmunologische Liberatoren

Anti-IgE Antikörper

Lyophilisiertes polyklonales Antiserum, Ziege-anti-human, Proteinkonzentration 55,3 mg/ml, Titer 1:32 (Sigma, Nr. I 0632). Anti-human IgE wurde in 2 ml Aqua dest. gelöst und im Kühlschrank aufbewahrt. Für die Versuche wurde diese Stammlösung (100 %) mit HEPES-Puffer für die Versuchsansätze entsprechend auf 0,01, 0,005 und 0,001 % verdünnt.

Kalziumionophor A23187

10 mg Kalziumionophor A23187 (Sigma, Nr. C 7522) wurden in DMSO so gelöst, dass eine 10 mM Stammlösung entstand. Diese wurde portioniert und bei $-40\text{ °C}</math> tiefgefroren. Vor Gebrauch wurde die Stammlösung in entsprechender Weise mit warmen HEPES-Puffer verdünnt.$

3.3 Untersuchungen zum Zellpriming

Durch unterschiedliche Zytokine und Chemokine lässt sich die Mediatorfreisetzung von Mastzellen und Basophilen *in vitro* modulieren (Kaplan et al., 1995). Präinkubiert man basophile Leukozyten gesunder Spender mit den Zytokinen IL-3, IL-5 oder GM-CSF und stimuliert die Zellen anschließend über den IgE-

Rezeptor oder den extrazellulären Kalziumeinstrom, so lässt sich eine Potenzierung der Mediatorfreisetzung beobachten.

Interleukin 3

Es wurde eine Stammlösung aus 10 µg IL-3 (Sigma, Nr. I1646) mit HEPES-Puffer in einer Konzentration von 1 µg/ml mit 0,1 % Albumin (Human Serum Albumin, Sigma, Nr. A6784) hergestellt. Die Lösung wurde in 100 µl Portionen tiefgefroren und bei Gebrauch aufgetaut und mit HEPES-Puffer verdünnt. Die Stimuluskonzentration von anti-IgE wurde in diesen Versuchen in einem suboptimalen Bereich von 0,005 % der Stammlösung gewählt. Es wurde 10 min mit IL-3 in der im Versuch angegebenen Konzentration vorinkubiert und anschließend mit anti-IgE für 30 min stimuliert.

Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor

Die Konzentration der Stammlösung von GM-CSF (Sigma , Nr. G5035) betrug 10^{-9} mol/l mit 0,1 % Human Serum Albumin (Sigma, Nr. A6784). Auch diese wurde in 100 µl portioniert und bei -40 °C tiefgefroren und für den Versuch aufgetaut und in entsprechender Weise verdünnt.

Für die Kostimulation wurde mit GM-CSF für 5 min vorinkubiert, und nach anschließender Stimuluszugabe (A23187 in einer Konzentration von 10^{-7} mol/l) wurden die Zellen nochmals für 25 min im Schüttelwasserbad inkubiert.

3.4 Isolierung von menschlichen basophilen Leukozyten

Zur Isolierung der menschlichen basophilen Leukozyten wurde Blut von gesunden und atopischen Spendern oder von *Buffy coats* aus dem Blutspendezentrum Nürnberg verwendet.

3.4.1 Isolierung aus Vollblut

Über Punktion der Kubitalvene mit einer Butterflykanüle (Durchmesser 0,8 mm, Neofly, Viggo-Spectramed, Singapore) wurden jedem Spender ca. 80 bis 100 ml Blut entnommen. Etwa 30 ml Blut wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) auf 6 %iges Macrodex (Schiwa, Glandorf), das zuvor

mit einigen Tropfen Liquemin (Hoffman-La Roche, Grenzach-Wyhlen) versetzt wurde, getropft und anschließend mit 150 mg D-Glucose (Merk) versetzt. Das Gemisch wurde dann sanft schwenkend vermischt.

3.4.2 Isolierung aus *Buffy coats*

Als Ausgangsmaterial wurden *Buffy coats* verwendet. Darunter versteht man den leukozytenreichen Rückstand (ca. 50 ml) einer Blutspende von ca. 450 ml peripherem Vollblut nach Gewinnung des Erythrozyten- und gelegentlich auch des Thrombozytenkonzentrats.

Der Blutspendebeutel – vorbereitet durch das Blutspendezentrum Nürnberg – beinhaltet neben 450 ml Vollblut noch 63 ml *Anticoagulant Solution* (327 mg Citronensäuremonohydrat, 2,63 g Natriumcitratdihydrat, 251 mg Natriumdihydrogenphosphatdihydrat, 2,32 g wasserfreie Glucose in Aqua bidest. ad 100 ml, mit NaOH auf pH 5,63 justiert).

Ein *Buffy coat* wurde auf zwei Falconröhrchen verteilt und mit 10 ml MacroDEX versetzt (ebenfalls einige Tropfen Liquemin, aber keine Glucose).

3.4.3 Weiterverarbeitung des Leukozytenkonzentrats

Das Gemisch sedimentierte sowohl bei der Verwendung von Spenderblut als auch von *Buffy coats* 90 min bei Zimmertemperatur. Danach wurden die Überstände abpipettiert und in der Zentrifuge bei 1000 Umdrehungen/min (ca. 190 x g) bei Zimmertemperatur 7 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen mit zimmerwarmen HEPES-Puffer vorsichtig resuspendiert. Ein zweiter Waschschrift folgte unter gleichen Zentrifugationsbedingungen.

Unter diese Bedingungen befanden sich in der Zellsuspension neben 2 % bis 5 % basophilen auch eosinophile und neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, Lymphozyten und

wenige Erythrozyten. Die Zellzählung erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer [Beauvais et al., 1992].

3.4.4 Anreicherung basophiler Leukozyten

Eine Anreicherung der Basophilen wurde durchgeführt, um andere Zellen, wie z.B. eosinophile Leukozyten von der Zellsuspension abzutrennen. Für die Histaminbestimmung war keine Anreicherung nötig, da sich keine Unterschiede in den Versuchsergebnissen zwischen angereicherten und nicht angereicherten Basophilen zeigten.

Die Zellen wurden, wie unter 3.4.2 beschrieben, isoliert. Für die Anreicherung wurden nur *Buffy coats* verwendet, deren isolierte Zellen nach dem zweiten Waschschrift auf Ficoll-Paque (Dichte: 1,077 g/l, Pharmacia, Freiburg) geschichtet wurden und bei 1500 Umdrehungen/min, 18 °C, 25 min zentrifugiert wurden. Die Zentrifuge wurde dabei manuell von 0 auf 1500 Umdrehungen beschleunigt und ohne Bremse abgestoppt, um Vermischungen der Zellschichten zu verhindern.

An der Grenzschicht (*Interface*) zwischen HEPES-Puffer und Ficoll-Paque, befanden sich die Monozyten, Lymphozyten und basophile Granulozyten. Im *Pellet* reichert sich Erythrozyten und vorwiegend neutrophile und eosinophile Granulozyten an. Das *Interface* wurde mit einer automatischen Pipette abgesaugt, gesammelt und 3x mit HEPES-Puffer gewaschen.

Um die Zahl der T- und B-Lymphozyten zu vermindern, wurde eine Negativselektion mit magnetischen Kügelchen (Dynabeads CD2, Dynal, Hamburg, Art.-Nr. 111.02 und Dynabeads CD19, Art.-Nr. 111.04) durchgeführt. Die Antikörper an der Oberfläche dieser Kügelchen richten sich gegen T-Lymphozyten bzw. B-Lymphozyten. Je 200 µl der Lösung mit den beschichteten Kügelchen wurden mit der gewaschenen Zellsuspension (10 ml) für 10 min auf einer Drehscheibe (Turntable, Neolab, Heidelberg) inkubiert und anschließend mittels Magneten entfernt. Der

Reinheitsgrad der Basophilen verbesserte sich dadurch auf ca. 30 %.

3.5 Isolation menschlicher eosinophiler Leukozyten

Menschliche eosinophile Leukozyten wurden aus *Buffy coats* von gesunden Spendern isoliert (siehe 3.4.2). Die Endkonzentration an Eosinophilen betrug annähernd 10^5 Zellen/ml.

3.6 Isolierung von Leukozyten aus Blut von Patienten mit atopischer Dermatitis

Für die Isolierung von Leukozyten von Patienten mit atopischer Dermatitis wurden 40 ml Blut aus der Kubitalvene von freiwilligen Spendern mit einer Atopie (atopische Dermatitis) entnommen und mittels Dextransedimentation nach bekanntem Verfahren isoliert. Alle Patienten hatten ein Serum-IgE-Spiegel von mehr als 1000 kU/l, bei allen Patienten konnte zuvor ein spezifischer IgE-Wert entweder gegen Inhalationsallergene oder gegen Nahrungsmittel festgestellt werden.

3.7 Zellaktivierung

Das für die Versuchsansätze benötigte Zellsuspensionsvolumen wurde jeweils nach dem letzten Waschschrift mit HEPES-Puffer aufgefüllt (500 μ l/Probe). Die Zellsuspension wurde dann auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt und anschließend auf die Reagenzgläser nach dem unten aufgeführten Pipettierschema verteilt. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad. Im allgemeinen wurde die Reaktion nach 30 min auf Eiswasser abgestoppt.

In der auf 4 °C gekühlten Zentrifuge wurden die Zellen bei 2000 Umdrehungen/min für 7 min zentrifugiert. Überstände wurden mit einer Eppendorf-Pipette abgenommen und bei -40 °C bis zur Mediatormessung aufbewahrt. Auf die *Pellets* wurde 1 ml Aqua dest. pipettiert und auf dem Vortex gerüttelt bis das *Pellet*

vollständig lysiert war. Die Proben wurden ebenfalls bis zur Messung bei $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Pipettierschema (Beispiel):

Probennr.	Puffer (µl)	Substanz (µl)	Stimulus (µl)
1 Kontrolle	500	—	—
2 Kontrolle	500	—	—
3 10^{-9} M	Fexofenadin 400	100	—
4 10^{-8} M		100	—
5 10^{-7} M		100	—
6 10^{-6} M		100	—
7 10^{-5} M		100	—
8 0,01% anti IgE	400	100	100
9 0,01% anti IgE	400	100	100
10 10^{-9} M	Fexofenadin plus anti-IgE 300	100	100
11 10^{-8} M		100	100
12 10^{-7} M		100	100
13 10^{-6} M		100	100
14 10^{-5} M		100	100

Die Proben Nr. 1 und 2 dienten zur Kontrolle der spontanen, unstimulierten Mediatorfreisetzung und reflektieren die Qualität der Zellpräparationsarbeit, aber auch eine ggf. erhöhte Aktivierbarkeit der Zellen (z.B. bei Atopie). Die Proben Nr. 3 bis 7 dienten der Kontrolle der Zellaktivierung durch die Substanz Fexofenadin allein, um eine eventuelle Freisetzung oder Schädigung zu erfassen. Die Proben Nr. 8 und 9 waren zur Kontrolle der maximal möglichen Mediatorfreisetzung durch den Stimulus vorgesehen, auf die schließlich die Versuchsergebnisse bezogen wurden, um eine mögliche Hemmung oder Potenzierung der Mediatorfreisetzung durch Fexofenadin (Proben 10 bis 14) errechnen zu können.

3.8 Experimente zur Signaltransduktion

3.8.1 Proteinkinase C

Für die Untersuchungen der für den Signaltransduktionsprozess von Basophilen zentral bedeutsamen Proteinkinase C (PKC) wurden aus Hamsterhirn und Rinderhirn nach einer Methode von Hofer und Mitarbeitern [Hofer et al., 1985] präparierte Proben

verwendet. Dabei handelt es sich um eine modifizierte Methode von Kikkawa und Mitarbeitern [Kikkawa et al., 1983]. Alle folgenden Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Herrn Professor Hofer, Leiter des Instituts für Biologie, Universität Konstanz, durchgeführt.

3.8.2 Proteinkinase-Tests

In allen Tests wurde Adenosintriphosphat (ATP) im Überschuss (Endkonzentration im Test 0,12 mmol/l) über ein geeignetes Proteinsubstrat (Histon III-S, Sigma, Endkonzentration 0,5 mg/ml) in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen im Überschuss über ATP (Endkonzentration 5 mmol/l $MgCl_2$) eingesetzt. ATP wurde durch Zugabe einer geringen Menge gamma- ^{32}P -ATP (Amersham) radioaktiv markiert. Weitere Zusätze in den Testmischen waren abhängig von der zu untersuchenden Kinase. Die Kinasen wurden in einem geeigneten Verhältnis mit Puffer (20 mM TEA pH 7,5; 2% Glycerin; 1-2 mM β -Mercaptoethanol) verdünnt und in Eppendorf-Gefäßen mit Verdünnungen von Fexofenadin in 20 mM Triethanolamin (TEA) gemischt. Die Substratphosphorylierung wurde durch Zugabe von 20 μ l Testmix zu 20 μ l Kinase-Ansatz und anschließendem Vortexen gestartet. Die Nullwerte enthielten nur Puffer. Nach 30 min Inkubationszeit bei Zimmertemperatur wurde die Reaktion durch Pipettieren von 20 μ l je Ansatz auf Trichloressigsäure (TCA)-behandeltes Whatman 3M-Papier (Sigma) beendet. Überschüssiges ATP wurde durch 6 x Waschen mit 5%-iger TCA entfernt. Nach Entfernung von TCA mit Methanol wurden die vorher markierten Papierstreifen auseinandergeschnitten und im Trockenschrank getrocknet. Die an den Papierstreifen haftende Radioaktivität wurde mit einem Beckmann-Szintillationszähler bestimmt.

Zur Aktivierung der PKC wurden Kalziumionen in einer Endkonzentration von 0,5 mmol/l und variable Mengen aus Phospholipiden (*Brain Extract Type III* Sigma, ca. 80 % Phosphatidylserin) und 1,2-Dioleoylglycerin (Sigma) eingesetzt (Stammlösung: 2 mg/ml Phospholipide und 40 μ l Dioleoylglycerin,

vor der Zugabe ultraschallbehandelt). Die PKC-Aktivität ergab sich aus den in Anwesenheit von Kalzium gemessenen Gesamtaktivität abzüglich der Kalzium-unabhängigen Kontrollaktivität.

Variation der Enzymkonzentration:

Die Präparate wurden nach Vorinkubation mit Fexofenadin (1 nmol/l, 100 nmol/l, 3,16 μ mol/l, 100 μ mol/l) in Gegenwart von 50 μ g Phospholipid + 3 μ g Diolelylglycerin 30 min lang getestet. Die Endverdünnungen der Kinasen im Test waren jeweils 1/10, 1/50, 1/250.

Variation der Lipid/ Diolelylglycerin (PL/DOG)-Konzentration:

Von den Präparaten wurden geeignete Verdünnungen angesetzt und nach 30 min Vorinkubation mit Fexofenadin (0 nM, 200 nM, 20 μ M) in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an PL/DOG (0 μ g/ml, 5,06 μ g/ml, 16 μ g/ml, 50,6 μ g/ml, 160 μ g/ml) getestet.

3.8.3 cAMP-abhängige Proteinkinase

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) wurde nach dem Verfahren von Treptau und Mitarbeitern aus Rinderherz isoliert [Treptau et al., 1996]. Mit Ausnahme der zur Aktivierung der PKC notwendigen Zusätze wurde der PKA-Test auf gleiche Weise durchgeführt. Die Aktivität der PKA ergibt sich aus den Zählwerten der Szintillationszählung abzüglich des Nullwertes.

Das Enzym wurde vor der Aktivierung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Fexofenadin für 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert.

3.8.4 Tyrosinkinase

Eine *src*-Typ Tyrosinkinase (TyrK) wurde nach dem Verfahren von Batzer und Mitarbeitern aus Schweinemilzen isoliert [Batzer et al., 1990]. Zur Aktivierung der Tyrosinkinase wurde der Test in Gegenwart von Manganionen durchgeführt. Zur Unterdrückung der Rückreaktion (Dephosphorylierung des Substrates durch

Tyrosinphosphatase) wurden Ammoniumheptamolybdat (300 μM) und Natriumdekavanadat (300 μM) zur Hemmung der Proteintyrosinphosphatase (PTP) eingesetzt. Als Substrat wurde poly (Tyr:Glu 1.4)_n, Sigma Endkonzentration 1mg/ml verwendet.

3.8.5 Proteintyrosinphosphatase (Rezeptorphosphatase CD45)

Beispielhaft für Tyrosinphosphatasen wurde ein weitgehend homogenes Präparat der Rezeptorphosphatase CD45 aus Schweinemilz-Lymphozyten-Membranen (180 kDa Isoform) verwendet. Alle Experimente einschließlich Vorinkubation wurden bei Raumtemperatur durchgeführt [Stader & Hofer, 1992].

Da CD45 in Abwesenheit von Aktivatoren und/oder Stabilisatoren nur eine geringe Aktivität gegen das Substrat (³²P-tyrosinphosphoryliertes reduziertes carboxymethyliertes, maleyliertes Lysozym, RCML 6 μM) aufweist, wurde der Effekt von Fexofenadin auf CD45 unter verschiedenen Aktivierungsbedingungen untersucht. Die Effektoren (100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 0,04 % TritonX-100, 2 mM Spermidin, Sigma) wurden dem Verdünnungspuffer in der 2,5-fachen Endkonzentration zugesetzt. Die Testansätze wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend im Eppendorfgefäß mit 20 μl Testmix (6 μM ³²P-RCML, 2mg/ml bovines Serumalbumin in 50 mM TEA-HCl, pH 7,5) gemischt. Nach 20 Minuten wurden die Reaktionen durch Zugabe von 40 μl 20 %iger TCA beendet. TCA-ausgefälltes Protein wurde 3 Minuten zentrifugiert und die Radioaktivität der Überstände im Szintillator gezählt.

3.9 Mediatormessung

3.9.1 Histamin

Zur Messung des Mediators Histamin stand ein automatisiertes spektrofluorometrisches Verfahren zur Verfügung (Technicon Autoanalyser II, Bran & Luebbe, Hamburg).

Es handelt sich um ein Verfahren, das ursprünglich von Shore publiziert [Shore et al., 1959] und mehrfach modifiziert wurde

[Ennis, 1991]. Dabei wurden die Histaminproben, nach Ausfällung der Proteine mit 60 %iger HClO_4 , automatisiert mit 10 %iger NaOH-Lösung versetzt und alkalisiert. Durch zugesetztes n-Butanol wurde Histamin aus der wässrigen Lösung extrahiert, welche anschließend im Extraktor I von der organischen Phase abgetrennt und verworfen wurde. Die Probe wurde dann mit n-Heptan und 0,2 M HCl versetzt, wobei sich eine Rückextraktion von der organischen Phase in die wässrige vollzog. Erstgenannte wurde dann im Extraktor II abgetrennt und verworfen. Die wässrige Phase wurde neu mit Luft segmentiert und der Analyse zugeführt. Unter Zugabe von 1M NaOH reagierte die Probe mit OPT zu einem fluoreszierenden Farbstoff, wobei die gemessene Fluoreszenz der Histaminkonzentration direkt proportional war. Nach optimaler Reaktionszeit wurde der Vorgang durch Zusatz von 0,6 M HCl gestoppt und das Produkt bei 460 nm gemessen. Alle zur Histaminbestimmung vorgesehenen Proben wurden nach dem Auftauen mit 50 μl HClO_4 (60 %) versetzt und für 15 min bei 1000 g (Raumtemperatur) zentrifugiert. Der Histamingehalt der Proben wurde für alle Proben individuell im jeweiligen Zellpellet und im Reaktionsüberstand gegen je nach Messbereich unterschiedliche Standardhistaminkontrollen (50 bis 100 ng/ml) gemessen. Dadurch wurde eine Bestimmung des Gesamthistamingehaltes, der ursprünglich in den Zellen enthalten war, und eine prozentuale Berechnung der im jeweiligen Versuch freigesetzten Histaminmenge möglich. Die Histaminfreisetzung (in %) ergab sich aus dem Quotienten der Histaminmenge im Überstand und der Gesamthistaminmenge, welche sich wiederum aus der Summe der Histaminmenge aus Überstand und Pellet berechnete. Dies entspricht dem international üblichen Verfahren bei Experimenten mit histaminhaltigen Zellen [Ennis, 1991, Kleine-Tebbe et al., 1994, Ramachers et al., 1996].

Die Inhibition der Histaminfreisetzung durch den zu untersuchenden Wirkstoff (Fexofenadin), ausgedrückt in %

Hemmung der Histaminkontrollfreisetzung (Stimulus der Histaminfreisetzung ohne Fexofenadin), ergab sich aus der Relation zwischen prozentualer Histaminfreisetzung und prozentualer Histaminkontrollfreisetzung.

3.9.2 Leukotrien C₄

Der LTC₄-Gehalt in Überständen stimulierter Basophiler wurde mittels eines spezifischen ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent-assay*)-Systems (Coulter-Immunotech, Hamburg, bzw. Natutec, Frankfurt) nach Anweisung der Hersteller gegen eine Standardkurve (0,2 bis 50 ng/ml) bestimmt. Zur Messung und Auswertung des Assays stand ein Mikrotiterplatten-ELISA-Reader (Modell 450, Biorad, München), sowie die dazugehörige Software zur Verfügung (Microplate Manager/PC, Biorad).

Der ELISA ist eine quantitative analytische Methode, bei der ein Reaktionspartner (Antigen oder Antikörper) enzymatisch markiert ist. Dieser Assay basierte auf dem Wettbewerb zwischen freiem LTC₄ und dem LTC₄-Tracer (LTC₄ gebunden an ein Acetylcholinesterase-Molekül) um eine limitierte Anzahl von LTC₄-Bindungsstellen an einem Kaninchenantiserum. Die Konzentration des Tracers wurde dabei konstant gehalten, während die Konzentration von freiem LTC₄ (Probe oder Standard) variabel war. Die Menge des an das Antiserum gebundenen Tracers war umgekehrt proportional zu der LTC₄-Konzentration.

Das Produkt dieser enzymatischen Reaktion war gelb und wurde bei 412 nm im ELISA-Reader gemessen.

3.9.3 *Eosinophiles kationisches Protein*

Die Konzentration von ECP wurde mit Hilfe eines computergestützten Fluoroimmunoassays (Unicap 100, Pharmacia Upjohn, Freiburg) nach den Vorschriften des Herstellers bestimmt (kalibrierte Standardkurve: 2 bis 200 µg/l). Das Testprinzip beruht darauf, dass anti-ECP, kovalent gebunden an das ImmunoCAP, mit dem ECP in den Serumproben reagiert.

Nach dem Waschen werden Enzym-markierte anti-ECP-Antikörper hinzugefügt, um die Bildung eines Komplexes zu erreichen. Nach der Inkubation wird ungebundenes Enzym-anti-ECP abgewaschen und der gebundene Komplex mit einer Entwicklerlösung inkubiert. Nachdem die Reaktion unterbrochen wurde, misst man die Fluoreszenz des Eluats im FluoroCount 96 (Pharmacia). Die Fluoreszenz verhält sich direkt proportional zur ECP-Konzentration in der Probe. Das UniCap 100 mit eingebauter Software führt alle Schritte im Testlauf sowie den Ausdruck der Ergebnisse automatisch durch.

3.9.4 Interleukin-4

IL-4 wurde mit einem ELISA-System (Coulter-Immunotech) nach der Vorschrift des Herstellers bestimmt und mit oben genanntem ELISA-Reader gegen eine Standardkurve (0 bis 1000 pg/ml) gemessen und ausgewertet.

Das Prinzip des Assays beruht auf zwei immunologischen Schritten (*Sandwich-Type-Assay*). Im ersten Schritt wurden monoklonale anti-IL-4-Antikörper auf der Mikrotiterplatte gebunden (feste Phase). Die Menge des gebundenen IL-4 aus der Probe wurde durch die Zugabe eines markierten Zweitantikörpers, der unter Bildung eines „Sandwich“ an das IL-4 bindet, ermittelt.

Die Farbintensität war dabei der IL-4-Konzentration proportional und wurde bei 450 nm gemessen.

3.10 *Ex vivo* – *in vitro* Experimente

Für diese Experimente wurden freiwilligen Blutspendern etwa 80 ml Blut aus der Kubitalvene einmal vor Einnahme von 3 Tabletten Telfast® 180 und 3,5 Stunden nach der Einnahme entnommen. Die basophilen und eosinophilen Leukozyten wurden mittels der oben beschriebenen Methoden isoliert. Stimuliert wurden die Zellen *in vitro* mit Kalziumionophor A23187 (10^{-7} und 10^{-6} mol/l) und dem Antikörper anti-IgE (in der Endkonzentration 0,001 % und 0,01 %) jeweils vor und nach der Einnahme von Telfast®.

Anschließend wurden jeweils die Mediatoren Histamin und ECP – wie oben beschrieben – gemessen.

3.11 Statistische Tests

Sämtliche Signifikanzuntersuchungen erfolgten mit dem Student's-*t*-Test für paarige (abhängige) und unpaarige Stichproben zwischen 3 und 22. Als signifikant wurden Werte mit $p < 0,05$ und als hochsignifikant Werte mit $p < 0,02$ angesehen. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM für den jeweiligen Stichprobenumfang n dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Experimente mit isolierten basophilen Leukozyten

4.1.1 IgE-vermittelte Histaminfreisetzung

Isolierte basophile Leukozyten von gesunden Spendern wurden mit steigenden Fexofenadin-Konzentrationen inkubiert, wobei eine dosisabhängige Hemmung der Histaminfreisetzung nach Zugabe von anti-IgE beobachtet wurde (Abbildung 8).

Eine statistisch signifikante Hemmung wurde nur bei einer Fexofenadin-Konzentration von 10 µmol/l erreicht.

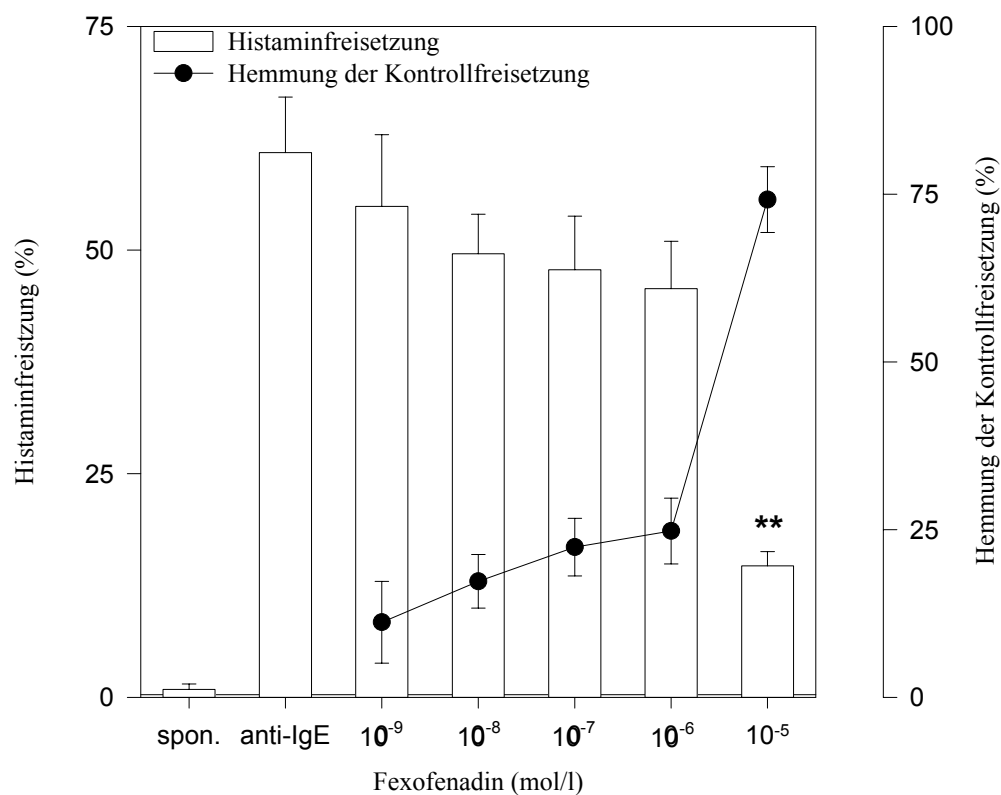


Abbildung 8: Wirkung von Fexofenadin auf die IgE-vermittelte Histaminfreisetzung aus Basophilen. Die Zellen wurden isoliert und stimuliert mit anti-IgE (0,01 % der Stammlösung), wie im Methodenteil beschrieben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte dargestellt \pm SEM für $n=6$. Die Kontrollfreisetzung (anti-IgE induzierte Histaminfreisetzung ohne Fexofenadin) betrug $60,9 \pm 6,2$ % des Gesamthistamingehaltes für 6 unabhängige Experimente. Die spontane Histaminfreisetzung betrug $0,9 \pm 0,6$ %. ** bedeutet $p < 0,02$ und zeigt damit die hochsignifikante Hemmung der Kontrollfreisetzung.

4.1.2 IgE-vermittelte Freisetzung von Interleukin-4

Neuere Studien haben gezeigt, dass basophile Leukozyten Zytokine sehr schnell freisetzen können (innerhalb von 4 Stunden) und dass in einigen Versuchen sogar präformierte IL-4-Speicher mit einer Freisetzung von wenigen Minuten nachgewiesen werden konnten [Gibbs et al., 1996]. Die verantwortlichen Mechanismen für die Freisetzung von Histamin oder IL-4 scheinen nicht identisch zu sein [Gibbs et al., 1998].

In der vorliegenden Studie war Fexofenadin nicht in der Lage, die IL-4-Freisetzung aus isolierten basophilen Leukozyten nach Stimulation über den $Fc_{\epsilon}RI$ -Rezeptor (anti-IgE Antikörper) signifikant zu inhibieren.

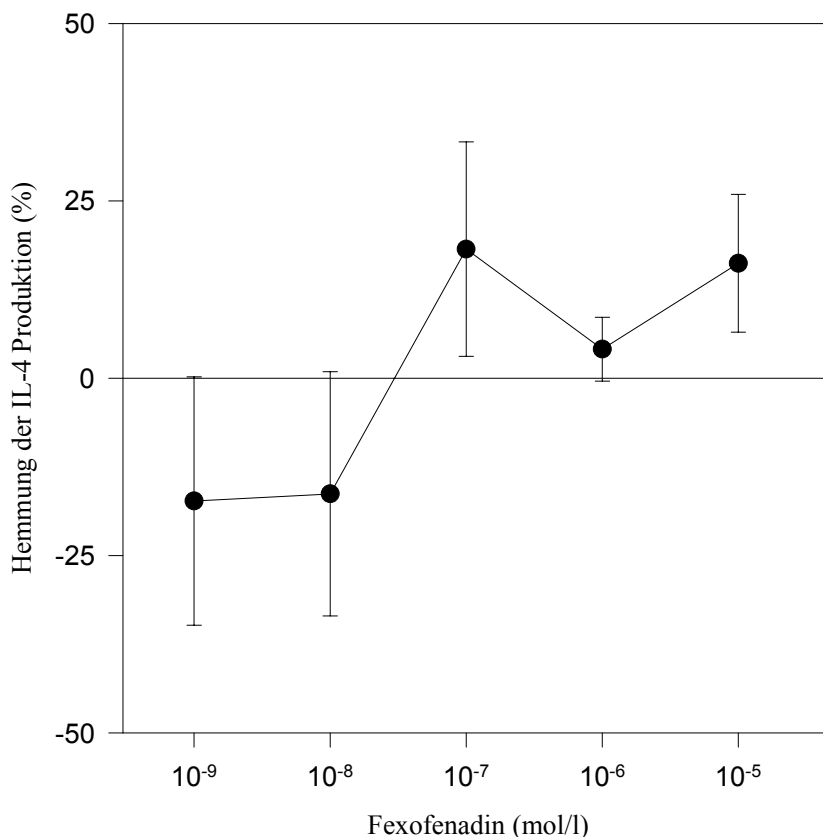


Abbildung 9: Hemmung der IgE-vermittelten Freisetzung von IL-4 aus basophilen Leukozyten durch Fexofenadin. Die Zellen wurden isoliert und mit anti-IgE stimuliert, wie im Methodenteil beschrieben. Die Reaktionszeit betrug 4 Stunden. Die Kontrollfreisetzung (IgE-induzierte Freisetzung ohne Fexofenadin) betrug $367,5 \pm 193,2$ pg IL-4/ 10^6 Zellen für 6 unabhängige Experimente. Die spontane IL-4-Freisetzung betrug $0,8 \pm 0,8$ pg IL-4/ 10^6 Zellen. Die negativen Werte bedeuten eine Potenzierung der Kontrollfreisetzung.

4.1.3 Interleukin-3-induziertes Priming

Verschiedene Arbeitsgruppen haben zeigen können, dass unterschiedliche Zytokine, wie IL-3 und IL-5, wirkungsvolle Priming-Faktoren für basophile Leukozyten sind [Nitschke et al., 1996]. Dies korreliert *in vivo* möglicherweise mit einer Akkumulation und lokalen Aktivierung der basophilen Leukozyten 6 bis 8 Stunden nach Antigenstimulation [Massey, 1993]. Das Zytokinpriming konnte sowohl bei Gesunden als auch bei atopischen Blutspendern nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde Fexofenadin mit Basophilen inkubiert, die zuvor mit IL-3 vorstimuliert (Priming) und konsekutiv über den IgE-Rezeptor aktiviert wurden. Wie in Abbildung 10 gezeigt, konnte keine signifikante Beeinflussung des Primings durch Fexofenadin beobachtet werden. Die maximale Hemmung der Kontrollfreisetzung (anti-IgE plus IL-3) betrug $51,9 \pm 11,5$ % ($n=3$) bei einer Fexofenadin-Konzentration von $10 \mu\text{mol/l}$.

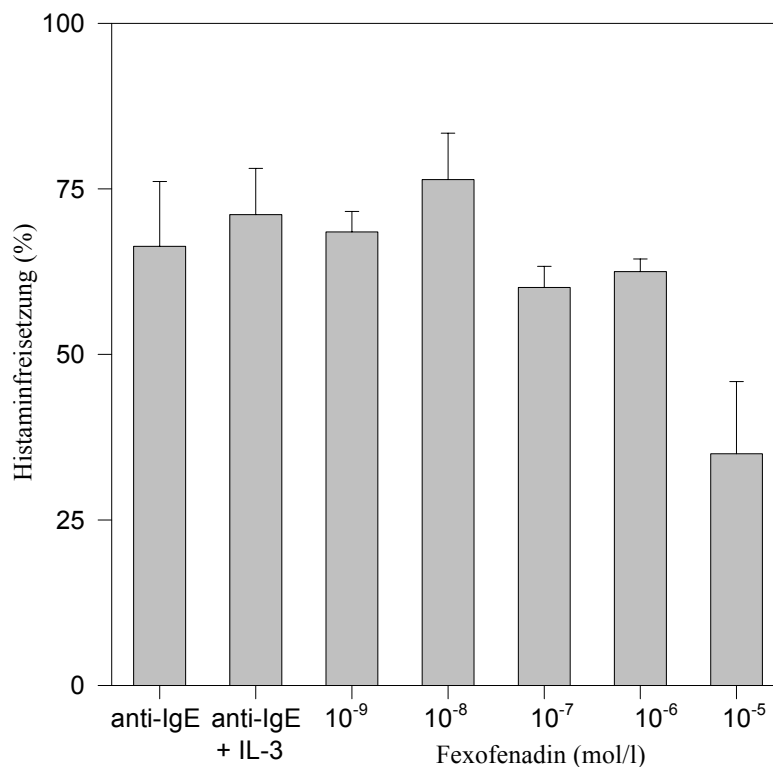


Abbildung 10: Wirkung von Fexofenadin auf IL-3 vorstimulierte und durch anti-IgE aktivierte basophile Leukozyten. Die Zellen wurden isoliert, mit IL-3 (10 ng/ml) vorstimuliert und mit anti-IgE (0,005 % der Stammlösung) aktiviert, wie im Methodenteil beschrieben. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert der prozentualen Histaminfreisetzung \pm SEM für 3 unabhängige Versuche.

4.1.4 LTC₄ Produktion

Innerhalb einer Konzentrationsbreite von 1 pmol/l bis 1 µmol/l war Fexofenadin nicht in der Lage, die Fc_εRI-vermittelte LTC₄ Produktion durch basophile Leukozyten signifikant zu unterdrücken (Abbildung 11). Erst bei einer Konzentration von 10 µmol/l wurde eine signifikante Hemmung beobachtet (p < 0,05).

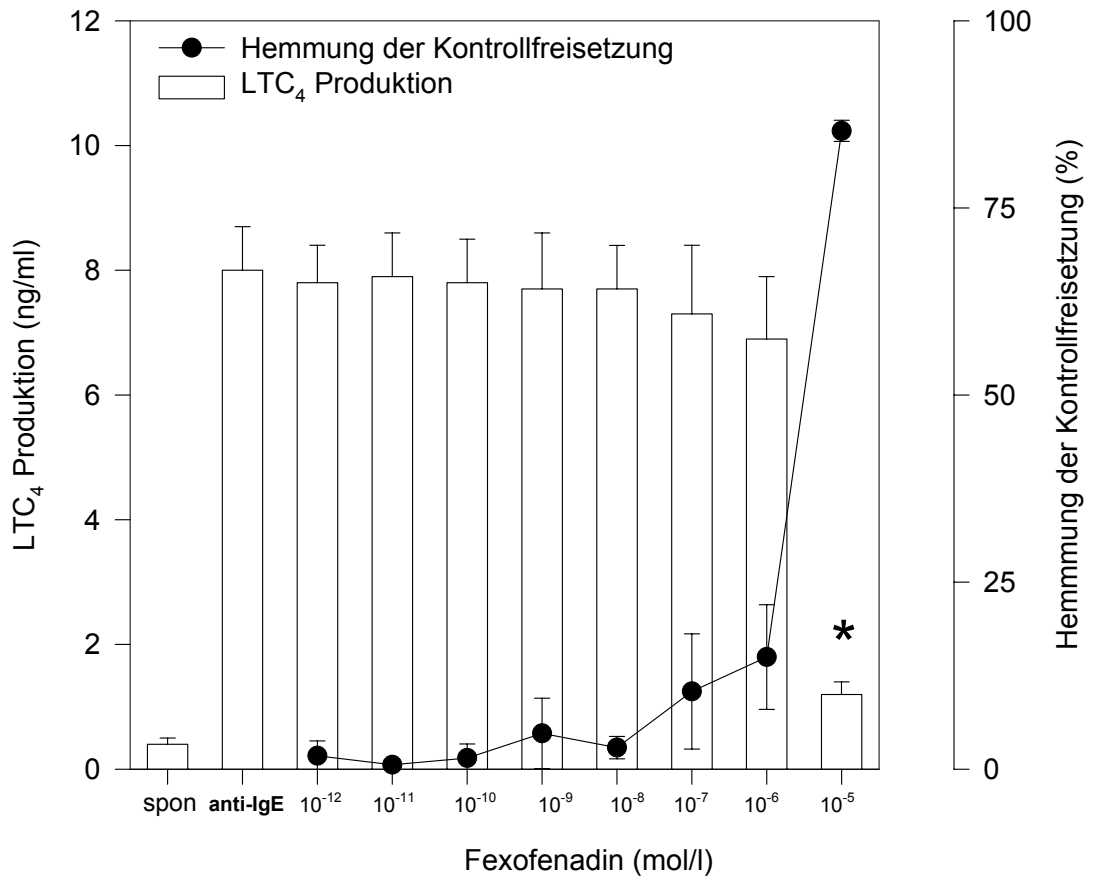


Abbildung 11: Wirkung von Fexofenadin auf die IgE-vermittelte LTC₄ Produktion durch basophile Leukozyten. Die Zellen wurden isoliert und mit anti-IgE (0,01 % der Stammlösung) für 30 min stimuliert, wie im Methodenteil beschrieben. Die Daten zeigen die Mittelwerte ± SEM für 4 unabhängige Experimente. * p < 0,05.

4.2 Experimente mit isolierten eosinophilen Leukozyten

4.2.1 Aktivierung mit Kalziumionophor A23187

Die Aktivierung menschlicher eosinophiler Leukozyten mit Kalziumionophor A23187 führt zu einer dosisabhängigen Freisetzung von ECP und LTC₄. Die isolierten Zellen wurden mit steigenden Fexofenadin-Konzentrationen inkubiert und anschließend mit A23187 stimuliert. Dabei konnte eine dosisabhängige Hemmung beobachtet werden (Abbildung 12). Bei der Inhibition konnten zwei Aktivitätsmaxima von Fexofenadin – bei 1 nmol/l und bei 10 µmol/l – beobachtet werden.

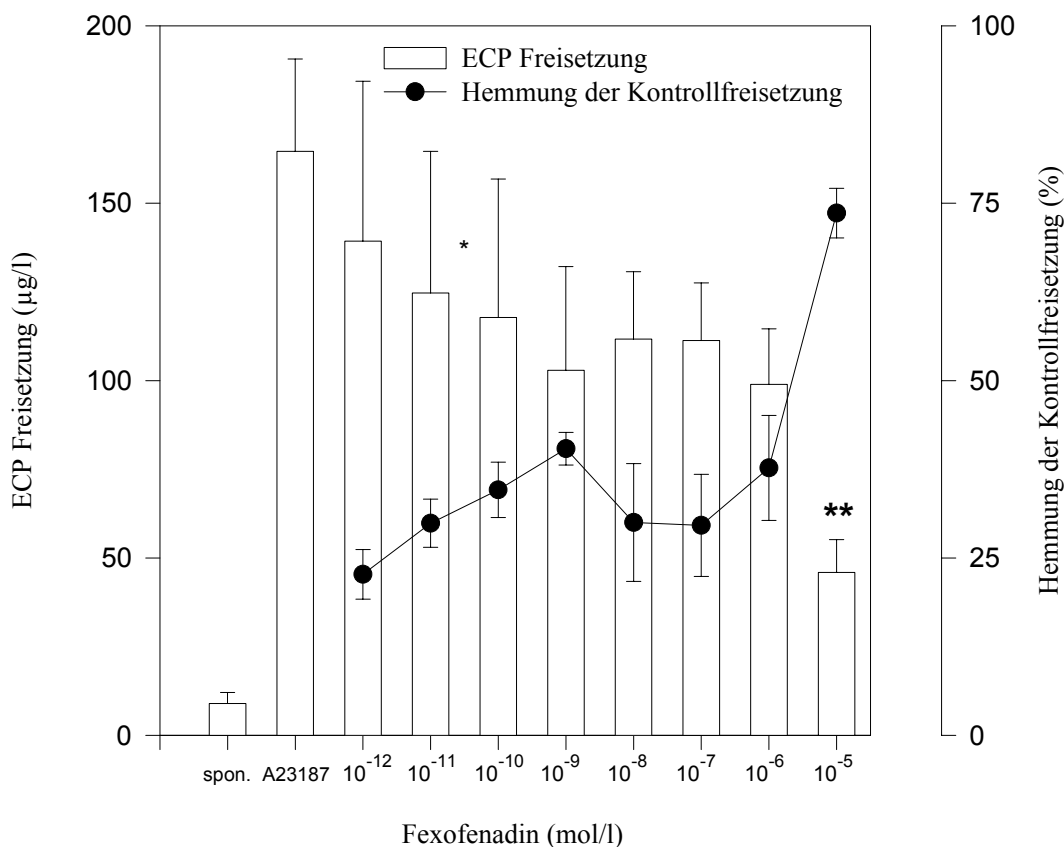


Abbildung 12: Wirkung von Fexofenadin auf die A23187-vermittelte ECP-Freisetzung aus eosinophilen Leukozyten. Die Zellen wurden isoliert und stimuliert mit A23187 (1 µmol/l), wie im Methodenteil beschrieben. Die Kontrollfreisetzung (A23187-induzierte ECP-Freisetzung ohne Fexofenadin) betrug $164,6 \pm 26,0$ µg/l für 7 unabhängige Experimente. Die spontane ECP-Freisetzung betrug $9,0 \pm 3,1$ µg/l (n=7). * und ** bedeuten $p < 0,05$ und $p < 0,02$ und zeigen eine signifikante bzw. hochsignifikante Hemmung der Kontrollfreisetzung.

Fexofenadin zeigte im Vergleich dazu eine verminderte Fähigkeit, die Produktion von LTC₄ zu inhibieren (Abbildung 13).

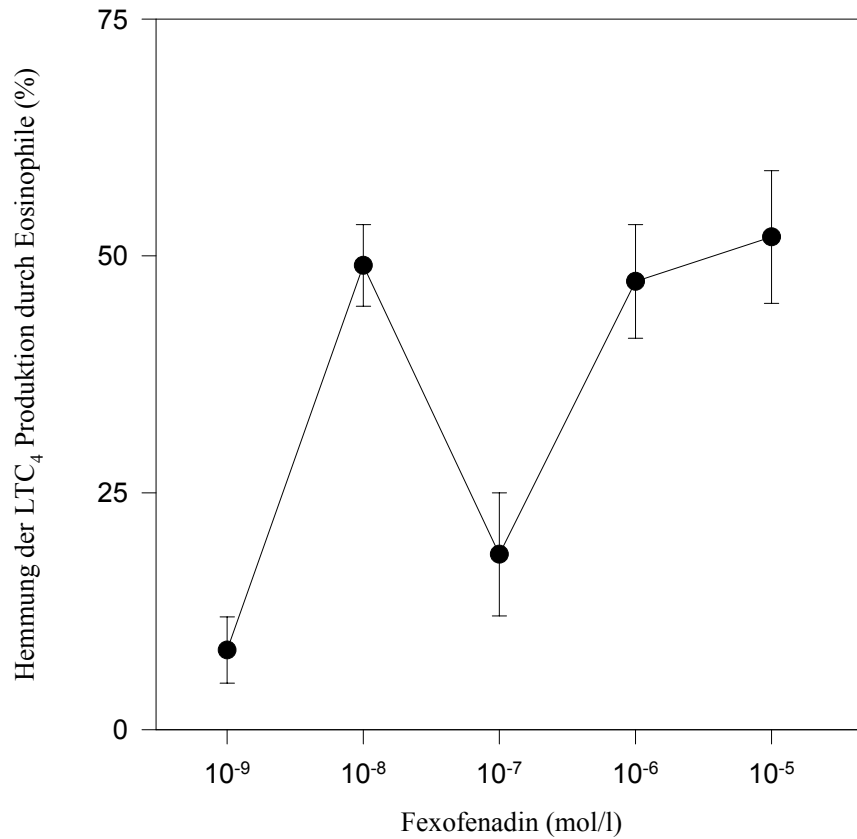


Abbildung 13: Hemmung der A23187-vermittelten Produktion von LTC₄ aus eosinophilen Leukozyten durch Fexofenadin. Die Zellen wurden isoliert und stimuliert mit A23187 (1 µmol/l), wie im Methodenteil beschrieben. Die Kontrollfreisetzung (A23187-induzierte Freisetzung ohne Fexofenadin) betrug 45,0±14,7 ng/ml für 7 unabhängige Experimente. Die spontane Produktion von LTC₄ betrug 0,8±2,0 ng/ml.

4.2.2 Weitere Untersuchungen zur A23187-vermittelten ECP-Freisetzung

Wie in der ersten Versuchsserie dargestellt, bewirkt Fexofenadin eine deutliche dosisabhängige Reduktion der ECP-Freisetzung an isolierten menschlichen eosinophilen Leukozyten gesunder Spender. In einer zweiten Serie wurde der Konzentrationsbereich von Fexofenadin bis auf 0,001 pmol/l reduziert (Abbildung 14). Sogar im picomolaren Bereich war die Zellantwort gehemmt. Im Gegensatz zu den vorausgegangenen Experimenten konnte jedoch keine signifikante Hemmung gezeigt werden. In Abbildung 15 sind drei repräsentative Experimente dargestellt.

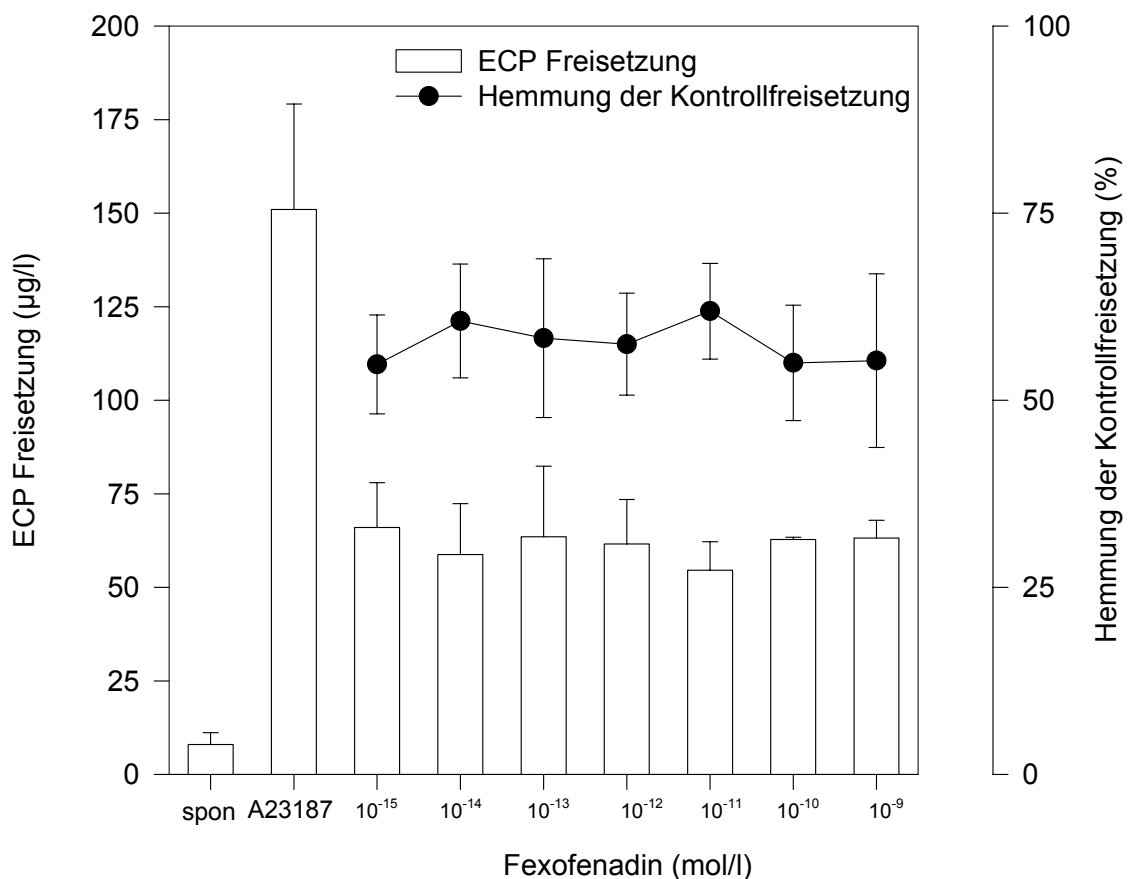


Abbildung 14: Wirkung von Fexofenadin auf die A23187-induzierte ECP-Freisetzung aus eosinophilen Leukozyten. Die Zellen wurden isoliert und mit A23187 (1 µmol/l) stimuliert, wie im Methodenteil beschrieben. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM für 4 unabhängige Versuche.

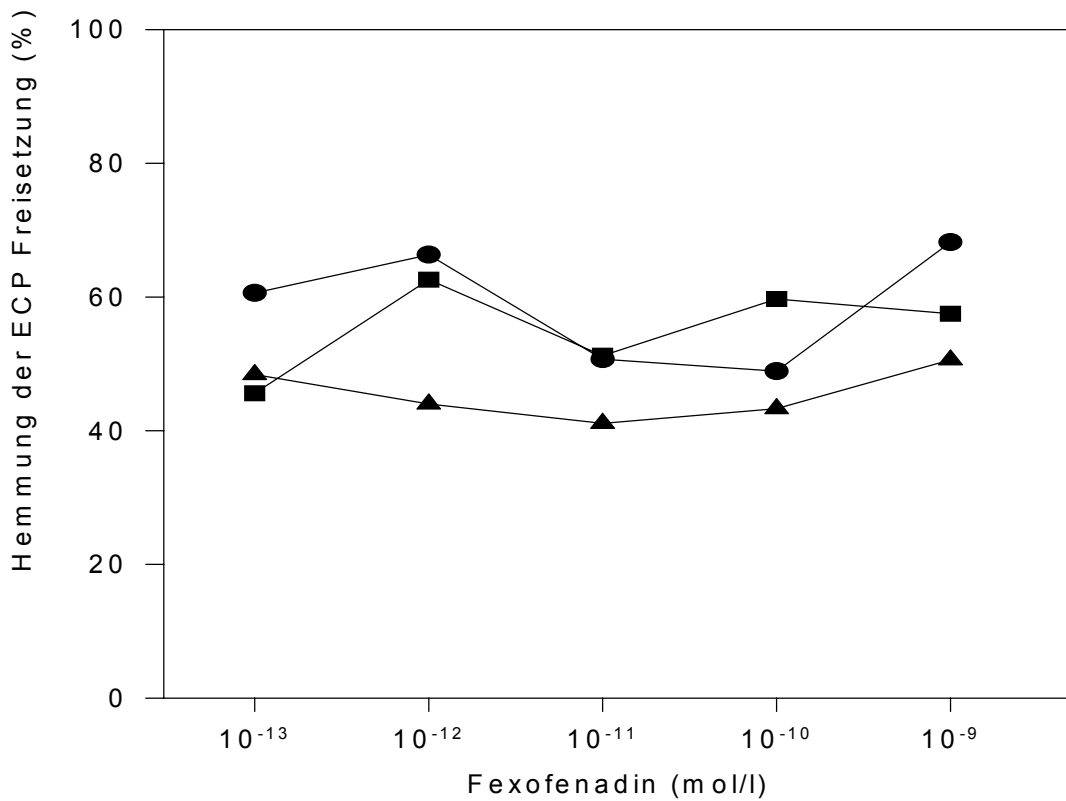


Abbildung 15: Hemmung der A23187-induzierten ECP-Freisetzung durch Fexofenadin aus menschlichen eosinophilen Leukozyten. Die Zellen wurden isoliert und mit A23187 ($1 \mu\text{mol/l}$) stimuliert, wie im Methodenteil beschrieben. Die Abbildung zeigt drei unabhängige Experimente.

4.2.3 Reversibilität der Inhibition

Im nächsten Experiment wurde die Reversibilität der Wirkungen von Fexofenadin auf eosinophile Leukozyten untersucht.

Die Zellen wurden dazu 15 min mit Fexofenadin inkubiert, gewaschen und anschließend mit A23187 stimuliert. Als Parameter für die Zellaktivierung wurde die ECP-Freisetzung gemessen. Abbildung 16 fasst die Ergebnisse zusammen: Fexofenadin war immer noch in der Lage, die ECP-Freisetzung nach Stimulation bis zu 50 % im Vergleich zur Kontrollfreisetzung zu hemmen, obwohl die Testsubstanz aus dem Inkubationsansatz herausgewaschen wurde.

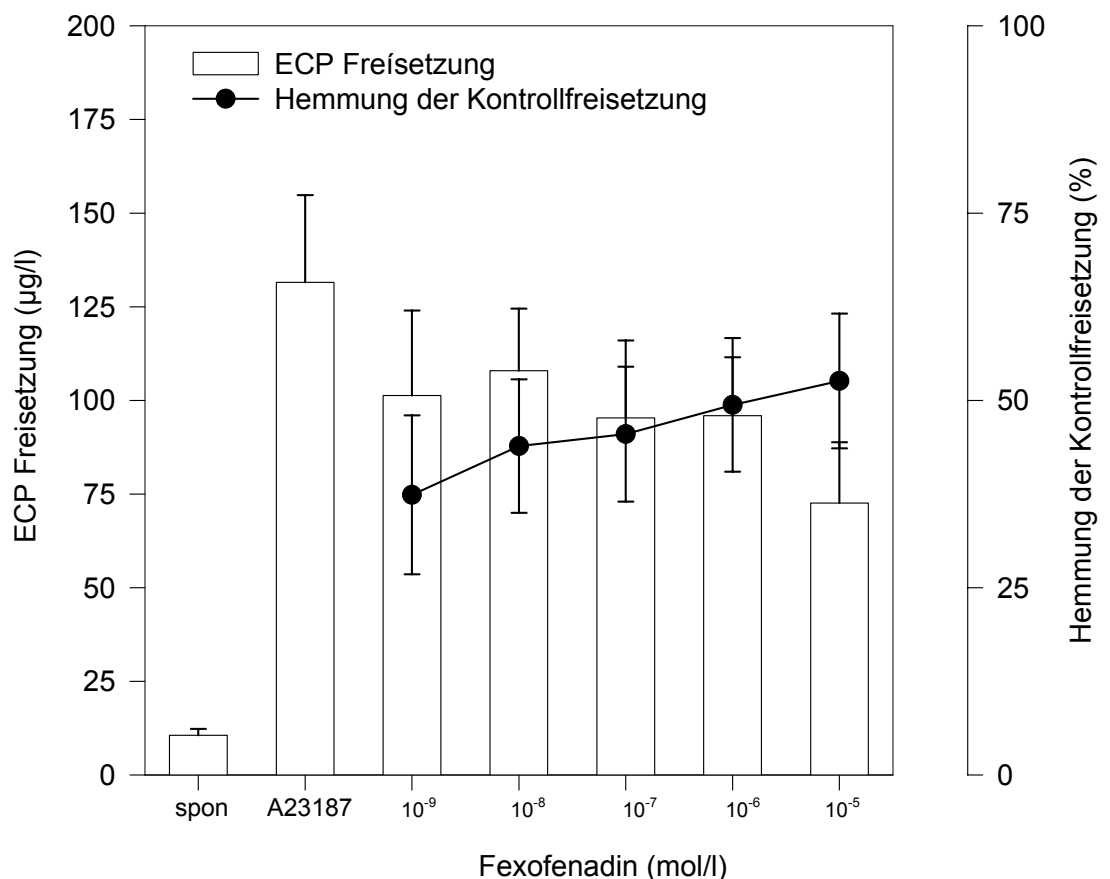


Abbildung 16: Untersuchungen zur Reversibilität der inhibitorischen Effekte von Fexofenadin auf die A23187-induzierte ECP-Freisetzung aus eosinophilen Leukozyten. Die Zellen wurden isoliert und 15 min mit Fexofenadin inkubiert, wie im Methodenteil beschrieben. Anschließend wurde die Testsubstanz ausgewaschen und die Zellen mit A23187 (1 µmol/l) für 30 min stimuliert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SEM für 5 unabhängige Experimente.

4.2.4 Kinetik der Wirkungen von Fexofenadin auf die ECP-Freisetzung

Zur Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit der Wirkung von Fexofenadin auf die ECP-Freisetzung wurden die Zellen unterschiedlich lang mit der Testsubstanz inkubiert (60 sec bis 15 min, Abbildung 17).

Abbildung 18 zeigt die Werte für die korrespondierende Hemmung.

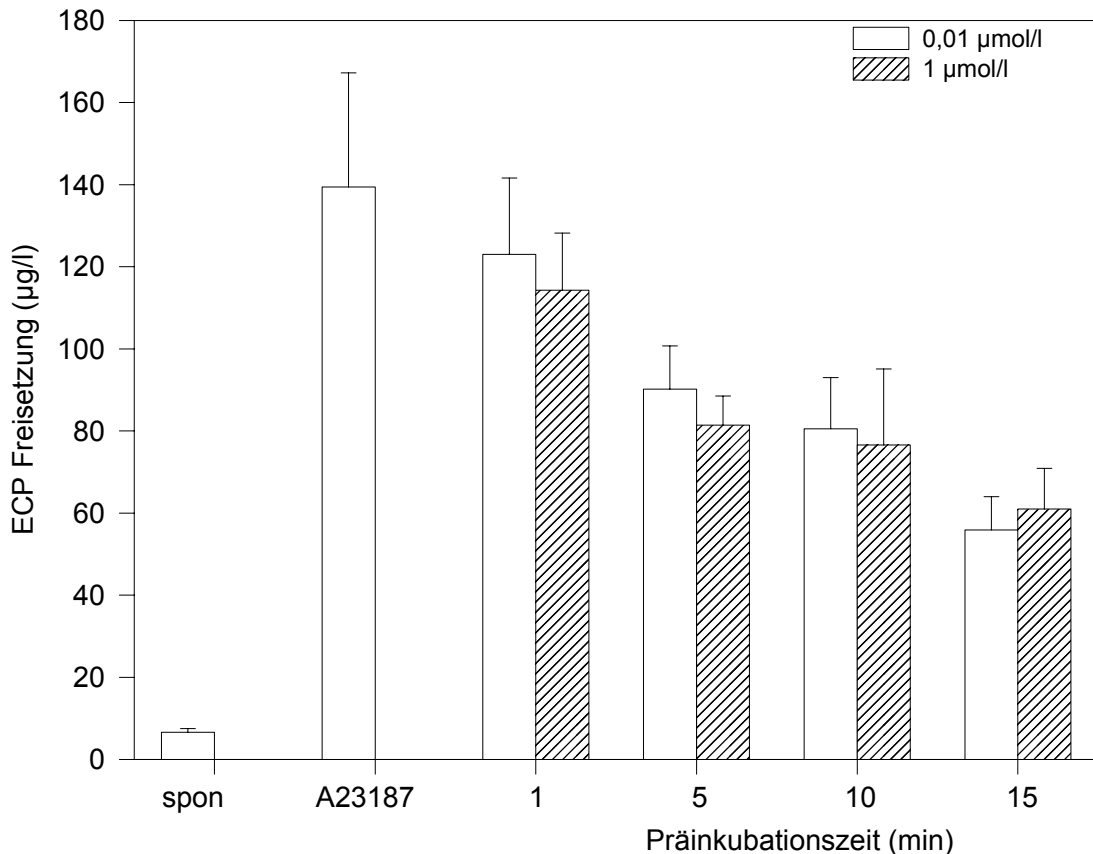


Abbildung 17: Wirkungen unterschiedlicher Inkubationszeiten von Fexofenadin auf die A23187-induzierte ECP-Freisetzung aus eosinophilen Leukozyten. Die Zellen wurden isoliert und mit A23187 (1 µmol/l) stimuliert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SEM der Freisetzung für 4 unabhängige Experimente.

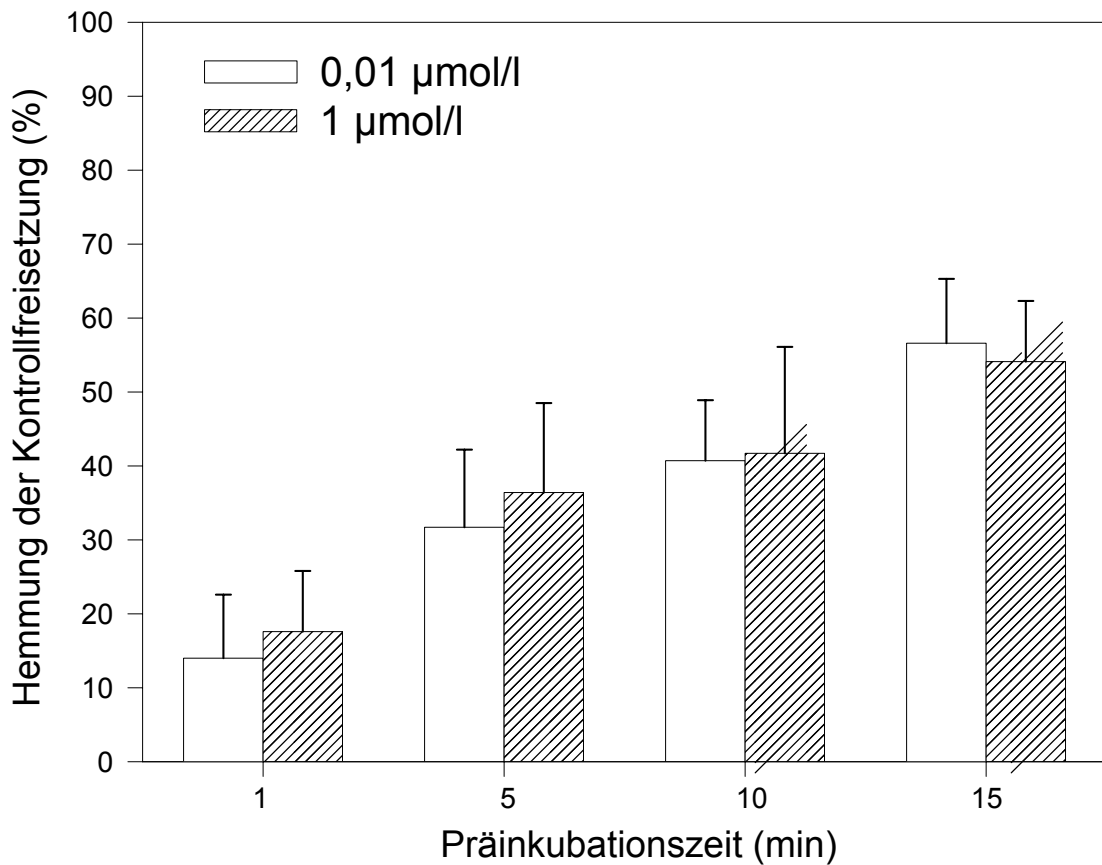


Abbildung 18: Wirkungen unterschiedlicher Inkubationszeiten von Fexofenadin auf die A23178-induzierte ECP-Freisetzung aus eosinophilen Leukozyten. Die Zellen wurden isoliert und mit A23187 (1 µmol/l) stimuliert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SEM der Hemmung gegenüber der Kontrollfreisetzung für 4 unabhängige Experimente.

4.2.5 Ko-Stimulation mit A23187 und GM-CSF

Einige Zytokine, wie GM-CSF, IL-3, IL-5, und TNF- α , sind in der Lage, den Degranulationsprozess eosinophiler Leukozyten signifikant zu steigern. In der nächsten Versuchsserie wurde der Einfluss von Fexofenadin auf die ECP-Freisetzung aus eosinophilen Leukozyten untersucht, die sowohl mit A23187 als auch mit GM-CSF stimuliert wurden.

Abbildung 19 zeigt eine dosisabhängige Hemmung der Zellantwort.

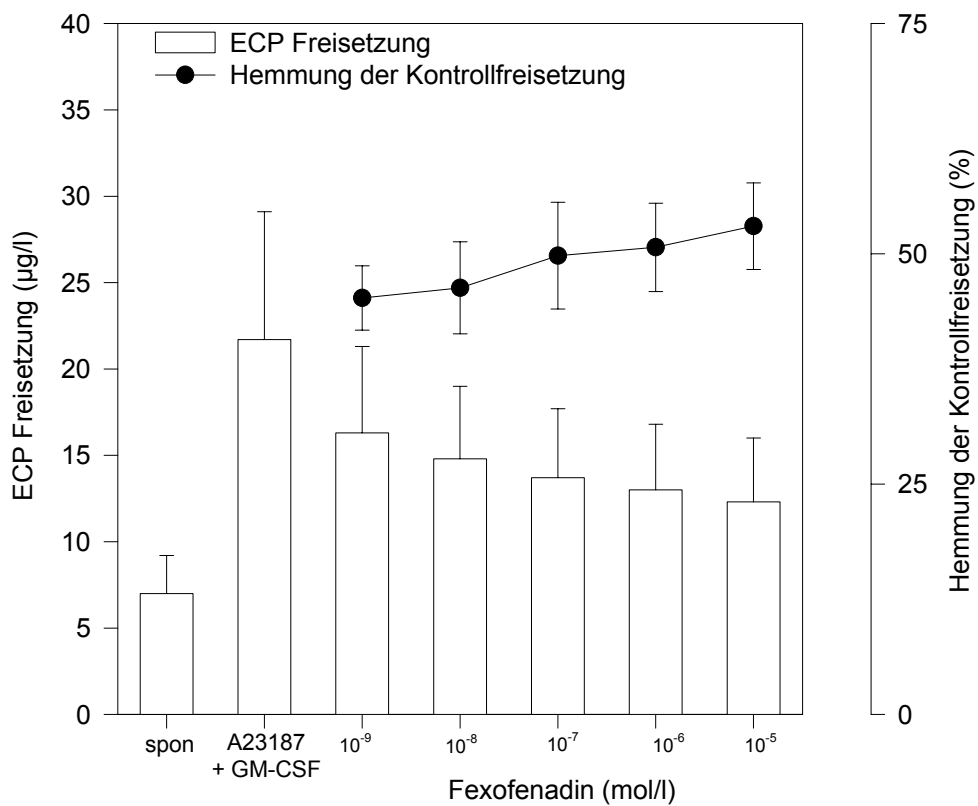


Abbildung 19: Wirkung von Fexofenadin auf die ECP-Freisetzung aus eosinophilen Leukozyten, die mit A23187 und mit GM-CSF stimuliert wurden. Die Zellen wurden isoliert und stimuliert mit GM-CSF (10 ng/ml) und A23187 (0,1 µmol/l), wie im Methodenteil beschrieben. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SEM für 5 unabhängige Experimente.

4.3 *In vitro*-Aktivierung von Leukozyten-Suspensionen atopischer Spender durch anti-IgE

Allergische Effektorzellen, die aus peripherem Blut von atopischen Spendern isoliert wurden, zeigten eine höhere Spontanfreisetzung als Zellen von gesunden Spendern. Untersucht wurde in den folgenden Experimenten, ob Fexofenadin in der Lage ist, die erhöhte Reagibilität von basophilen und eosinophilen Leukozyten, die aus dem Blut von Patienten mit akuter atopischer Dermatitis isoliert wurden, zu beeinflussen. Abbildung 20 zeigt eine dosisabhängige Hemmung der IgE-vermittelten Histaminfreisetzung. Bei einer Fexofenadin-Konzentration von 10^{-5} mol/l wurde eine hochsignifikante Hemmung der Kontrollfreisetzung beobachtet.

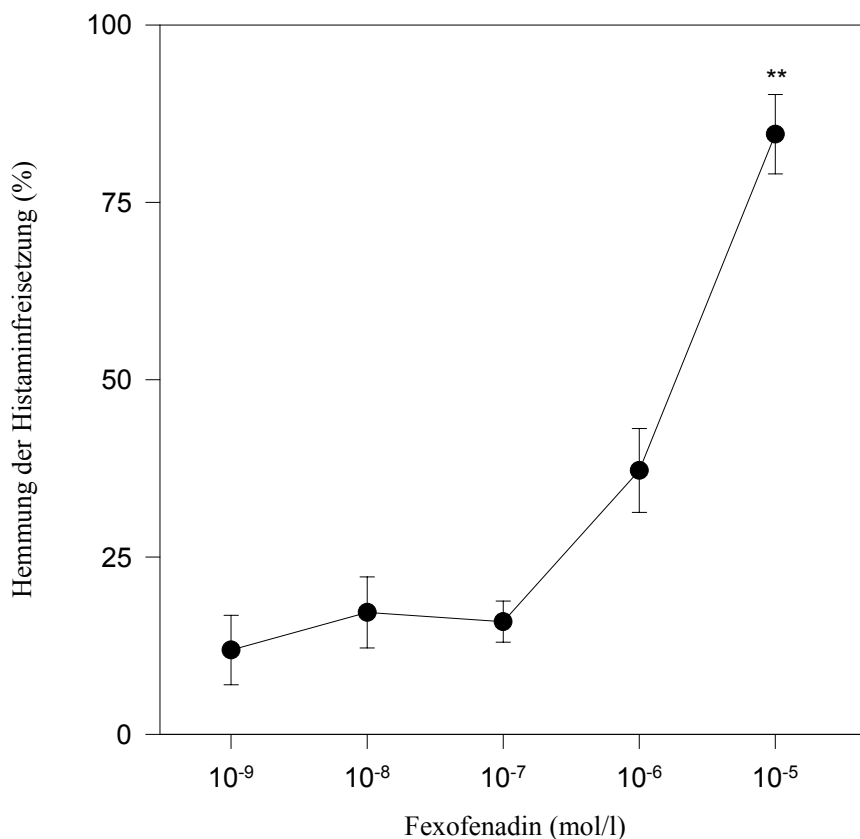


Abbildung 20: Hemmung der IgE-vermittelten Histaminfreisetzung aus Leukozyten atopischer Spender durch Fexofenadin. Die Zellen wurden isoliert und mit anti-IgE (0,01 % der Stammlösung) stimuliert, wie im Methodenteil beschrieben. Die Werte zeigen den Mittelwert der Hemmung \pm SEM für $n=6$. Die Kontrollfreisetzung IgE-vermittelte Histaminfreisetzung ohne Fexofenadin) betrug $42,9 \pm 8,9$ % für 6 unabhängige Experimente. Die spontane Histaminfreisetzung betrug $20,1 \pm 8,7$ %. ** bedeutet $p < 0,02$ und zeigt damit eine hochsignifikante Hemmung der Kontrollfreisetzung.

Die Bestimmung von ECP in den Überständen der stimulierten Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (Daten nicht dargestellt).

4.4 Ex vivo – in vitro Experimente

4.4.1 A23187-vermittelte ECP-Freisetzung aus eosinophilen Leukozyten

Bei freiwilligen Blutspendern wurde vor Einnahme von 3 Tabletten Telfast® (3 x 180 mg Fexofenadin) und 3,5 Stunden danach eine Blutentnahme (80 ml) durchgeführt. Aus dem Blut wurden Leukozyten isoliert und mit Kalziumionophor A23187 stimuliert. Die Aktivität der Zellen (basophile und eosinophile Leukozyten) im Vergleich zur Blutentnahme vor der Tabletteneinnahme anschließend deutlich reduziert (Abbildung 21).

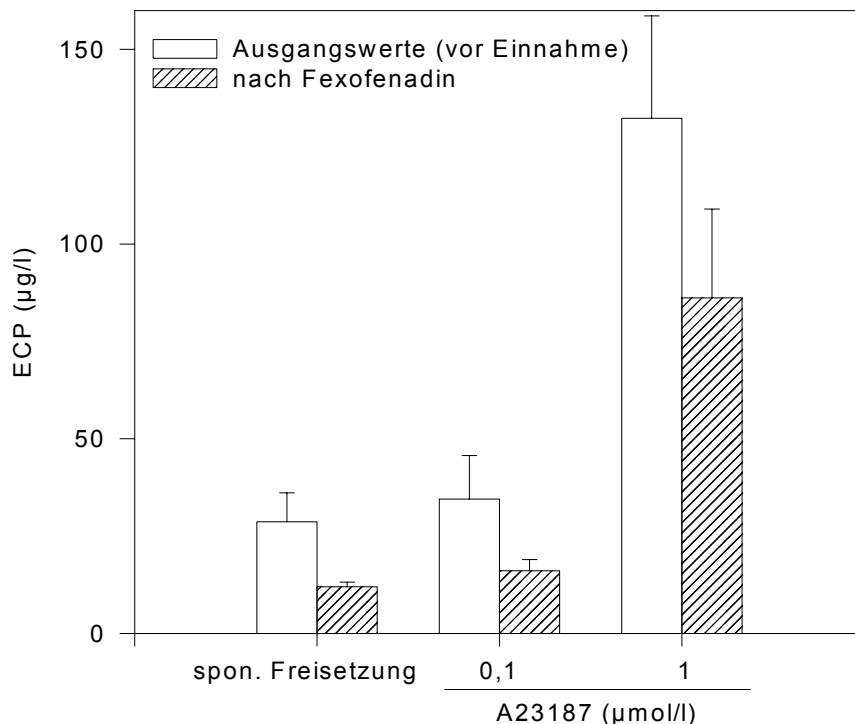


Abbildung 21: Wirkung von Fexofenadin auf die A23187-induzierte ECP-Freisetzung aus eosinophilen Leukozyten. Die Zellen wurden isoliert und mit A23187 vor sowie 3,5 h nach der Einnahme von 3 x 180 mg Telfast® stimuliert. Die Werte zeigen den Mittelwert \pm SEM für 3 unabhängige Experimente mit gesunden Blutspendern.

Die ECP-Freisetzung wurde bei beiden Stimuluskonzentrationen gehemmt (Abbildung 22). Interessanterweise konnte auch die spontane ECP-Freisetzung um 50 % im Vergleich zu den Werten vor der Einnahme von Telfast® reduziert werden.

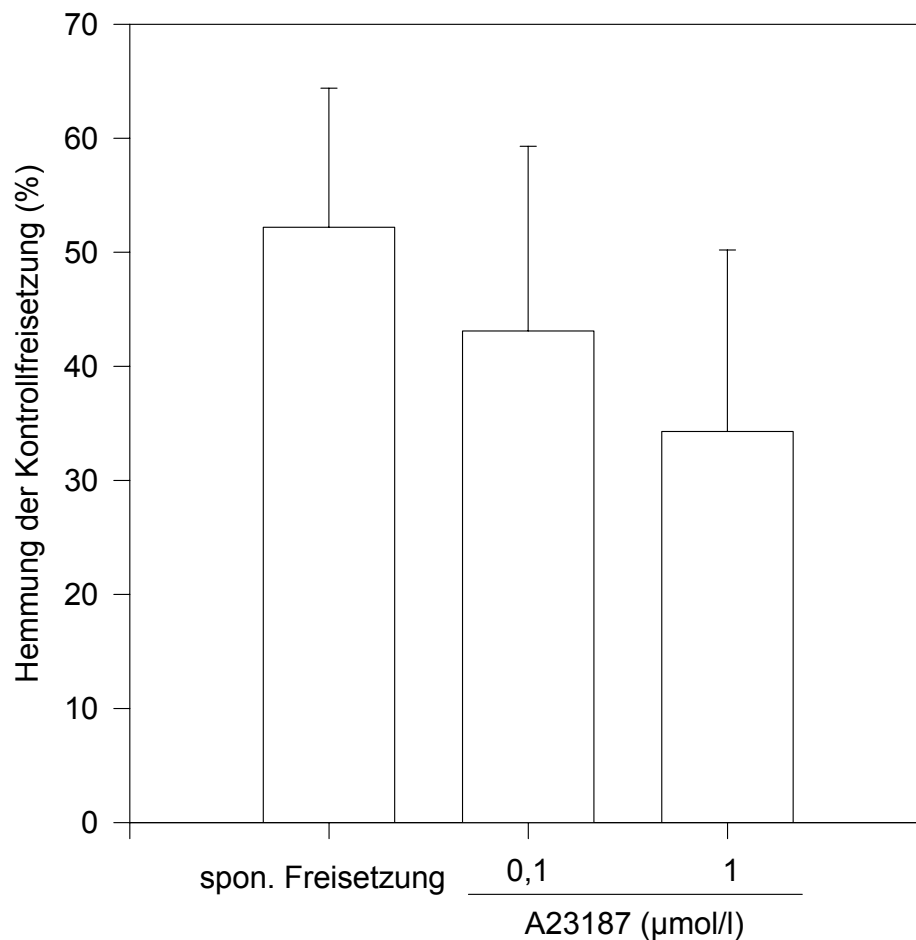


Abbildung 22: Fexofenadin-vermittelte Hemmung der A23187-induzierten ECP-Freisetzung aus eosinophilen Leukozyten. Die Zellen wurden isoliert und mit A23187 vor und 3,5 h nach der Einnahme von Fexofenadin (3 x 180 mg Telfast®) stimuliert, wie im Methodenteil beschrieben. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm SEM für 3 unterschiedliche Blutspender.

Zur Veranschaulichung dieser Experimente sind im folgenden die Rohdaten der einzelnen Versuche einzeln dargestellt:

Experiment 1

A23187 (µmol/l)	Vor Einnahme *	Nach Einnahme*	% Hemmung
0,1	54,0	14,1	73,9
1	107,5	42,0	60,9
Spon**	43,5	11,1	74,5

* Die Ergebnisse zeigen die ECP-Konzentration (µg/l) in den Überständen

** Spontane Freisetzung von ECP (ohne Stimulation mit A23187)

Experiment 2

A23187 (µmol/l)	Vor Einnahme *	Nach Einnahme *	% Hemmung
0,1	34,4	21,9	36,3
1	104,5	98,5	5,8
Spon**	21,2	10,5	49,5

* Die Ergebnisse zeigen die ECP-Konzentration (µg/l) in den Überständen

** Spontane Freisetzung von ECP (ohne Stimulation mit A23187)

Experiment 3

A23187 (µmol/l)	Vor Einnahme *	Nach Einnahme *	% Hemmung
0,1	15,2	12,3	19,1
1	185	118	36,2
Spon**	21,3	14,4	32,4

* Die Ergebnisse zeigen die ECP-Konzentration (µg/l) in den Überständen

** Spontane Freisetzung von ECP (ohne Stimulation mit A23187)

4.4.2 Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten

Auch die basophilen Leukozyten zeigten wie die eosinophilen Leukozyten eine erniedrigte Reagibilität 3,5 Stunden nach der Einnahme von Telfast® Tabletten (3 x 180 mg Fexofenadin), siehe Abbildung 23. Auch die spontane Histaminfreisetzung (ohne Stimulus) wurde durch die Einnahme von Fexofenadin deutlich unterdrückt (Abbildung 24).

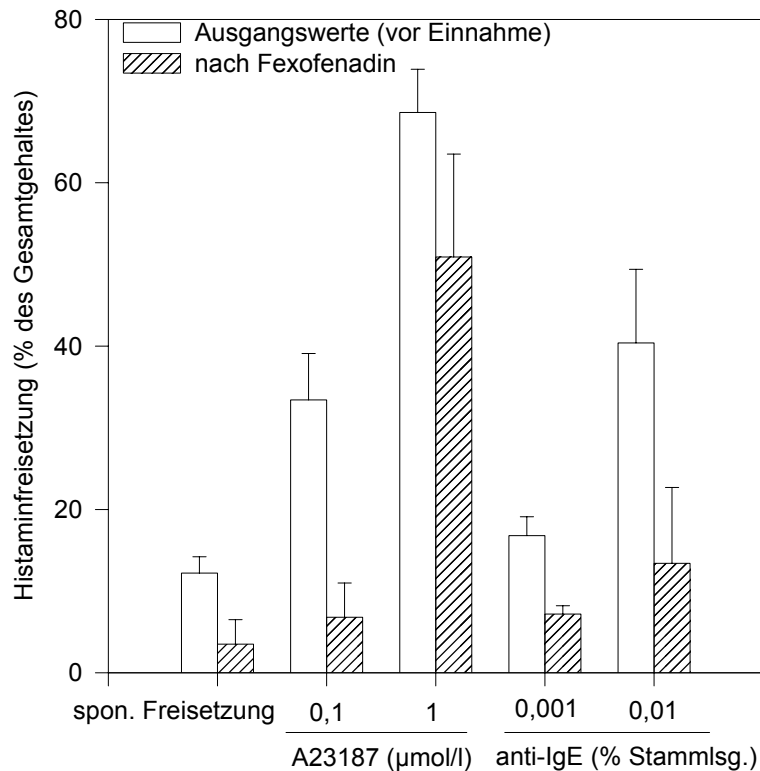


Abbildung 23: Wirkung von Fexofenadin auf die IgE-vermittelte oder A23187-vermittelte Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten. Die Zellen wurden isoliert und mit anti-IgE oder A23187 vor sowie 3,5 h nach der Einnahme von Telfast® (3 x 180 mg Fexofenadin) stimuliert, wie im Methodenteil beschrieben. Die Werte zeigen den Mittelwert \pm SEM für 3 unterschiedliche Blutspender.

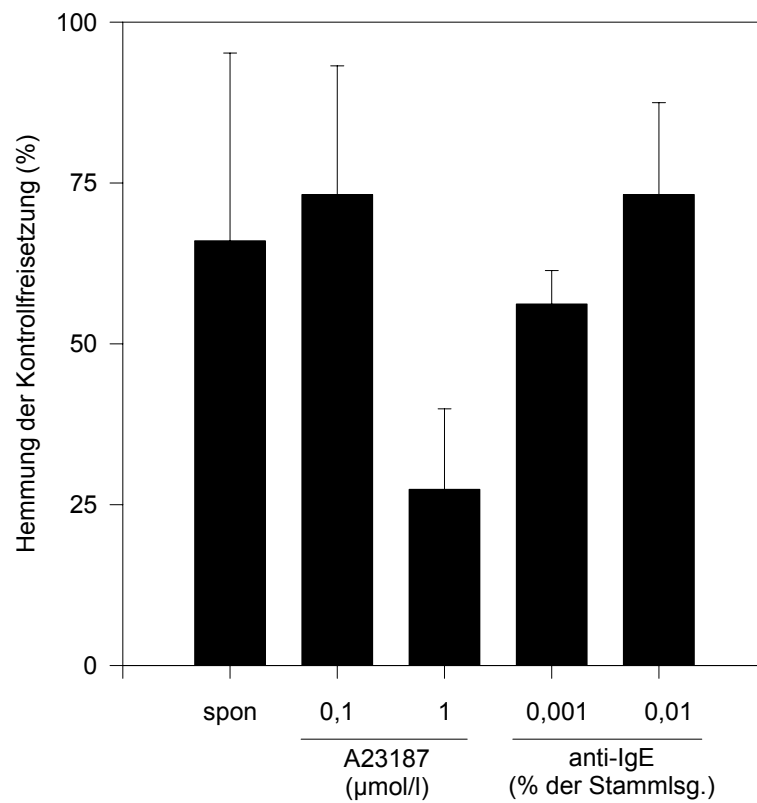


Abbildung 24: Fexofenadin-vermittelte Hemmung der Histamin-Freisetzung aus basophilen Leukozyten, stimuliert mit anti-IgE oder A23187. Die Zellen wurden isoliert und vor sowie 3,5 h nach der Einnahme von Telfast® (3 x 180 mg Fexofenadin) stimuliert, wie in der Abbildung zuvor. Die Werte zeigen den Mittelwert \pm SEM für 3 unterschiedliche Blutspender.

Wie zuvor, sind auch für diese Versuchsserie die Rohdaten der einzelnen Experimente dargestellt:

Experiment 1

anti-IgE (%)	Vor Einnahme *	Nach Einnahme *	% Hemmung
0.001	17,0	9,0	47,1
0,01	57,8	31,8	45,0
A23187 (µmol/l)			
0,1	40,8	5,9	85,5
1	61,4	42,9	30,1
Spon**	16,1	0,0	100,0

* Die Ergebnisse zeigen die prozentuale Histaminfreisetzung am Histamingehalt

** Spontane Freisetzung von Histamin (ohne Stimulation mit anti-IgE oder A23187)

Experiment 2

anti-IgE (%)	Vor Einnahme *	Nach Einnahme *	% Hemmung
0,001	12,6	5,5	56,4
0,01	27,4	2,3	91,6
A23187 (µmol/l)			
0,1	37,1	0,0	100,0
1	65,3	34,2	47,6
Spon**	10,2	1,0	90,2

* Die Ergebnisse zeigen die prozentuale Histaminfreisetzung am Histamingehalt

** Spontane Freisetzung von Histamin (ohne Stimulation mit anti-IgE oder A23187)

Experiment 3

anti-IgE (%)	Vor Einnahme *	Nach Einnahme *	% Hemmung
0,001	20,7	7,2	65,2
0,01	36,0	6,1	83,1
A23187 (µmol/l)			
0,1	22,2	14,6	34,24
1	79,0	75,5	4,4
Spon**	10,3	9,5	7,8

* Die Ergebnisse zeigen die prozentuale Histaminfreisetzung am Histamingehalt

** Spontane Freisetzung von Histamin (ohne Stimulation mit anti-IgE oder A23187)

4.5. Experimente zur Signaltransduktion

4.5.1 Proteinkinase C

Die Genfamilie der PKC Isoenzyme ist verantwortlich für viele unterschiedliche zentrale zelluläre Funktionen [Dekker et al., 1994]. Diese schließen auch biochemische Vorgänge, wie die Aggregation des hochaffinen IgE-Rezeptors auf Mastzellen und Basophile ein [Amon et al., 1996]. Um eine mögliche Wirkung von Fexofenadin auf die Modulation der PKC zu untersuchen, wurde das isolierte Enzym mit unterschiedlichen Konzentrationen von Fexofenadin inkubiert.

Wie in Abbildung 25 gezeigt, konnte die Aktivität des Enzyms *in vitro* durch Fexofenadin nicht signifikant beeinflusst werden.

relative Aktivität (% der Kontrolle)

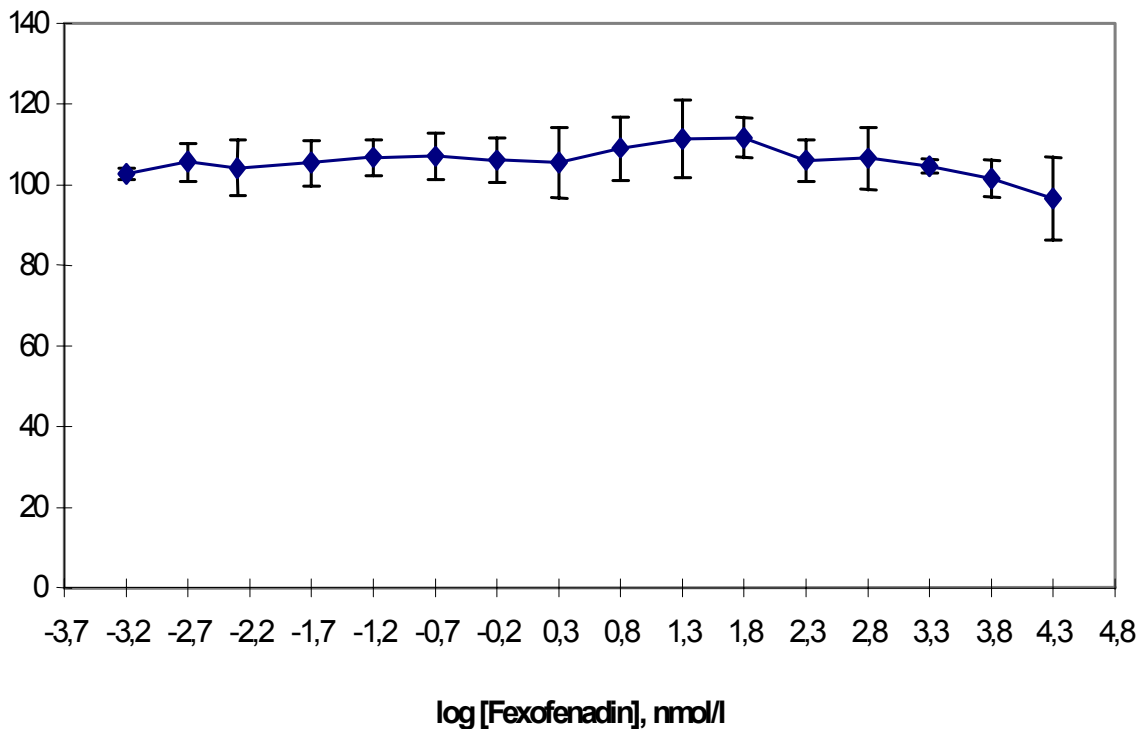


Abbildung 25: Wirkung von Fexofenadin auf isolierte PKC. Das Enzym wurde isoliert und stimuliert, wie im Methodenteil beschrieben. Nach Präinkubation mit Fexofenadin (30 min) wurde die PKC für weitere 30 min mit Histon III (0,5 mg/ml) und Mg-ATP (0,12 mmol/l) inkubiert. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte der relativen Aktivität (% der Kontrolle \pm SEM) für 3 unabhängige Experimente.

Auch durch Variation der relativen Enzymkonzentrationen (Endverdünnungen der Kinase im Test jeweils 1/10, 1/50 und 1/250) konnte keine Hemmung durch Fexofenadin erreicht werden. Effekte in Abhängigkeit von der Aktivierung durch Phospholipid/DAG (Zugabe von 5,06 µg/ml bis 160 µg/ml im Testansatz) ließen ebenfalls keine Wirkung von Fexofenadin erkennen (Daten nicht dargestellt).

4.5.2 cAMP-abhängige Proteinkinase A

Ein hemmender Effekt von Fexofenadin in einem Konzentrationsbereich von 1 pmol/l bis über 30 mmol/l konnte an isolierter PKA nicht beobachtet werden (Daten nicht dargestellt).

4.5.3 src-Tyrosinkinase

Die Ergebnisse der Wirkung von Fexofenadin sind in der Abbildung 26 für n=3 dargestellt. Die Aktivität des Enzyms wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 pmol/l bis über 30 mmol/l durch Fexofenadin *in vitro* nicht beeinflusst.

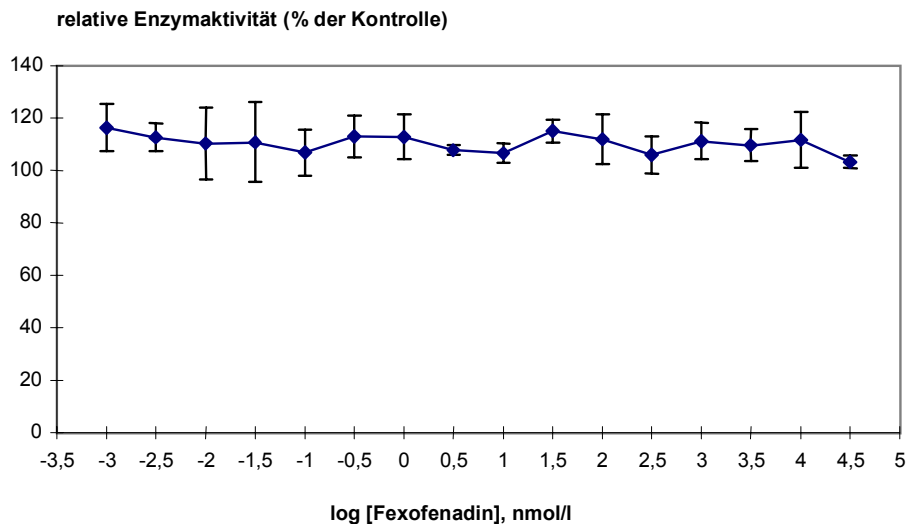


Abbildung 26: Wirkung von Fexofenadin auf die isolierte src-Tyrosinkinase. Als Substrat wurde poly (Tyr:Glu 1:4)_n (0.5mg/ml) mit Mg-ATP 0,12 mM, verwendet. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte ± SEM für 3 unabhängige Experimente (Enzymaktivität als % der Kontrolle).

4.5.4 Tyrosinphosphatase (CD45-Phosphatase)

Eine Hemmung der CD45 Tyrosinphosphatase-Aktivität konnte unabhängig von den Aktivierungsbedingungen nicht beobachtet werden.

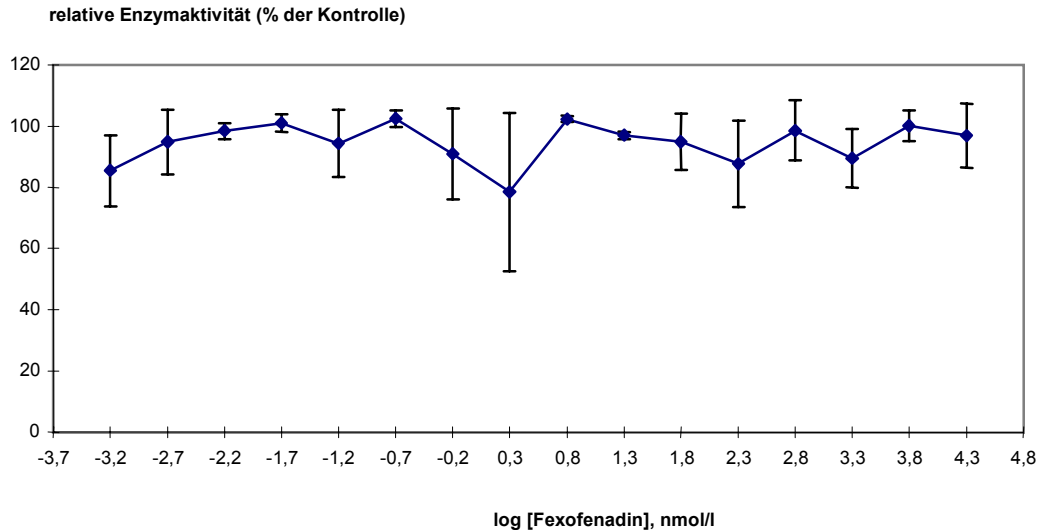
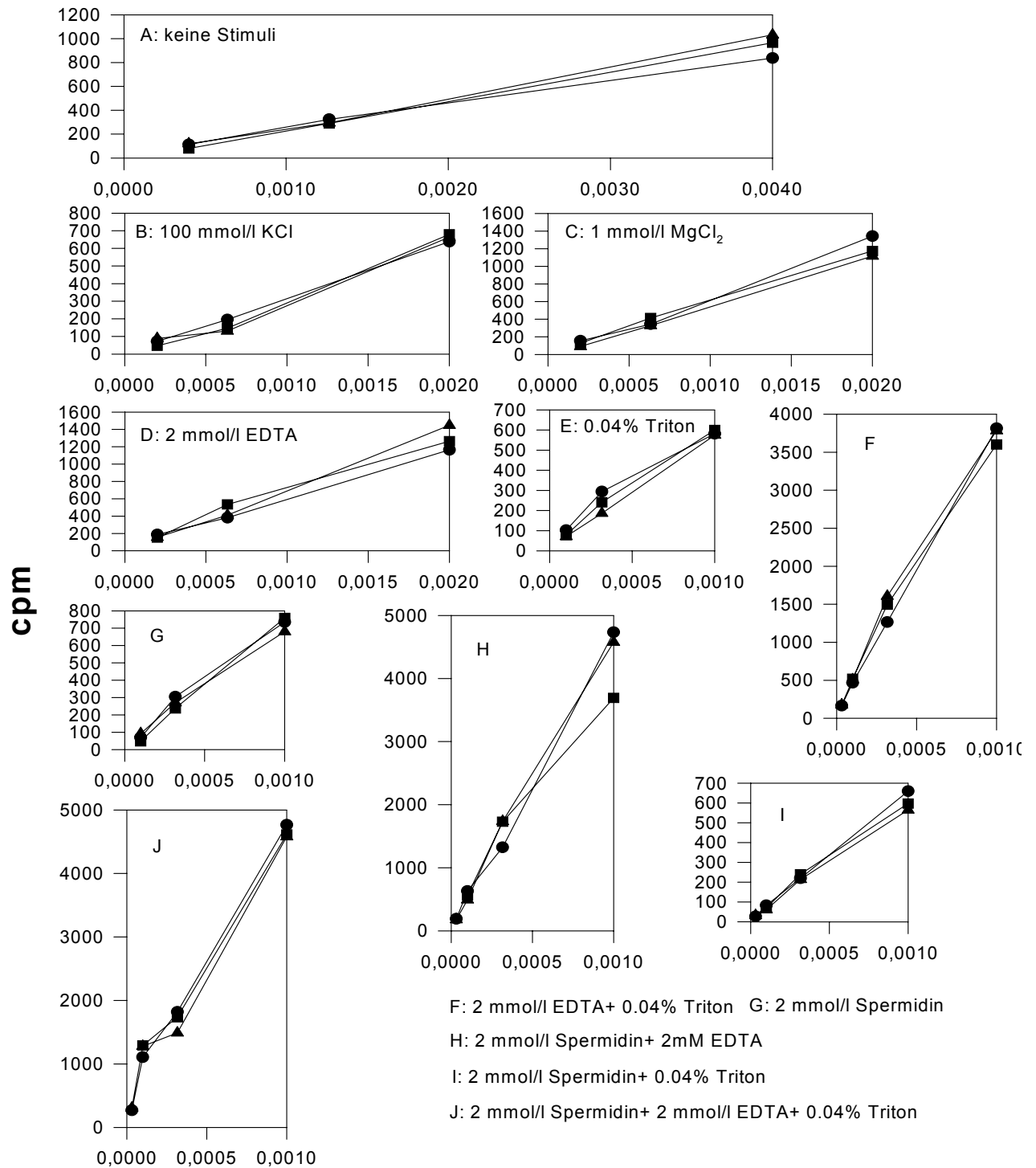


Abbildung 27: Wirkung von Fexofenadin auf die CD45 Tyrosinphosphatase. Das Enzym wurde isoliert und aktiviert, wie im Methodenteil beschrieben. Die Werte zeigen den Mittelwert \pm SEM für 3 unabhängige Experimente (Enzymaktivität als % der Kontrolle).

Da CD45 Tyrosinphosphatase in Abwesenheit von Aktivatoren und/oder Stabilisatoren nur eine geringe Basisaktivität aufweist, wurde der Effekt von Fexofenadin unter verschiedenen Aktivierungsbedingungen untersucht. Die Effektoren (KCl, MgCl₂, EDTA, Triton X-100, Spermidin) wurden dem Verdünnungspuffer in der 2,5-fachen Endkonzentration zugesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt und zeigen, dass eine Hemmung oder Aktivierung durch Fexofenadin in keinem Fall beobachtet werden konnte.



Verdünnung des Enzyms

Abbildung 28: Wirkung von Fexofenadin auf die CD45 Tyrosinophosphatase bei unterschiedlichen Aktivierungsbedingungen. Das Enzym wurde isoliert und unterschiedlich aktiviert, wie im Methodenteil beschrieben.

Kreise: kein Inhibitor

Quadrate: 6,3 nmol/l Fexofenadin

Dreiecke: 63,2 μmol/l Fexofenadin

5. Diskussion

5.1 Wirkung von Fexofenadin auf allergische Effektorzellen

Der Einsatz von H₁-Rezeptorantagonisten hat heute einen unumstrittenen Stellenwert in der Behandlung von histaminvermittelten Erkrankungen [Simons und Simons, 1994, Simons et al., 2001], wie der Rhinitis allergica und der Urtikaria.

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Fexofenadin zählt zu den Antihistaminika der 3. Generation und wurde 1998 als erster Hauptmetabolit eines Antihistaminikums der 2. Generation, Terfenadin, für die Behandlung des Heuschnupfens und der Nesselsucht in Deutschland zugelassen.

Verschiedene Untersuchungen konnten in den vergangenen Jahren zeigen, dass einige neuere Antihistaminika solche antiallergische bzw. antientzündliche Wirkungen *in vivo* und *in vitro* aufweisen, die sich nicht durch die alleinige Blockade des Histamin H₁-Rezeptors erklären lassen [Amon et al., 1992, Ramachers et al., 1996, Simons et al., 1994, Hoffmann et al., 1999, Baroody und Naclerio, 2000].

Für Fexofenadin liegen mittlerweile einige Untersuchungen am Tiermodell, aber auch an humanen Zellen vor, welche diese antiallergischen bzw. antientzündlichen Effekte näher untersucht haben. In der vorliegenden Arbeit wurde dies experimentell vertieft.

5.1.1 Wirkung auf Mastzellen und basophile Leukozyten

Bereits vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass Fexofenadin dosisabhängig und signifikant die Freisetzung von **Histamin** aus Rattenperitonealmastzellen hemmt [Tasaka et al., 1986, Akagi et al., 1987].

Aus basophilen Leukozyten wird die Histaminfreisetzung durch den Terfenadinhauptmetaboliten und andere Derivate von Fexofenadin ebenfalls dosisabhängig inhibiert [Ramachers et al., 1996].

Warner und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Basophile nach Stimulation mit 0,01 % **anti-IgE** 38,0±4,0 % des Gesamthistamingehaltes freisetzen, was sich durch meine Experimente und die anderer Arbeitsgruppen bestätigen ließ [Warner et al., 1989a]. Dieser Effekt folgt konzentrationsabhängig

der Gauß'schen Normalverteilung, was Seagrave und Oliver auf eine Liganden-induzierte Konversion des Rezeptors zurückführen, wodurch die Fortleitung von unkontrollierten transmembranen Signalen bei höheren Antigenkonzentrationen limitiert wird [Seagrave und Oliver, 1990]. Weiterhin werden durch Inkubation der Zellen mit anti-IgE auch nicht-präformierte Mediatoren, wie LTC₄, und Interleukine, wie beispielsweise IL-4, von Basophilen gebildet [Warner et al., 1989b, Gibbs et al., 1996]. Der Prozess der anti-IgE-induzierten Mediatorfreisetzung ist *in vitro* innerhalb von 15 bis 30 Minuten abgeschlossen, was *in vivo* durch klinische Beobachtungen der Typ I-Allergie nach Coombs und Gell bestätigt werden kann [Warner et al., 1989b].

In meinen Experimenten habe ich eine dosisabhängige Hemmung der anti-IgE-induzierten Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten durch Fexofenadin beobachtet. Bei einer Fexofenadin-Konzentration von 0,001 µmol/l wurde bereits eine durchschnittliche Hemmung von 11,2±6,1 % (n=6) der Kontrollfreisetzung gemessen, einer Konzentration, die unter normaler therapeutischer Dosierung im Plasma erreicht wird [Simons et al., 2001]. Eine statistisch signifikante Hemmung der Histaminfreisetzung wurde jedoch nur bei einer Konzentration von über 1 µmol/l erreicht.

Wie ich ferner beobachtet habe, ist Fexofenadin auch in der Lage, die IgE-vermittelte Histaminfreisetzung aus basophilen Leukozyten von atopischen Spendern dosisabhängig zu inhibieren. Auch hier wurde die maximale Hemmung der Kontrollfreisetzung bei einer Fexofenadin-Konzentration von über 1 µmol/l mit 84,6±5,6 % (n=6) erreicht. Diese Wirkung ist um so bedeutsamer als bei der atopischen Dermatitis eine vermehrte (spontane) Freisetzungsfähigkeit (*Releasability*) dieser Zellen nachgewiesen werden konnte [Turner et al., 1989, James et al., 1993]. Die Juckreizlinderung unter Fexofenadin rührt deshalb einerseits von der H₁-Rezeptor-antagonisierenden Wirkung her, und beruht andererseits auf zellregulierenden bzw. zellstabilisierenden Effekten an basophilen Leukozyten.

Eine supprimierende Wirkung von Fexofenadin auf die anti-IgE-induzierte LTC₄-Produktion aus basophilen Leukozyten konnte

jedoch nur bei einer Substanzkonzentration von 10 µmol/l gemessen werden. Geringere Konzentrationen waren im Gegensatz zu der Ausgangssubstanz Terfenadin nur wenig wirksam [Ramachers et al., 1996]. Ein Konzentrationsbereich von 10 µmol/l ist pharmakologisch nicht relevant, da er *in vivo* nicht erreicht wird. Leukotriene sind neben anderen Mediatoren für die Induktion der sogenannten Spätphase-Reaktion verantwortlich, so dass Fexofenadin hier möglicherweise wenig Ansatzpunkte für Zusatzeffekte bietet.

Entgegen der Erwartung wurde die IL-4-Freisetzung basophiler Leukozyten über den Fc_εRI-Rezeptor nicht signifikant moduliert. Es konnte eine maximale Hemmung der IL-4 Produktion von 12 % bei 10⁻⁷ mol/l Fexofenadin erreicht werden. De Paulis und Mitarbeiter fanden eine signifikante Hemmung auch nur bei sehr hohen Konzentrationen im Bereich von 10⁻⁴ mol/l [de Paulis et al., 1999].

IL-4 bewirkt die Synthese der während der Sensibilisierung erforderlichen Proteine (Zytokine, IgE und Chemokine). Es aktiviert die an der allergischen Reaktion beteiligten Zellen und verstärkt auf diese Weise den allergischen Akutzustand. Sowohl IL-4 als auch IL-13 spielen eine entscheidende Rolle bei der IgE-Antikörperproduktion von B-Zellen und bei der Th2-vermittelten Immunantwort und sind daher für die „atopische Antwort“ des Immunsystems bei Rhinitis allergica, Asthma bronchiale und atopischer Dermatitis verantwortlich [Schroeder und MacGlashan, 1997]. Ihre Hemmung könnte für die Behandlung allergischer Erkrankungen neue Therapiewege eröffnen.

Terfenadin war im Gegensatz zu Fexofenadin in der Lage, die IL-4-Produktion bei einer Konzentration von 5x10⁻⁶ mol/l mit annähernd 80 % zu inhibieren [Gibbs et al., 1997].

Das Priming mit Zytokinen wie IL-3, IL-5 und GM-CSF führt zu einer gesteigerten Reaktionsfähigkeit auf Fc_εRI-Rezeptor-gekoppelte Aktivierung der Basophilen [Haak-Fendscho et al., 1988, Kuna et al., 1993, Dahinden et al., 1994]. Nach Vorinkubation der Zellen mit dem Interleukin kommt es zu einer gesteigerten Mediatorfreisetzung [Brunner et al., 1993].

Nach Vorinkubation von basophilen Leukozyten mit dem Zytokin IL-3 zur Verstärkung der Fc_εRI-induzierten Zellaktivität (Priming) konnte in meinen Experimenten die bereits vorher nachgewiesene Inhibition der ungeprimten IgE-vermittelten Mediatorfreisetzung durch Fexofenadin nicht zusätzlich inhibiert werden.

5.1.2 Wirkung auf eosinophile Leukozyten *in vitro*

Foreman und Mitarbeiter konnten schon 1973 zeigen, dass die Inkubation von allergischen Effektorzellen mit dem Kalziumionophor **A23187** eine kalziumabhängige Freisetzung von präformierten Mediatoren induziert [Foreman et al., 1973]. Das durch das Ionophor in die Zelle gebrachte Ion regt vermutlich die Fusion der sekretorischen Granula mit der Plasmamembran an und führt so zum Phänomen der Kalzium-induzierten Exozytose, obwohl ein alleiniger Anstieg der Kalzium-Konzentration nicht als Signal für die vollständige physiologische Antwort der Zelle ausreicht [Katakami et al., 1984]. Zusätzlich kommt es nämlich zu einer Aktivierung der Kalzium-abhängigen biochemischen Schritte in der Aktivierungskaskade mit konsekutiver Stimulation der Proteinkinase C und der Phospholipase C [Yecies et al., 1979]. Dies führt auch zu einer Induktion des Arachidonsäurestoffwechsels mit der Synthese von LTC₄. Neben Mastzellen und basophilen Leukozyten setzen auch neutrophile und eosinophile Leukozyten ihre präformierten und neugenerierten Mediatoren nach Inkubation mit A23187 frei [Weller et al., 1983]. Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums und des Wirkungsmechanismus ist die Stimulation mit Kalzium-ionophor als unspezifischer Reiz für eine Zellaktivierung zu bewerten.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante inhibierende Wirkung von Fexofenadin auf die Aktivierung isolierter eosinophiler Leukozyten *in vitro* nachgewiesen werden: Die mit dem Kalziumionophor **A23187**- induzierte Freisetzung von ECP wurde *in vitro* dosisabhängig, zeitabhängig und irreversibel gehemmt.

Auch in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen von Fexofenadin konnten noch erhebliche inhibitorische Effekte auf

die A23187- induzierte ECP-Freisetzung gemessen werden. Dabei konnte ein zweiphasiger Kurvenverlauf mit einer Sättigung bei einer Fexofenadin-Konzentration von 10^{-9} mol/l in der ersten Phase beobachtet werden

Bei dieser Konzentration wurde eine Hemmung der ECP-Kontrollfreisetzung von etwa 40 % gemessen, wodurch die pharmakologische Relevanz deutlich wird. Bei Effekten, die bei so geringen Wirkstoffkonzentrationen beobachtet werden, kann man von einer spezifischen Wirkung ausgehen. In der zweiten Phase wurden in einem Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-5} mol/l Fexofenadin ebenfalls inhibitorische Effekte gemessen, die aber nur bei der Konzentration von 10^{-5} mol/l hochsignifikant waren und eine etwa 75 %ige Hemmung der Kontrollfreisetzung erreichten. Diese Konzentrationsbereiche sind für eine Wirkung *in vivo* wahrscheinlich nicht bedeutsam.

Die Wirkung von Fexofenadin war in meinen Experimenten irreversibel, es konnte nach Inkubation der Zellen in einem Konzentrationsbereich von 10^{-9} bis 10^{-5} mol/l und nachfolgendem Waschen der Zellen noch eine 50 %ige Hemmung der Kontrollfreisetzung gemessen werden.

Die inhibitorischen Effekte waren zeitabhängig. Sie begannen nach einer Minute mit einem Wert von ca. 17 % Hemmung der ECP-Kontrollfreisetzung und erreichten nach 15 Minuten einen Maximalwert von ca. 55 %, der sich durch Verlängerung der Inkubationszeiten nicht weiter erhöhen ließ.

An Zellen, die zum Zwecke des Primings mit GM-CSF vorinkubiert wurden, konnte durch Fexofenadin der inhibitorische Effekt auf eosinophile Leukozyten nicht verstärkt werden.

Durch andere Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass die spontane Produktion von IL-6 durch Fibroblasten in Gegenwart von Fexofenadin dosisabhängig inhibiert und die Eosinophilenchemotaxis supprimiert wird [Paolieri et al., 1998, Abdelaziz et al., 1998 und 2000].

In eigenen, in dieser Arbeit nicht weiter aufgeführten Experimenten konnte hingegen bei Konzentrationen von 10^{-9} mol/l bis 10^{-6} mol/l keine Hemmung der **Chemotaxis** an neutrophilen und eosinophilen Leukozyten durch Fexofenadin

beobachtet werden. Lediglich Eosinophile wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} mol/l um ca. 50 % bezüglich der chemotaktischen Aktivität inhibiert.

Ein anderer für die Aktivierung eosinophiler Leukozyten interessanter Aspekt wurde von Abdelaziz und Mitarbeitern untersucht. Die durch Eosinophile induzierte inflammatorische Aktivität nasaler Epithelzellen wurde durch Fexofenadin dosisabhängig bezüglich der Freisetzung von IL-8, GM-CSF und löslichem Interzellulärem Adhäsionsmolekül (ICAM)-1 gehemmt [Abdelaziz et al., 1998].

5.1.3 Wirkung auf eosinophile und basophile Leukozyten *in vivo*

Sehr interessante Ergebnisse wurden in den *Ex vivo-in vitro*-Experimenten erhalten, welche die vorher beschriebenen *In vitro*-Versuche bestätigen. Die orale Einnahme von Telfast® 180 (3 Tabletten, entspricht 3 x 180 mg Fexofenadin) unterdrückte die zelluläre Aktivität von basophilen und eosinophilen Leukozyten, gemessen an der Histamin- und ECP-Freisetzung. Wurden die Zellen über den Fc ϵ RI-Rezeptor oder über den Kalziumeinstrom mit A23187 stimuliert, konnte die zelluläre Aktivität durch die Einnahme um bis zu 50 % gegenüber den Ausgangswerten inhibiert werden. Auch die spontane Mediatorfreisetzung von ECP wurde um mehr als 50 % reduziert verglichen mit dem Ausgangswert. Diese Effekte wurden in allen unabhängigen Einzelexperimenten beobachtet und unterstreichen die antientzündliche und antiallergische Wirksamkeit von Fexofenadin. Sie sind ein Beweis für die direkte Wirkung der Substanz an beiden Zellpopulationen. Da sowohl eosinophile als auch basophile Leukozyten keine H $_1$ -Rezeptoren exprimieren, handelt es sich um H $_1$ -unabhängige Effekte.

Erstmals konnte in der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass zuvor *in vitro* beobachtete antiallergische/antientzündliche Effekte von Fexofenadin auch *in vivo* an den allergischen Effektorzellen direkt wirksam werden. Nach der Kenntnis der pharmakologischen und der selbst erarbeiteten Daten wirkt Fexofenadin schnell und effizient supprimierend auf die Aktivierung eosinophiler und basophiler Leukozyten.

5.2 Vergleich zu anderen modernen H₁-Rezeptorenblockern

In Tabelle 9 sind die wichtigsten *In vitro*-Daten zu Untersuchungen anderer ausgewählter H₁-Rezeptorblocker dargestellt.

Tabelle 9: Direkte antiallergische und antientzündliche Effekte von ausgewählten H₁-Rezeptorantagonisten an humanen Mastzellen und Basophilen *in vitro*

HRA	Zellpopulation	Mediator	Stimulus	IC ₅₀ -Wert (µmol/l) ^a	Referenz
Cetirizin	Basophile Hautmastzellen Hautmastzellen	Histamin Histamin IL-3, -6, -8, GM-CSF, TNF-α	anti-IgE anti-IgE A23187	kein Effekt bis 100 µmol/l kein Effekt bis 100 µmol/l bis zu 29 % Hemmung bei 1 nmol/l	Togias et al., 1989 Okayama und Church, 1993 Lippert et al., 2000
	Basophile	Histamin IL-4, IL-13	anti-IgE anti-IgE	kein Effekt Potenzierung	Gibbs et al., 1997
Levocetirizin	Keine Untersuchungen publiziert				
Loratadin	Lungenmastzellen	Histamin	Antigen	50	Peters, 1991 Lau und Pearce, 1986 Miadonna et al., 1994 Genovese et al., 1997 Peters, 1991
		Histamin	Antigen	15	
		Histamin	Antigen	30	
Histamin		FMLP	29		
Histamin		A23187	24		
Histamin		Antigen	IC ₄₀ ~20 µmol/l		
PGD ₂		Antigen	Hemmung		
LTC ₄	Antigen	Hemmung			
LTC ₄	Antigen	10			
LTC ₄	A23187	10			
Hautmastzellen	Hautmastzellen	Histamin	Antigen	20-90 % bei 10 bis 1000 µmol/l	Genovese et al., 1997
		PGD ₂	Antigen	Hemmung bei >100 µmol/l	
		LTC ₄	Antigen	Hemmung	
Basophile	Basophile	Histamin	Antigen	60 % bei 45 µmol/l	Berthon et al., 1994 Bousquet et al., 1988 Ramachers et al., 1994
		Histamin	Antigen	Hemmung	
		LTC ₄	Antigen	90 % bei 100 µmol/l	
Descarbo-ethoxyloratadin	Basophile	Histamin	Antigen	60 % bei 16 µmol/l	Berthon et al., 1994 Kleine-Tebbe et al., 1994
		Antigen	IC ₃₀ -Wert=8,2 µmol/l		
		A23187	IC ₃₀ -Wert=11,1 µmol/l		
		Con A	IC ₃₀ -Wert=4,8 µmol/l		
		FMLP	IC ₃₀ -Wert=60,2 µmol/l		
	Hautmastzellen	Hautmastzellen	TPA	IC ₃₀ -Wert=27,6 µmol/l	
			Histamin	Antigen	40-50 % Hemmung bei 3x10 ⁻⁵ mol/l
			PGD ₂	Antigen	
	Lungenmastzellen	Lungenmastzellen	Tryptase	Antigen	
			IL-6, IL-8	A23187	signifikant bei 10 µmol/l
Lungenmastzellen	Lungenmastzellen	Histamin	Antigen	50 % bei 100 µmol/l	Lippert et al., 1995 Genovese et al., 1997
		Tryptase	Antigen	59 % bei 100 µmol/l	
		LTC ₄	Antigen	70 % bei 100 µmol/l	
		PGD ₂	Antigen	62 % bei 100 µmol/l	

Tabelle 9 (Fortsetzung): Direkte antiallergische und antientzündliche Effekte von ausgewählten H₁-Rezeptorantagonisten an humanen Mastzellen und Basophilen *in vitro*

HRA	Zellpopulation	Mediator	Stimulus	IC ₅₀ -Wert (µmol/l) ^a	Referenz
Terfenadin	Lungenmastzellen	Histamin	Antigen	keine Wirkung	Campbell und Bousquet, 1993
		Histamin		45 % bei 10 µmol/l	Massey et al, 1993
		PGD ₂		56,0±13,1 % bei 10 µmol/l	Campbell und Bousquet, 1993
		PGD ₂		25 % bei 10 µmol/l	Massey et al, 1993
		LTC ₄ /D ₄		52,5±26, 8% bei 10 µmol/l	Campbell und Bousquet, 1993
		LTC ₄		80 % bei 10 µmol/l	Massey et al, 1993
		Histamin		keine Wirkung	Campbell et al., 1993
		PGD ₂		56 % bei 10 µmol/l	
	LTC ₄ /LTD ₄		52,5 % bei 10 µmol/l		
	Hautmastzellen	Histamin	Antigen	keine Wirkung	Massey et al., 1993
		PGD ₂		20 % bei 10 µmol/l	
		Histamin	A23187	Hemmung	Ramachers et al., 1996
	Basophile	Histamin	Antigen	Hemmung	
		Histamin	Antigen	57 % bei 10 µmol/l	Nabe et al., 1989
		Histamin	Antigen	45 % bei 100 µmol/l	Massey et al., 1993
Histamin		A23187	40 % bei 20 µmol/l	Nabe et al., 1989	
LTC ₄		Antigen	100 % bei 100 µmol/l	Massey et al., 1993	
Histamin		Antigen	44,5 % bei 100 µmol/l	Ramachers et al., 1996	
		Con A	67,9 % bei 100 µmol/l		
		Gräserpollen	44,0 % bei 100 µmol/l		
LTC ₄		n	95 % bei 100 µmol/l		
Histamin		Antigen	60 % bei 100 µmol/l	Gibbs et al., 1997	
IL-4, IL-13	Antigen	100 % bei 100 µmol/l			
	Antigen				

^a Sofern kein IC₅₀-Wert angegeben ist, wurde die inhibitorische Aktivität als maximale Hemmung (in %) bei der angegebenen Konzentration des Histaminrezeptorantagonisten dargestellt. Abkürzungen: HRA: Histaminrezeptorantagonist; IL: Interleukin; TNF: Tumor necrosis factor; GM-CSF: Granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor; PG: Prostaglandin; LT: Leukotrien; FMLP: Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin; Con A: Concanavalin A; TPA: 12-o-Tetradecanoly-phorbol-13-acetat

Auch für andere Antihistaminika konnten multiple antiallergische/antiinflammatorische Eigenschaften festgestellt werden. So ist Loratadin beispielsweise auch in der Lage, die Histamin- und LTC₄-Freisetzung aus Mastzellen und Basophilen zu hemmen. Eine Reduktion der Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, P-Selektin) und Interleukinen (IL-6 und IL-8) wurde ebenfalls beobachtet [Hoffmann et al., 1999]. Bousquet et al. zeigten auch *in vivo* nach oraler Gabe von Loratadin eine Hemmung der Histamin- und PGD₂-Konzentration im Nasensekret nach nasaler Allergenprovokation [Bousquet et al., 1988].

Loratadin wirkt auch auf eosinophile Leukozyten. Bei *In vitro*-Experimenten wurde die PAF-induzierte Eosinophilenchemotaxis sowie die Superoxidanionen-Produktion signifikant reduziert. Die ECP-Freisetzung hingegen wurde im Gegensatz zu Fexofenadin nicht beeinflusst [Eda et al., 1993].

Auch Descarboethoxyloratadin, kurz Desloratadin, als primärer Metabolit des Loratadin ebenfalls zur Behandlung der allergischen Rhinitis und der Urtikaria in Deutschland zugelassen, zeigt zusätzliche antiallergische Eigenschaften bei *In vitro*-Studien. Dabei ist besonders die Hemmung der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-4, IL-6, IL-8 und IL-13 zu erwähnen, welche für die Entstehung von nasaler Obstruktion, Entzündung, Rötung und Juckreiz verantwortlich sind [Lippert et al., 2000]. Auch die Antigen-induzierte Histamin-Freisetzung aus Leukozyten konnte in einem Bereich zwischen 0,1 µmol/l und 50 µmol/l durchgehend dosisabhängig inhibiert werden [Kleine-Tebbe et al., 1994].

Auch an anderen nicht allergischen Effektorzellen (z.B. nasalen und bronchialen Epithelzellen, Endothelzellen, Keratinozyten) konnte eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen durch Loratadin und Desloratadin nachgewiesen werden [Bousquet et al., 1995]. Fexofenadin zeigt auf die basale und Interferon- α induzierte Expression von ICAM-1 durch kultivierte menschliche Konjunktivazellen – wichtige Zielzellen der allergischen Konjunktivitis – hemmende Effekte [Paolieri et al., 1998].

5.3 Wirkungsweise von H₁-Rezeptorantagonisten an antiallergischen Zellen

In vitro-Studien konnten signifikante Effekte von Fexofenadin häufig nur in höchsten Konzentrationsbereichen von Fexofenadin, im Bereich von 10 bis 100 µmol/l, zeigen [Abdelaziz et al., 2000]. Einige Autoren vermuteten, dass das Fehlen signifikanter Effekte von Fexofenadin in niedrigen Konzentrationsbereichen eine mögliche Konsequenz der geringen Löslichkeit der Substanz bei einem pH-Wert von 7,4 sei [Hoffmann et al., 1999].

Die Konzentration der H₁-Antihistaminika in der Haut/im Gewebe und im Plasma ist abhängig von physikochemischen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Lipophilie, Hydrophilie), pharmakologischer Aktivität, Dosierung und der Zeit. Simons und Mitarbeiter konnten in einer Studie zeigen, dass die Konzentration von Fexofenadin nach oraler Gabe von 120 mg in der Haut über einen Zeitraum von 168 Stunden (steady-state) höher war als die Konzentration im Plasma. Die maximale Konzentration wurde nach etwa 9 Stunden mit ca. 500 ng/ml in der Haut und 100 ng/ml im Plasma erreicht [Simons und Simons 1994, Simons et al., 2001].

Bezüglich des Wirkungsmechanismus antiallergischer/antientzündlicher „Zusatzwirkungen“ von Antihistaminika wird vermutet, dass sich die lipophilen Anteile der Substanzen in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran einlagern und so eine Stabilisierung der Membranstrukturen bewirken. Dafür spricht auch die häufig nachgewiesene Supprimierung des Arachidonsäuremetabolismus durch neuere H₁-Rezeptorenblocker [Amon et al., 1993, Ramachers et al., 1996, Baroody et al., 2000]. Ramachers und Mitarbeiter konnten eine Korrelation zwischen der Lipophilie der Substanzen und der antiallergischen Wirksamkeit feststellen. Je lipophiler die Testsubstanzen waren, desto größere inhibitorische Effekte auf die Mediatorfreisetzung konnten gemessen werden [Ramachers et al., 1996].

Für Membraneffekte sprechen auch meine Experimente zur Reversibilität. Nach Entfernung von Fexofenadin aus dem Versuchsansatz wurde eine Hemmung der ECP-Freisetzung beobachtet, die fast ebenso hoch war wie die von stimulierten Zellen, in Gegenwart des Inhibitors (ca. 50 %).

Biologische Membranen werden heute wohl am besten durch das „fluid-mosaic-model“ von Singer und Nicolson [Singer und Nicolson, 1972] beschrieben. Nach diesem Modell befinden sich die Lipidphasen der Membran in einem „flüssig-kristallinen“ Zustand, d.h. die Lipidmoleküle, in der Hauptsache Phospholipide, sind sorgfältig geordnet, können aber hin- und herdiffundieren. Die am häufigsten vorkommenden

Phospholipide sind Phosphatidylethanolamin (Cephalin), Phosphatidylcholin (Lecitin), Phosphatidylserin und Phosphatidylinosit. Alle besitzen bei pH 7 eine negative Ladung an der Phosphatgruppe, zusätzlich kann die R-Gruppe eine oder mehrere elektrische Ladungen beisteuern. Diese Lipide haben weiter die Eigenschaft kationische und anionische dynamische Domänen zu bilden, die wandern können und damit zur Fluidität der Membran beitragen [Weiming et al., 1996, Parasassi et al., 1999, Bagatolli und Gratton, 2000]. Hier wäre eine mögliche Ansatzstelle für das Zwitterion Fexofenadin, das mit kationischen oder anionischen Domänen in Wechselwirkung treten kann, denkbar. Durch die elektrostatischen Wechselwirkungen könnte es zu einer Abnahme der Fluidität und einer Zunahme der Rigidität der Membran kommen. Dies wiederum hätte dann eine Erschwerung des Exozytose-Vorgangs zur Folge, die bis zur totalen Blockade der Exozytose und damit der Mediatorausschleusung reichen könnte.

Als weitere Erklärung der Prävention der Mediatorfreisetzung wird eine Beeinflussung des Kalziumeinstroms in die Zelle oder auch der Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern vermutet [Tasaka et al., 1993].

An der chemischen Struktur von Fexofenadin fällt auf, dass es sich um ein Zwitterion mit asymmetrischem Kohlenstoff-Atom handelt, das sowohl eine basische Amino- als auch eine saure Carboxylgruppe besitzt (siehe Abbildung 29). Wechselwirkungen mit lipophilen Teilen im Inneren der Membran kommen daher eher nicht in Frage, wahrscheinlicher ist eine Wechselwirkung mit Kalziumkanälen und damit ein verminderter Einstrom von Kalzium in die Zelle.

Wie man in Abbildung 29 erkennt, sind a und b chemisch verwandt. Sie besitzen zwitterionische Struktur und a enthält zusätzlich ein asymmetrisches C-Atom. Das Präparat Telfast® stellt ein racemisches Gemisch aus dem R- und S-Enantiomer von Fexofenadin dar, wobei beide Formen pharmakologisch aktiv sind. Die Struktur von c unterscheidet sich deutlich von a und b. Es besitzt schwach basische Eigenschaften.

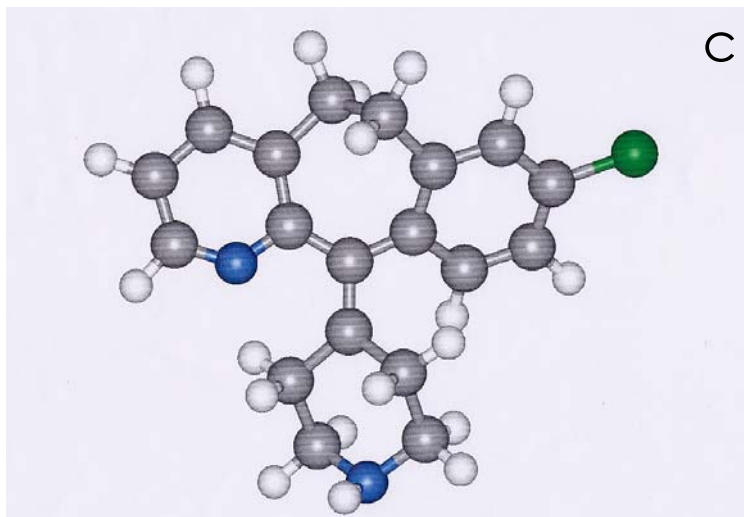
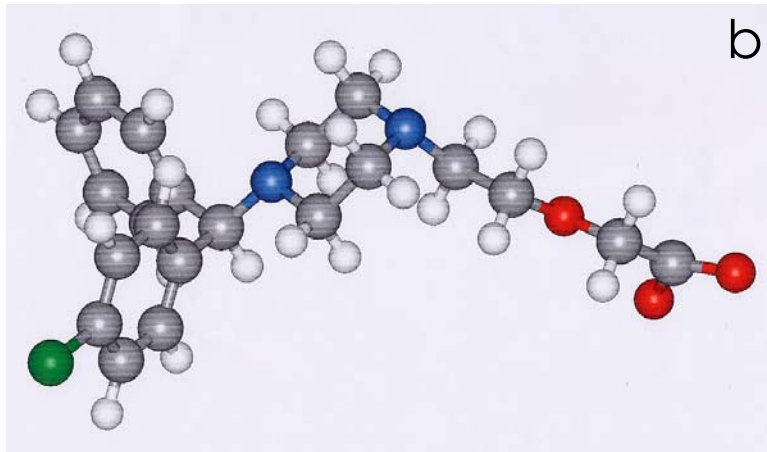
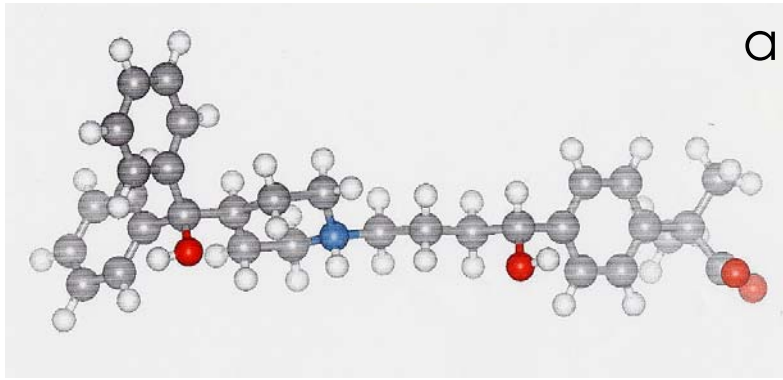


Abbildung 29: Strukturformeln von R-Fexofenadin **(a)**, Levocetirizin **(b)** und Desloratadin **(c)**

grün: Chlorid, blau: Stickstoff, rot: Sauerstoff, schwarz: Kohlenstoff, grau: Wasserstoff

5.4 Interaktion von Fexofenadin mit der Signaltransduktion

Die rezeptorvermittelte Aktivierung von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Leukozyten setzt eine Kaskade biochemischer Signale in Gang, die in ihrer Gesamtheit als Signaltransduktion bezeichnet wird. Die Aufklärung der einzelnen Elemente dieser Kaskade ist ein vordringliches Ziel für ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der Zellaktivierung. Die Kenntnis der Mechanismen ist wiederum Voraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bei Erkrankungen, die durch Mediatoren der genannten Zellen vermittelt werden. Nach dem jetzigen Kenntnisstand laufen nach Aktivierung des hochaffinen IgE-Rezeptors folgende Schritte ab, die in der Abbildung 30 vereinfacht und schematisch dargestellt sind:

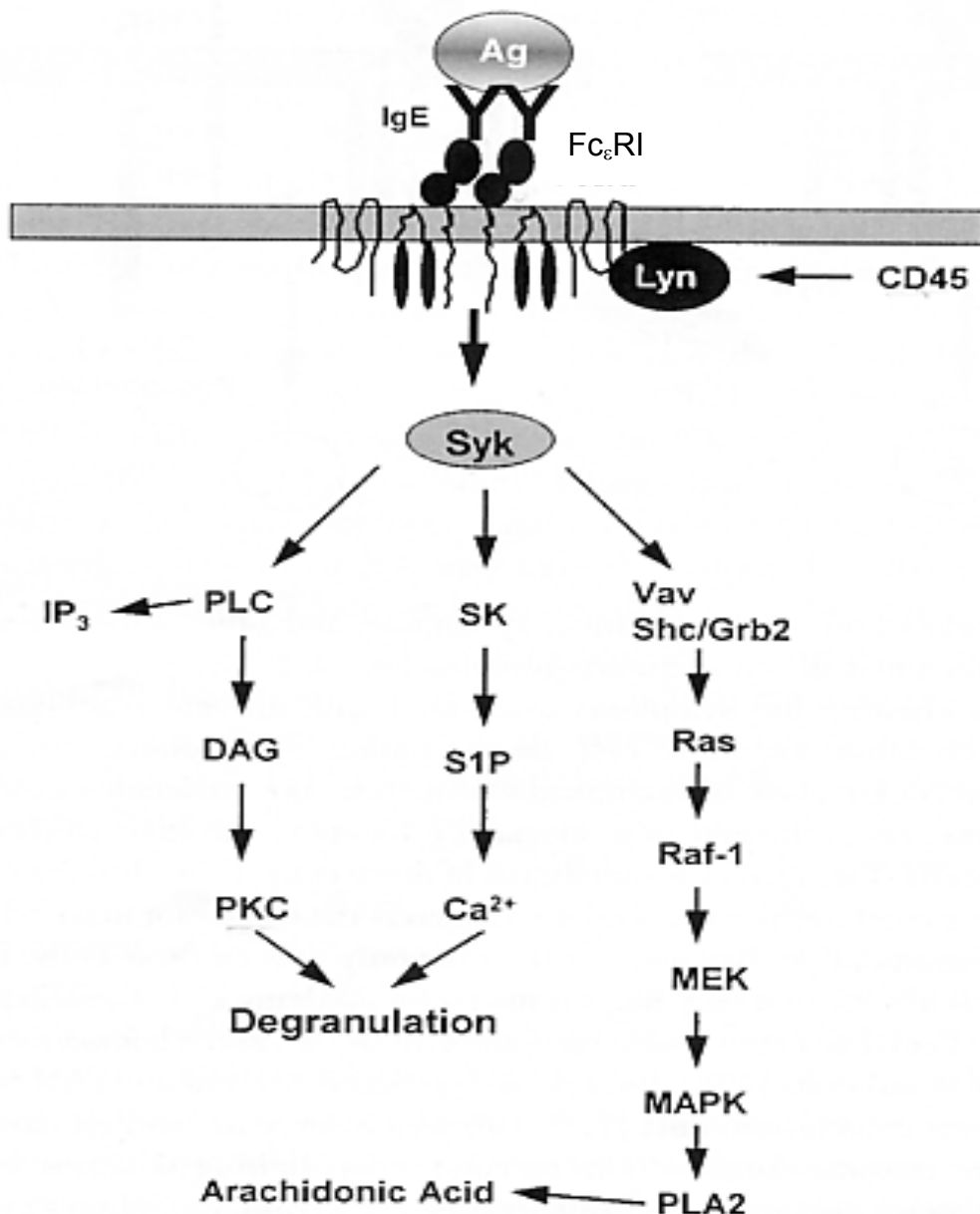


Abbildung 30: Signaltransduktion nach Sanchez – Mejorada et al., 1998. Abkürzungen: Ag: Antigen, Fc_εRI: hochaffiner IgE-Rezeptor; Lyn: Tyrosinkinase; Syk: Tyrosinkinase; CD45: Tyrosinphosphatase; IP₃: Inositol-1,4,5 triphosphat; PLC: Phospholipase C; DAG: Diacylglycerol; PKC: Proteinkinase C; SK: Sphingosinkinase; S1P: Sphingosin-1-Phosphat; Vav, Shc/Grb2: Adapterproteine; Ras: G-Protein; MAPK: *mitogen activated protein kinase*; PLA₂: Phospholipase A₂; Raf-1 und MEK: Serin/Threonin-Kinasen

Für Mastzellen und Basophile sind diese Vorgänge mittlerweile relativ gut erforscht. Essentieller und erster Schritt ist die Aktivierung von Tyrosinkinasen: IgE-Moleküle binden an Fc_ε-Rezeptoren an der Membran. Dieser Rezeptor ist aus vier Untereinheiten aufgebaut, nämlich einer α-, einer β- und zwei γ-Ketten [Hamawy et al., 1994]. Lyn, eine Tyrosinkinase, ist mit der β-Kette des inaktiven Rezeptors assoziiert [Sanchez-Mejorada et al., 1998]. Bei Vernetzung des Rezeptors unter Einwirkung eines Antigens wird Lyn aktiviert und phosphoryliert die β- und γ-Ketten des Rezeptors unter regulatorischem Einfluss einer Tyrosinphosphatase (CD45) [Scharenberg et al., 1994]. Syk, eine weitere Tyrosinkinase, bindet an die phosphorylierte γ-Untereinheit des Rezeptors und wird dadurch aktiviert. Syk führt über die Aktivierung verschiedener Zwischenstufen (zuletzt der Phospholipase A₂) zur Freisetzung von Arachidonsäure, dem Ausgangsprodukt der Leukotriene und weiterer Arachidonsäuremetaboliten [Ozawa et al., 1993 a und b].

Die Phospholipase C wird ebenfalls durch Syk phosphoryliert und katalysiert dann die Bildung von Diacylglycerol und die Aktivierung der PKC, die an der Freisetzung der sekretorischen histaminhaltigen Granula beteiligt ist [Schwartz et al., 1993]. Die Degranulation kann schließlich noch über eine Aktivierung der Sphingosinkinase erfolgen (Phosphorylierung durch Syk), welche letztlich zur Bildung des *Second messengers* Sphingosin 1-P und damit zur Freisetzung von Ca²⁺ führt [Farago et al., 1990].

Die Rolle der cAMP abhängigen Proteinkinase A für die Aktivierung von Mastzellen und basophilen Leukozyten (und möglicherweise auch degranulierender eosinophiler Leukozyten) ergibt sich schließlich aus einer weiteren Signalkaskade, die

infolge einer Erhöhung des cAMP-Spiegels und damit Aktivierung dieses Enzyms zu einer Phosphorylierung des Myosins führt, das an dem Prozess der Degranulation beteiligt ist [Azzi et al., 1992]. Die Aktivierung der Adenylatcyclase wird durch ein Guaninnukleotid-bindendes Protein (G-Protein) vermittelt [Benhamou et al., 1992].

Wie meine Untersuchungen zu diesem Themenkreis gezeigt haben, beeinflusst Fexofenadin die Aktivität von PKC, PKA, src-Tyrosinkinase und CD45-Tyrosinphosphatase in den Konzentrationen von 2 pmol/l bis zu 200 µmol/l nicht. Die Variablen Inkubationszeit und Substratkonzentration hatten keinen modulierenden Effekt auf diese Versuche. Auch wenn die untersuchten und für den Degranulationsvorgang zentral bedeutsamen Signaltransduktionselemente nicht durch Fexofenadin beeinflusst werden, lässt sich nicht mit Sicherheit ausschließen, dass die Substanz nicht andere Abschnitte der Stimulus-Sekretions-Kaskade (unspezifisch) inhibiert und dadurch zumindest partiell die Hemmung der Mediatorfreisetzung erklärt [Noll et al., 1997].

5.5 Klinische Relevanz der Beobachtungen

Die Bewertung der *In vitro*-Ergebnisse lässt per se keine direkte Übertragung auf die *In vivo*-Modelle allergischer Reaktionen (nasale Provokation, Hautkammertest) zu. Die Tabelle 10 gibt einen Überblick zu antiallergischen *In vivo*-Effekten ausgewählter H₁-Rezeptorantagonisten.

Zur Beantwortung der Frage nach der klinischen Relevanz muss man sich nochmals die Größenordnung der Plasmaspiegel dieser Substanz vor Augen führen.

Oral verabreicht wird Fexofenadin gut resorbiert. Die Spitzenplasmawerte werden 1 bis 3 Stunden nach der Verabreichung erreicht und betragen bis zu 325 ng/ml. Die Bioverfügbarkeit von Fexofenadin beträgt mindestens 33 % [Literatur in Produktmonographie Telfast®, Hoechst Marion Roussel, 1998]. Es wird andererseits rasch aus dem Gewebe eliminiert. Die mittlere Verweildauer betrug nach einer intravenösen Injektion 3,2 bis 7,6 Stunden. Davon wurden ca. 80 % in den Faeces und 12 % im Urin in unveränderter Form

wiedergefunden [Lippert et al., 1995]. Kleine Mengen des Methylesters von Fexofenadin und des inaktiven Abbauproduktes Azacyclonol waren die einzigen Metaboliten, die im Urin bzw. in den Faeces gefunden wurden. Daraus lässt sich folgern, dass der Mensch die Substanz primär biliär und renal ausscheidet und dass keine Hinweise auf eine signifikante Biotransformation vorliegen [Produktmonographie Telfast[®], 1998]. Die Serumspiegel nach oraler Gabe von Cetirizin (10 mg), Loratadin (10 mg) bzw. Terfenadin (60 mg) betragen jeweils in *steady state* etwa $0,7 \times 10^{-6}$ mol/l (300 ng/ml), $1,8 \times 10^{-8}$ mol/l (4-7 ng/ml) bzw. $4,2 \times 10^{-9}$ mol/l (1-2 ng/ml) [Ramachers et al., 1995]. Die zur Induktion signifikanter Effekte notwendigen Konzentrationen von Fexofenadin lagen in meiner Arbeit für Basophile im mikromolaren Bereich, während bei Eosinophilen bereits im picomolaren Bereich Effekte gemessen werden konnten.

Hohe lokale Wirkstoffkonzentrationen werden z.B. in der Nasenschleimhaut durch topische Applikation erreicht und verdeutlichen so den Einsatzbereich bei allergischer Rhinitis. Die gute Wirksamkeit auf Eosinophile lässt einen Einsatz bei allergischem Asthma bronchiale sinnvoll erscheinen, da hierbei eine ausgeprägte Beteiligung dieses Zelltyps für die Pathophysiologie dieser Erkrankung bewiesen ist. Klinische Studien zur Wirksamkeit von Fexofenadin bei Asthma sind derzeit in Bearbeitung [Dr. Höhler, persönliche Mitteilung, Oktober 2001].

Tabelle 10: Effekte von vier ausgewählten H₁-Rezeptorantagonisten auf die Mediatorfreisetzung nach nasaler oder kutaner Allergenexposition bei Atopikern *in vivo*

HRA	Methode	Applikation und Dosis des HRA ^a	Parameter	Ergebnis	Referenz
Cetirizin	nasale Provokation	peroral, 20mg	Histamin LTC ₄	keine Wirkung Hemmung	Togias et al., 1989
		peroral, 20 mg	Histamin PGD ₂ LTC ₄	keine Wirkung keine Wirkung Hemmung	Baroody et al., 1989
		peroral, 20 mg	Histamin PGD ₂ LTC ₄	keine Wirkung keine Wirkung Hemmung	Naclerio et al., 1989
		peroral	Histamin	keine Wirkung	Bousquet et al., 1992
		peroral, 20 mg	Histamin LTC ₄	keine Wirkung Hemmung	Naclerio, 1993a
		peroral, 20 mg	Histamin PGD ₂ LTC ₄	keine Wirkung keine Wirkung Hemmung	Naclerio, 1993b
	Hautkammertest	peroral	Histamin PGD ₂	keine Wirkung Hemmung	Charlesworth et al., 1989
		peroral, 20 mg	Histamin PGD ₂	Histamin in der Spätphase der LPR ^b keine Wirkung	Michel et al., 1989
		peroral, 10 mg	Histamin PGD ₂	Hemmung Hemmung	Michel et al., 1987
		peroral	Histamin	Hemmung	Michel et al., 1988
		peroral, 20 mg	Histamin PGD ₂ LTC ₄	Hemmung keine Wirkung keine Wirkung	Dorsch et al., 1989
Levo-cetirizin	nasale Provokation	Peroral, 5 mg	Histamin	Hemmung	Wang et al., 2001
Loratadin	nasale Provokation	Peroral	Histamin PGD ₂	Hemmung Hemmung	Bousquet et al., 1988
		intranasal	Histamin	Hemmung	Baumgarten et al., 1990
		peroral, 10 mg	Histamin PGD ₂ LTC ₄	keine Wirkung keine Wirkung keine Wirkung	Naclerio, 1993b
		peroral, 10 mg	Histamin PGD ₂	Hemmung Hemmung	Bousquet et al., 1988
		peroral, 10 mg	Histamin	Hemmung	Andersson et al., 1991
Desloratadin	keine Untersuchungen publiziert				
Terfenadin	nasale Provokation	peroral, 120 mg	Histamin PGD ₂	Hemmung Hemmung	Bousquet et al., 1988
		peroral, 60-300 mg	Histamin	Hemmung	Naclerio et al., 1990
		peroral, 60-300 mg	Histamin LTC ₄	Hemmung Hemmung	Togias et al., 1989
		peroral, 60 mg peroral, 300 mg	Histamin	Hemmung Hemmung	Jankowski et al., 1993
		peroral, 60 mg	Histamin	Hemmung	Wagenmann et al., 1994
		peroral, 120 mg	Histamin	Hemmung	Baroody et al., 1989
		peroral, 60-300 mg	Histamin	Hemmung	Naclerio, 1993a
		peroral, 60-300 mg	Histamin LTC ₄	Hemmung keine Wirkung	Naclerio, 1993b
	Hautkammertestung	peroral, 120 mg	Histamin PGD ₂	keine Wirkung keine Wirkung	Massey et al., 1993

5.6 Andere pharmakologische Ansätze

Der Vollständigkeit halber sollen noch kurz einige andere Versuchsansätze zur direkten Beeinflussung der Mediatorfreisetzung erwähnt werden.

Glukokortikosteroide werden bei allen allergischen Erkrankungen eingesetzt. Sie verhindern neben vielen anderen Wirkungen die Migration von basophilen, eosinophilen und neutrophilen Leukozyten und erreichen so gute Effekte auf die Typ I-Überempfindlichkeitsreaktion [Bachert und Colberg, 1990]. Nur eine langfristige Inkubation (> 24 Stunden) von Basophilen mit Kortikoiden bewirkt eine Hemmung der IgE-induzierten Histaminfreisetzung [Marone et al., 1995]. Kortikosteroide dringen in die Zelle ein und hemmen dort die Phospholipase A₂, die für die Freisetzung der Arachidonsäure verantwortlich ist [Bachert und Colberg, 1990].

Cromoglicinsäure und Nedocromil gelten als klassische Mastzellblocker, ohne dass bisher der genaue Wirkmechanismus aufgeklärt ist [Okayama und Church, 1993]. Wegen der schlechten Resorption gelangt Cromoglicinsäure nach oraler Gabe nur in nicht relevanten Konzentrationen in die Haut und wird deshalb nur topisch (Auge, Nase, Lunge, Darm) angewendet.

Ciclosporin A, FK 506 (Tacrolimus) und andere Ascomycinderivate werden als Immunsuppressiva in schweren Fällen auch zur Behandlung von allergischen Erkrankungen genutzt [Anthony et al., 2001], wobei u.a. für Ciclosporin A eine Hemmung der Mediatorfreisetzung aus Hautmastzellen und Basophilen beschrieben wurde [Amon, 1992].

5.7 Bewertung und Ausblick

Unter Berücksichtigung von „Anwendungsnotwendigkeit“ und Nutzen-Risiko-Analysen sollten Antihistaminika heutzutage Eigenschaften wie schnelle Wirksamkeit, Einmalgabe, keine Sedierung, unbedenklicher Metabolismus, breite antiallergische Wirkung und antientzündliche „Zusatzeffekte“ auf zellulärer Ebene erfüllen. Fexofenadin zeigt mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen gute Ansätze zur optimierten Nutzung von H₁-Rezeptorantagonisten. Aufgrund der Vielfalt und

Komplexität der Ansatzpunkte für die Substanz sind weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Wirkmechanismen erforderlich. Hierbei wären besonders Untersuchungen an anderen allergischen Effektorzellen, wie beispielsweise Mastzellen, sinnvoll. Auch die Signaltransduktionskaskade bietet durch ihre komplexen Einzelschritte weitere Untersuchungsmöglichkeiten.

Die Vielfalt der bereits erwähnten inflammatorischen Mediatoren, die von Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen produziert werden, impliziert ein Netzwerk von Zell-Zell-Interaktionen sowie komplexe Mediator-Effektor-Organ-Wirkungen. Dies hat zur Folge, dass zur Behandlung immunologischer Vorgänge an Haut und Schleimhäuten prinzipiell zahlreiche Mediatoren gleichzeitig in ihrer biologischen Wirkung unterbunden werden müssten [Amon, 1995].

Eine sinnvolle Alternative besteht in der primären Supprimierung allergischer Effektorzellen durch Hemmung der Interaktion zwischen IgE-Molekül und Rezeptor. Dies scheint aber wegen der hohen Bindungsaffinität des IgE-Moleküls und der langsamen Dissoziation vom Fc_εRI-Rezeptor derzeit wenig realistisch. Ein vor der Zulassung stehender Ansatz zur Behandlung von allergischem Asthma hat die systemische Applikation von Antikörpern gegen das IgE-Molekül zum Ziel (Omalizumab, Xolair®) [Boushey, 2001].

Weiter besteht künftig vielleicht die Möglichkeit, Antikörper gegen Mediatoren zu entwickeln und klinisch zu nutzen, wie zum Beispiel „Anti-IL-4“ oder „Anti-IL-5“, oder lösliche Mediator-Rezeptoren (z.B. löslicher IL-4-Rezeptor), welche die Mediatoren binden und damit in ihrer Wirkung unschädlich machen [Marshall, 2000], gegen allergische Erkrankungen einzusetzen. Rekombinante IL-4-Proteine als IL-4-Antagonisten haben in Versuchen mit Affen eine Besserung der Krankheitssymptome bei allergischem Asthma gezeigt [Tomkinson et al., 2001]. Ziel neuartiger Therapieansätze ist es somit, schädliche Immunreaktionen nicht durch eine Immunsuppression, sondern durch eine Modifikation des Zytokinmusters der verantwortlichen T-Lymphozyten zu behandeln.

Aufgrund der Komplexität und der genetischen Disposition von Allergien ist jedoch auch in Zukunft eher von kombinierten therapeutischen Ansätzen als von monokausalen Konzepten auszugehen. Welche Rolle dabei auf Dauer H₁-Rezeptorantagonisten spielen werden, kann derzeit nicht abschließend beurteilt werden.

6. Zusammenfassung

Fexofenadin zählt zu den Antihistaminika der 3. Generation und ist in Deutschland zur Behandlung der Rhinitis allergica (Heuschnupfen) und der Urtikaria (Nesselsucht) zugelassen. Verschiedene Untersuchungen konnten in den vergangenen Jahren antiallergische bzw. antientzündliche Wirkungen für diese Substanz zeigen, die sich nicht durch die alleinige Blockade der Histamin-H₁-Rezeptoren erklären ließen. In der vorliegenden Arbeit wurden solche antiallergischen „Zusatzwirkungen“ auf unterschiedliche allergische Effektorzellen näher untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Fexofenadin übt unterschiedliche antiallergische Effekte auf isolierte menschliche immunologische Effektorzellen gesunder Spender aus. Erstmals konnte gezeigt werden, dass Fexofenadin die direkte immunologische oder nicht-immunologische Aktivierung von isolierten basophilen und eosinophilen Granulozyten hemmt. Die Inhibitions-Effekte waren deutlich bei der Freisetzung von Histamin aus basophilen Leukozyten und eosinophilem kationischem Protein (*eosinophil cationic protein*, ECP) aus eosinophilen Leukozyten, jedoch geringer ausgeprägt bei der LTC₄- und IL-4-Freisetzung.

Die Wirkung von Fexofenadin auf eosinophile Leukozyten beansprucht besonderes Interesse, da die A23187-induzierte Freisetzung von ECP konzentrationsabhängig gehemmt wurde und auch in pharmakologisch relevanten Konzentrationsbereichen auftrat.

Auch die Histaminfreisetzung aus anti-IgE stimulierten basophilen Leukozyten atopischer Spender wurde dosisabhängig gehemmt, signifikant bei einer Wirkstoffkonzentration von 10 µmol/l.

Der molekulare Mechanismus, durch welchen der Histaminrezeptorantagonist Fexofenadin die Mediatorfreisetzung inhibiert, ist bislang unbekannt. Es werden sowohl membranstabilisierende Effekte wie auch Effekte auf die Kalzium-Mobilisierung und den Kalzium-Einstrom angenommen. Proteinkinase C als zentrale Komponente der Aktivierungskaskade der Zellen sowie CD45-Tyrosinphosphatase und andere Tyrosinkinase scheinen dagegen keine Rolle für die

Inhibition zu spielen, da Fexofenadin nicht in der Lage war, die Aktivität dieser Enzyme *in vitro* zu hemmen. Die Hemmung der ECP-Freisetzung im pikomolaren Bereich spricht andererseits für einen spezifischen Mechanismus, an dem möglicherweise andere Abschnitte der Signaltransduktionskaskade beteiligt sind. Die Effekte von Fexofenadin auf die Degranulation der Eosinophilen waren zeitabhängig. Diese Wirkung ist offensichtlich irreversibel, da Präinkubation und konsekutives Auswaschen der Substanz keinen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung bei anschließender Stimulation hatte. Dies spricht für Membraneffekte des Fexofenadin.

Die *In vitro*-Beobachtungen werden gestützt durch Ergebnisse von *Ex vivo-in vitro*-Experimenten. Die orale Gabe von Telfast® 180 unterdrückte die zelluläre Aktivität von Basophilen und Eosinophilen gemessen an der Histamin- und der ECP-Freisetzung.

7. Literatur

- Abdelaziz MM, Devalia JL, Khair OA, Bayram AJ, Prior AJ, Davies RJ (1998): Effects of fexofenadine on eosinophil-induced changes in epithelial permeability and cytokin release from nasal epithelial cells of patients with seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 101, 410-420
- Abdelaziz MM, Khair OA, Devalia JL (2000): The potential of active metabolites of antihistamines in the management of allergic diseases. *Allergy* 55, 425-434
- Agis H, Willheim M, Sperr WR, Wilfing A, Kromer E, Kabrna E, Spanblochl E, Strobl H, Geissler K, Spittler A, Boltznitulescu G, Majdic O, Lechner K, Valent P (1993): Monocytes do not make mast cells progenitor as a c-kit, CD34+, Ly-, CD14-, CD17-, colony-forming cell. *J Immunol* 151, 4221-4227
- Akagi M, Mio M, Miyoshi K, Tasaka K (1987): Antiallergic effects of terfenadine on immediate type hypersensitivity reactions. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 9, 257-279
- Amon U (1991): Immunpathologie der atopischen Dermatitis. *Dtsch Med Wschr* 116, 102-107
- Amon U (1992): Cyclosporin A inhibits histamine release from human peripheral basophils and human skin mast cells. *Agents Actions* 35, C250-252
- Amon U (1995): Mastzellen und Basophile als Effektorzellen dermatologischer Erkrankungen; Klinische und experimentelle Untersuchungen zu ausgewählten Krankheitsbildern unter besonderer Berücksichtigung der Beeinflussbarkeit der Mediatorfreisetzung in vitro. Habilitationsschrift. Klinik für Dermatologie und Venerologie, Medizinische Universität zu Lübeck
- Amon U, Dieckmann D, Nitschke M, Gibbs BF, Wolff HH (1996): Heterogeneity of signal transduction mechanisms in human basophils and human skin mast cells. I. Pharmacological investigations with activators and inhibitors of protein kinase C. *Skin Pharmacol* 9, 211-220
- Amon U, Memmel U, Stoll R, Amon S (2000): Comparison of severity scoring of atopic dermatitis values and serum levels of eosinophil cationic protein and mast cell tryptase for routine evaluation of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 80, 284-286
- Amon U, Ramachers U, Wolff HH (1992): Antiallergische Wirkung von H₁-Rezeptorantagonisten an histaminhaltigen Zellen. *Dermatol Monatsschr* 178, 327-333
- Amon U, von Stebut E, Wolff HH (1993): Pharmacological investigations with different PKC-inhibitors on IgE-dependent and IgE-independent activation of human basophils. *Agents Actions* 39, 13-19
- Amon U, Wolff HH (1994): Mastzellen – weit mehr als ein Speicher für Histamin. *Allergologie* 17, 350-354
- Amon U, Zöllinger A (2001): Fexofenadin als Antihistaminikum der neueren Generation: Eine Standortbestimmung. *Allergologie* 24, 49-55

- Anthony JF, Plummeridge MJ (2001): Alternative agents in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108, 3-10
- Azzi A, Boscoboinik D, Hensley C (1992): The protein kinase C family. *Eur J Biochem* 208, 547-557
- Bachert C, Colberg C (1990): Aktueller Status der symptomatischen Therapie der allergischen Rhinitis. *HNO* 38, 1-6
- Barnes KC (2000): Atopy and asthma genes - where do we stand? *Allergy* 55, 803-817
- Baroody FM, Naclerio RM (2000): Antiallergic effects of H₁-receptor antagonists. *Allergy* 55, 17-27
- Baroody FM, Proud D, Kagey-Sobotka A, Freidhoff L, Norman PS, Lichtenstein LM, Naclerio RM (1989): The effect of H₁-antihistamines on early allergic response. *Ann Allergy* 63, 551-555
- Batzer AG, Kirsch S, Hofer HW (1990): Characterization of two tyrosine-specific protein kinases from pig spleen. Substrate-specific effects of autophosphorylation. *Eur J Biochem* 194, 251-8
- Baumgarten CR, Lemme M, Kunkel G (1990): The influence of topical applied loratadine upon mediator generation after nasal challenge. *J Allergy Clin Immunol* 85, 164
- Beauvais F, Hiéblot C, Burtin C, Benviste J (1992): Regulation of human basophil activation. IV. Dissociation between cationic dye binding and histamine release: role of Ca²⁺ ions. *Fundam Clin Pharmacol* 6, 153-158
- Benhamou M, Siraganian RP (1992): Protein-tyrosine phosphorylation: an essential component of Fc_εR1 signaling. *Immunol Today* 13, 195-197
- Berthon B, Taudou G, Combettes L, Czarlewski W, Carmi-Leroy A, Marchand F, Wayer A (1994): In vitro inhibition by loratadine and descarboethoxyloratadine of histamine release from human basophils and of histamine release and intracellular calcium fluxes in rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3). *Biochem Pharmacol* 47, 789-794
- Böhm I, Bauer R (1997): Th1-Zellen, Th2-Zellen und atopische Dermatitis. *Hautarzt* 48, 223-227
- Boushey HA (2001): Experiences with monoclonal antibody therapy for allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108, Suppl. 2, S77-S83
- Bousquet J, Lebel B, Chanal I, Morel A, Michel FB (1988): Antiallergic activity of H₁-receptor antagonists assessed by nasal challenge. *J Allergy Clin Immunol* 82, 881-887
- Brostoff J, Hall T (1991): Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Roitt IM, Brostoff J, Male DK (Hrsg.), Thieme, Stuttgart, 253-273
- Bruijnzeel PLB, Rihs S, Betz S (1992): Der eosinophile Granulozyt und seine Bedeutung bei allergischen Erkrankungen. *Schweiz med Wochenschr* 122, 173-180
- Brunner T, Heusser CH, Dahinden CA (1993): Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation. *J Exp Med* 177, 605-611

- Butterfield JH, Weiler D, Peterson EA, Gleich GJ, Leifermann KM (1990): Sequestration of eosinophil major protein in human mast cells. *Lab Invest* 62, 77-82
- Campbell AM, Bousquet J (1993): Anti-allergic activity of H₁ blockers. *Int Arch Allergy Immunol* 101, 308-310
- Campbell AM, Chanez P, Marty-Ane RS, Albat B, Bloom M, Michel FB, Godard P, Bousquet J (1993): Modulation of eicosanoid and histamine release from human dispersed lung mast cells by terfenadine. *Allergy* 48, 125-129
- Casale TB, Andrade C, Qu R (1999): Safety and efficacy of once daily fexofenadine HCl in the treatment of autumn seasonal allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc* 20, 193-198
- Casolaro V, Spadaro G, Marone G (1990): Human basophil releasability. VI. Changes in basophil releasability in patients with allergic rhinitis or bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* 142, 1108-1111
- Charlesworth EN, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Lichtenstein LM (1989): Effect of cetirizine on mast cell-mediator release and cellular traffic during cutaneous late-phase reaction. *J Allergy Clin Immunol* 83, 905-912
- Church MK (2001): H₁-antihistamines and inflammation. *Clin Experiment Allergy* 31, 1341-1343
- Coombs RRA, Gell PGH (1975): Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and diseases. In: Gell PGH, Coombs, Lachmann PJ (Hrsg.): *Clinical aspects of immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 761-781
- Dahinden CA, Geiser T, Brunner T, von Tscharner V, Caput D, Ferrara P, Minty A, Baggiolini M (1994): Monocyte chemotactic protein 3 is a most effective basophil and eosinophil-activation chemokine. *J Exp Med* 179, 751-756
- Day JH, Briscoe MP, Welsh A (1997): Onset of action, efficacy, and safety of a single dose of fexofenadine hydrochloride for ragweed allergy using an environmental exposure unit. *Ann Allergy Asthma Immunol* 79, 533-540
- de Paulis A, Dente V, Onorati AM, de Crescenzo G, di Gioia L, Marone G (1999): Fexofenadine inhibits the release of mediators and IL-4 from human Fc_εRI+ cells (Abstract). *Allergy* 54, 144
- de Vos C (1999): H₁-receptor antagonists: effects on leukocytes, myth or reality? *Clin Exp Allergy* 29, 60-63
- Dekker LV, Parker PJ: Protein kinase C (1994): A question of specificity. *Trends Biochem Sci* 19; 73-77
- Dorsch W, Ring J, Strasser TH, Dorsch E (1989): Cetirizine suppresses late-phase reactions in human skin after reverse anaphylaxis. *Health Sci Rev* 3, 18-20
- Duschl A, Dreyer M, Sebald W (2000): Ein Designerprotein eröffnet neue Wege zur Asthmatherapie. *Nachrichten aus der Chemie* 48, 761-763

- Eda R, Sugiyama H, Hopp RJ, Bewtra AK, Townley RG (1993): Effect of loratadine on human eosinophil function in vitro. *Ann Allergy* 71, 373-378
- Ehrlich P (1878): Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Dissertation. Universität Leipzig
- Ehrlich P (1879): Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten. *Arch Anat Physiol* 3, 166-169
- Ennis M (1991): Automated fluorometric assays. In: Uvnäs B (Hrsg.), *Histamine and histamine antagonists*, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 31-38
- Farago A, Nishizuka Y (1990): Protein kinase C in transmembrane signalling. *FEBS* 268, 350-354
- Finn A, Kaplan AP, Fretwell R, Qu R, Long J (1999): A double-blind, placebo controlled trial of fexofenadine HCl in the treatment of chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 104, 1071-1078
- Foreman JC, Mongar BD, Gomperts BD (1973): Calcium ionophores and movement of calcium ions following the physiological stimulus to a secretory process. *Nature* 285, 249-251
- Fredens K, Dahl R, Venge P (1982): The Gordon phenomenon induced by the eosinophil cationic protein and eosinophil protein X. *J Allergy Clin Immunol* 70, 361-366
- Garteiz DA, Hook RH, Walker BJ, Okerholm RA (1982): Pharmacokinetics and biotransformation studies of terfenadine in man. *Arzneim-Forsch Drug Res* 32, 1185-1190
- Genovese A, Patella V, De CG, De PA, Spandaro G, Marone G (1997): Loratadine and desloratadine inhibit the immunological release of mediators from human Fc_εRI-cells. *Clin Exp Allergy* 27, 559-567
- Gibbs BF, Amon U (1996): Zytokine, Mastzellen und basophile Leukozyten: Ein Beitrag zum Verständnis allergischer und entzündlicher Reaktionen. *Focus MUL* 13, 19-24
- Gibbs BF, Haas H, Falcone FH, Albrecht C, Vollrath IB, Noll T, Wolff HH, Amon U (1996): Purified human peripheral blood basophils release interleukin-13 and preformed interleukin-4 following immunological activation. *Eur J Immunol* 26; 2493-2498
- Gibbs BF, Noll T, Falcone FH, Haas H, Vollmer E, Vollrath I, Wolff HH, Amon U (1997): A three-step procedure for the purification of human basophils from buffy coat blood. *Inflam res* 46, 137-142
- Gibbs BF, Vollrath IB, Albrecht C, Amon U, Wolff HH (1998): Inhibition of interleukin-4 and interleukin-13 release from immunologically activated human basophils due to the actions of anti-allergic drugs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 357, 573-578
- Gleich GJ, Adolphson CR, Leifermann KM (1993): The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med* 44, 85-101
- Gleich JR, Adolphson CR (1986): The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol* 39, 177-253

- Gleich JR, Frigas E, Loegering DA, Wassom DL, Steinmüller D (1979): Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *J Immunol* 123, 2925-2927
- Grewe M, Czech W, Morita A, Werfel T, Memmer M, Kapp A, Ruzicka T, Schöpf E, Krutmann J (1998): Human eosinophils produce biologically active IL-12: Implications for control of T cell responses. *J Immunol* 161, 415-420
- Grootendorst DC, Sont JK, Willems LN, Kluin-Nelemans JC, van Kieken JH, Veselic-Charvat M, Sterk PJ (1997): Comparison of inflammatory cell counts in asthma: induced sputum vs. bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. *Clin Exp Allergy* 27, 769-779
- Haak-Frendscho M, Arai N, Arai KJ, Baeza ML, Finn A, Kaplan AP (1988): Human recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-3 cause basophil histamine release. *J Clin Invest* 82, 17-20
- Halken S, Host A (2000): The lessons of noninterventional and interventional prospective studies on the development of atopic diseases during childhood. *Allergy* 55, 793-802
- Halmerbauer G, Frischer T, Koller DY (1997): Monitoring of disease activity by measurement of inflammatory markers in atopic dermatitis in childhood. *Allergy* 52, 765-769
- Hamawy MM, Mergenhagen SE, Siraganian RP (1994): Adhesion molecules as regulators of mast cell and basophil function. *Immunol today* 15, 62-66
- Hanifin JM, Rajka G (1980): Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol (Suppl) Stochh.* 92, 44-47
- Henz BM, Maurer M, Lippert U, Worm M, Babina M (2001): Mast cells as initiators of immunity and host defense. *Exp Dermatol* 10, 1-10
- Hofer HW, Schlatter S, Graefe M (1985): Phosphorylation of phosphofruktokinase by protein kinase C changes the allosteric properties of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 129, 892-897
- Hoffmann K, Freitag M, Altmeyer P (1999): Loratadin bei atopischer Dermatitis: Ein Überblick über bisherige klinische Studien und Überlegungen zum Wirkmechanismus. *Derm* 5, 18-30
- Horiuchi T, Weller PF (1997): Expression of vascular endothelial growth factor by human eosinophils: upregulation by granulocyte macrophage colony stimulating factor and interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 70-77
- Hoshino M, Nakamura Y (1997): Relationship between activated eosinophils of the bronchial mucosa and serum eosinophil cationic protein in atopic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 112, 56-64
- Howarth PH, Rajakulasingam K, Feather IH (1991): Mediators in allergic Rhinitis. *Clin Exp Allergy* 21, 262-266
- Howarth PH, Stern MA, Roi L, Reynolds R, Bousquet J (1999): Double-blind placebo controlled study comparing the efficacy and safety of

- fexofenadine hydrochloride (120 and 180 mg once daily) and cetirizine in seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 104, 927-933
- Ishisaka K, Ishisaka T (1971): Mechanisms of reaginic hypersensitivity: a review. *Clin Allergy* 1, 9-24
- James JM, Kagey-Sobotka A, Sampson HA (1993): Patients with severe atopic dermatitis have activated circulating basophils. *J Allergy Clin Immunol* 91, 1155-1162
- Janson C, Bjornsson E, Enander I, Hakason L (1997): Seasonal variation in serum eosinophil cationic protein in a general population sample. *Respir Med* 91, 347-349
- Kapp A (1995): Atopic dermatitis – the skin manifestation of atopy. *Clin Exp Allergy* 25, 210-219
- Kapp A, Zeck-Kapp G, Czech W, Schöpf E (1994): The chemokine RANTES is more than a chemoattractant: Characterisation of its effect on human eosinophil oxidative metabolism and morphology in comparison with IL-5 and GM-CSF. *J Invest Dermatol* 102, 906-914
- Katakami J, Kaibuchi K, Sawamura M, Takai Y, Nishizuka Y (1984): Synergistic actions of protein kinase C and calcium for histamine release from rat peritoneal mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 121, 573-578
- Kikkawa U, Minakuchi R, Takai Y, Nishizuka Y (1983): Calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C) from rat brain. *Methods Enzymol* 99, 288-98
- Kitamura Y, Kasugai T, Nomura S, Matsuda H (1993): Development of mast cells and basophils. In: Foreman JC (Hrsg.), *Immunopharmacology of mast cells and basophils*. Academic Press, Harcourt Brace and Company, Publishers, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 5-27
- Kleine-Tebbe J, Josties C, Frank G, Stalleicken D, Buschauer A, Schunack W, Kunkel G, Czarnetzki B (1994): Inhibition of IgE- and non IgE-mediated histamine release from human basophil leucocytes in vitro by a histamine H₁-antagonist descarboethoxyl-loratadin. *J Allergy Clin Immunol* 93, 494-500
- Klimek L (1998): Fexofenadin. Vertreter einer neuen Antihistaminika-Generation? *Allergologie* 21, 3-8
- Kroegel C, Matthys H (1992): Mit dem eosinophilen Granulozyten assoziierte Erkrankungen. *Arzneimitteltherapie* 10, 140-151
- Kulig M, Luck W, Lau S, Niggemann B, Bergmann R, Klettke U, Guggenmoos-Holzmann I, Wahn U (1999): Effect of pre- and postnatal tobacco smoke exposure on specific sensitization to food and inhalant allergens during the first 3 years of life. Multicenter Allergy Study Group, Germany. *Allergy* 55, 220-228
- Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ, Rucinski D, Sadick M, Kaplan AP (1993): Characterisation of the human basophil response to cytokines, growth factors, and histamine releasing factors of the intercrine/chemokine family. *J Immunol* 150, 1932-1943

- Lau HYA, Pearce FL (1986): Effects of antihistamines on isolated mast cells from the rat, guinea pig and man. *Agents Actions* 18, 107-109
- Leifermann KM (1991): A current perspective on the role of eosinophils in dermatologic diseases. *J Am Acad Dermatol* 24, 1101-1112
- Leurs R, Timmermann H (1992): Molecular pharmacological aspects of histaminergic receptors. *Ann Psychiatr* 3, 107-124
- Lippert C, Ling J, Brown P (1995): Mass balance and pharmacokinetics of fexofenadine HCl in healthy male volunteers, *Pharmaceutical Res* 12 (Supp 9), 390-396
- Lippert U, Krüger-Krasagakes S, Möller A, Kiessling U, Czarnetzki BM (1995): Pharmacological modulation of IL-6 and IL-8 secretion by the H₁-antagonist decarboethoxy-loratadine and dexamethasone by human mast and basophilic cell lines. *Exp Dermatol* 4, 272-276
- Lippert U, Möller A, Welker P, Artuc M, Henz BM (2000): Inhibition of cytokine secretion from human leukemic mast cells and basophils by H₁- and H₂-receptor antagonists. *Exp Dermatol* 9, 118-124
- Markham A, Wagstaff AJ (1998): Fexofenadine. *Drugs* 55, 296-274
- Marone G, Giugliano R, Lembo G, Ayala F (1986): Human basophil releasability. II. Changes in basophil releasability in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 87, 19-23
- Marone G, Spadaro G, Genovese A (1995): Regulation of human mast cell and basophil function. In: Johansson SGO (Hrsg.), *Progress in allergy and clinical immunology*, Hogrefe & Huber Publishers, Seattle, Toronto, Bern 3, 10-25
- Marshall GD (2000): Therapeutic options in allergic diseases: Antihistamines as systemic antiallergic agents. *J Allergy Clin Immunol* 106, 303-312
- Mason J, Reynolds R, Rao N (1999): The systemic safety of fexofenadine HCl. *Clin Exp Allergy* 29, 163-170
- Massey WA (1993): Pathogenesis and pharmacologic modulation of the cutaneous late-phase reaction. *Ann Allergy* 71, 578-584
- Menica-Huerta JM, Razin E, Ringel EW, Corey EJ, Hoover D, Austen KF, Lewis RA (1983): Immunologic and ionophore-induced generation of leukotriene B₄ from mouse bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 130, 1885-1890
- Metcalf DD, Costa JJ, Burd PR (1992): Mast cells and basophils. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R (Hrsg.): *Inflammation, basics principles and clinical correlates*. 2th Edition, Raven Press, New York, USA
- Miadonna A, Milazzo N, Lorini M, Marchesi E, Tedeschi A (1994): Inhibitory effect of the H₁ antagonist loratadin on histamine release from human basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 105, 12-7
- Michel L, de Vos C, Rihoux JP, Burtin C, Benveniste J, Dubertret L (1988): Inhibitory effect of oral cetirizine on *in vivo* antigen-induced histamine and PAF-acether release and eosinophil recruitment in human skin. *J Allergy Clin Immunol* 82, 101-109

- Michel L, de Vos C, Rihoux JP, Dubertret L (1987): Inhibitory effects of cetirizin on antigen-induced histamine and PGD₂ release and on eosinophil recruitment in allergic patients. *Ann Allergy* 59, 67
- Michel L, Jean-louis F, Burtin C, Maclouf J, de Vos C, Dubertret L (1989): Measurement of cetirizine effects on protein diffusion, mediator release, and eosinophil recruitment during in vivo anaphylactic cutaneous reactions. *Health Sci Rev* 3, 14-17
- Mihm MC, Soter NA, Dvorak HF, Austen KF (1976): The structure of normal skin and the morphology of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 67, 305-312
- Mitchel EB, Crow J, Chapman MD, Jouhal SS, Pope FM, Platts-Mills TAE (1982): Basophils in allergen-induced patch test sites in atopic dermatitis. *Lancet* 1, 127-130
- Moqbel R, Levi-Schaffer F, Kay AB (1994): Cytokine generation by eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 94, 1183-1188
- Nabe M, Agrawal DK, Sarmiento EU, Townley RG (1989): Inhibitory effect of terfenadine on mediator release from human blood basophils and eosinophils. *Clin Exp Allergy* 19, 515-520
- Naclerio RM (1990): The role of histamine in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 86, 628-632
- Naclerio RM (1993a): Effects of antihistamines on inflammatory mediators. *Ann Allergy* 71, 292-295
- Naclerio RM (1993b): The effects of antihistamines on the immediate allergic response: a comparative review. *Otolaryngol Head Neck Surg* 108, 723-730
- Naclerio RM, Proud D, Kagey-Sobotka A, Freidhoff L, Norman PS, Lichtenstein LM (1989): The effect of cetirizine on early allergic response. *Laryngoscope* 99, 596-599
- Nitschke M, Sohn K, Dieckmann D, Gibbs BF, Wolff HH, Amon U (1996): Effects of basophil-priming and stimulating cytokines on histamine release from isolated human skin mast cells. *Arch Dermatol Res* 288, 463-468
- Noll T, Dieckmann D, Gibbs BF, Nitschke M, Albrecht C, Vollrath I, Tamaoki T, Wolff HH, Amon U (1997): Heterogeneity of signal transduction mechanisms in human basophils and human skin mast cells. II. Effects of 7-o-Methyl-UCN-01, NPC 15437 and Bryostatin 1 and 2, four PKC-modulatory agents, on mediator release from human peripheral blood basophils and skin mast cells. *Biol Signals* 6, 1-10
- Okayama Y, Church MK (1993): Drugs modifying the response of mast cells and basophils. In: Foreman JC (Hrsg.), *Immunopharmacology of mast cells and basophils*, Academic Press, Harcourt Brace and company, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto, 139-152
- Oliver F, Amon U, Breathnach A, Sarathchandra P, Kobza Black A, Greaves MW (1991): Contact urticaria due to the common stinging nettle (*urtica dioica*): Histological and ultrastructural studies. *Clinical Experimental Dermatology* 16, 1-7

- Ozawa K, Szallasi Z, Kazanietz MG, Blumberg PM, Mischak H, Mushinski JF, Beaven MA (1993a): Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent isozymes of protein kinase C mediate exocytosis in antigen-stimulated rat basophilic RBL-2H3 cells. Reconstitution of secretory responses with Ca²⁺ and purified isozymes in washed permeabilized cells. *J Biol Chem* 268, 1749-1756
- Ozawa K, Yamada K, Kazanietz MG, Blumberg PM, Beaven MA (1993b): Different isozymes of protein kinase C mediate feedback inhibition of phospholipase C and stimulatory signals for exocytosis in rat RBL-2H3 cells. *J Biol Chem* 268, 2280-2283
- Palma-Carlos AG, Jordao AL (1991): Immunopathology of urticaria. *Allerg Immunol* 23, 443-446
- Paolieri F, Battifora M, Riccio AM, Bertolini C, Cutolo M, Bloom M, Ciprandi G, Canonica GW, Bagnasco M (1998): Terfenadine and fexofenadine reduce in vitro ICAM-1 expression on human continuous cell lines. *Ann Allergy Asthma Immunol* 6, 601-607
- Parsons ME (1991): Histamine receptors on overview. *Scand J Gastroenterol* 26, Suppl 180, 46-52
- Paul E, Berth-Jones J, Ortonne JP, Stern M (1998): Fexofenadine hydrochloride in the treatment of chronic idiopathic urticaria: a placebo-controlled, parallel-group, dose-ranging study. *J Dermatol Treat* 9, 143-149
- Peters SP (1991): La loratadine inhibe la liberation de mediateurs par une suspension de mastocytes pulmonaires humaines. *Allerg Immunol* 23, 109-112
- Peterson CGB, Venge P (1983): Purification and characterization of a new cationic protein – eosinophil protein X (EPX) from granules of human eosinophils. *Immunology* 50, 19-26
- Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Dolovich J, Hargreave FE (1997): Measuring airway inflammation in asthma: eosinophils and eosinophil cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol* 99, 539-544
- Prinz J (1993): Immunologische Grundlagen allergischer Erkrankungen. *Allergologie* 16, 126-133
- Product Monograph TELFAST (1998). Published by The medicine group (Education) Ltd, 62 Stert street, Abingdon, Oxfordshire, UK, ISBN 1851132406, Hoechst Marion Roussel
- Ramachers U (1996): In vitro-Studien zur anti-allergischen Wirksamkeit verschiedener H₁-Rezeptorantagonisten an menschlichen basophilen Granulozyten. Dissertationsschrift. Medizinische Universität zu Lübeck
- Ramachers U, Amon U, Wolff HH (1994): Direct effects of second-generation H₁-receptor antagonists on the activation of human basophils. *Agents Actions* 41, 45-46
- Ramachers U, Hiller C, Nitschke M, Dieckmann M, Zhang MQ, Timmermann H, Gibbs BF, Vollrath IB, Albrecht C, Amon U (1996): In vitro-Untersuchungen mit Terfenadin und verschiedenen Derivaten zur

- Mediatorfreisetzung aus menschlichen Hautmastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten. *Allergo J* 5, 447-452
- Reider N, Zloczower M, Fritsch P, Kofler H (1998a): Antihistaminika. Teil1. *Hautarzt* 49, 674-681
- Reider N, Zloczower M, Fritsch P, Kofler H (1998b): Antihistaminika. Teil2. *Hautarzt* 49, 734-742
- Riley JF, West GB (1953): Presence of histamine in tissue mast cells. *J Physiol* 120, 528-537
- Ring J (1983): Plasma histamine concentrations in atopic dermatitis. *Clin Allergy* 13, 545-552
- Ronchi MC, Piragino C, Rosi E, Stendardi L, Tanini A, Galli G, Duranti R, Scano G (1997): Do sputum eosinophils and ECP relate to the severity of asthma? *Eur Respir J* 10, 1809-1813
- Rossi AG, Haslett C, Hirani N, Greening AP, Rahmanl, Metz CN, Bucala R, Donnelly SC (1998): Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *J Clin Invest* 101, 2869-2874
- Roth A, Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, Schall TJ, Dahinden CA (1992): RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulozytes. *J Exp Med* 176, 1489-1495
- Rothenberger ME (1998): Eosinophilia. *New Engl J Med* 338, 1592-1600
- Rudikoff D, Lebowitz M (1998): Atopic dermatitis. *Lancet* 351, 1715-1721
- Sanchez-Mejorada G, Rosales C (1998): Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukocyte Biol* 63, 521-533
- Sanderson CJ (1992): Interleukin-5, eosinophils and diseases. *Blood* 79, 3101-3109
- Scharenberg AM, Kinet JP (1994): Initial events in Fc_εRI signal transduction. *J Allergy Clin Immunol* 94, 1142-1146
- Schroeder JT, MacGlashan DW (1997): The basophil. *J Allergy Clin Immunol* 99, 429-433
- Schwartz LB, Huff T (1993): Biology of mast cells and basophils. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Franklin A, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW (Hrsg.); *Allergy, principles and practice*; Mosby, St. Louis, 135-168
- Schwartz LB, Austen KF (1988): The mast cell and mediators of immediate hypersensitivity. In: Samter M (Hrsg.); *Immunological diseases*; Little, Brown and Company, Boston, Toronto, 157-201
- Seagrave J, Oliver JM (1990): Antigen-dependent transition of IgE to a detergent-insoluble form is associated with reduced IgE receptor-dependent secretion from RBL-2H3 mast cells. *J Cell Physiol* 144, 128-136
- Shi H, Qin S, Huang G, Chen Y, Xiao C, Xu H, Liang G, Xie Z, Qin X, Wu J, Li G, Zhang G (1997): Infiltration of eosinophils into the asthmatic airways caused by interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16, 220-224
- Siraganian RP (1993): Mechanisms of IgE-mediated hypersensitivity. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW (Hrsg.); *Allergy, principles and practice*, Mosby, St. Louis, 202-205

- Simons FE, Simons KJ (1994): The pharmacology and use of H₁ receptor-antagonist drugs. *N Engl J Med* 330, 1663-1670
- Simons FE, Simons KJ (1999): Clinical pharmacology of a new H₁ receptor antagonist. *Clin Pharmacokinet* 36, 329-352
- Simons FE, Silver NA, Gu X, Simons KJ (2001): Skin concentrations of H₁-receptor antagonists. *J Allergy Clin Immunol* 107, 526-530
- Simons FE, Simons KJ (1994): The pharmacology and use of H₁-receptor antagonist drugs. *Drug Therapy* 330, 1663-1670
- Singer SJ, Nicolson GF (1972): The fluid mosaic model of the structure of cell membrane. *Science* 175, 720-731
- Slater JW, Zechnich AD, Haxby DG (1999): Second generation antihistamines. A comparative review. *Drugs* 57, 31-47
- Spy CFJ (1988): Eosinophils. A comprehensive review and guide to the scientific and medical literature. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokio
- Stader C, Hofer HW (1992): A major lienal phosphotyrosine phosphatase is inhibited by phospholipids and inositol trisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 1404-1409
- Steinbach KH, Shick P, Trepel F, Raffler H, Dohrmann J, Heilgeist G, Heltzel W, Li K, Past W, van der Woerd, de Lange JA, Theml H, Fliedner TM, Begemann H (1979): Estimation of kinetic parameters of neutrophilic, eosinophilic and basophilic granulocytes in human blood. *Blut* 39, 27-38
- Tasaka K, Mio M, Okamoto M (1986): Intercellular calcium release induced by histamine releasers and its inhibition by some antiallergic drugs. *Ann Allergy* 56, 464-469
- Tasaka K, Tomioka H (1993): The Japanese perspective: effects of terfenadine in bronchial asthma: in vitro and in vivo research. *Ann Allergy* 71, 312-316
- The international study of asthma and allergies in childhood steering committee (1998): Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 351, 1225-1232
- Tkaczyk C, Gilfillan AM (2001): Fc_εR1-dependent signaling pathway in human mast cells. *Clin Immunol* 99, 198-210
- Togias AG, Proud D, Kagey-Sobotka A, Freidhoff L, Lichtenstein LM, Nacleiro RM (1989): In vivo and in vitro effects of antihistamines on mast cell mediator release: a potentially important property in the treatment of allergic diseases. *Ann Allergy* 63, 465-469
- Tomkinson A, Duez C, Cieslewicz G, Pratt JC, Joetham A, Shanafelt MC, Gundel R, Gefland EW (2001): A murine IL-4 receptor antagonist that inhibits IL-4- and IL-13-induced responses prevents antigen-induced airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *J Immunol* 166, 5792-5800
- Treptau T, Piram P, Cook PF, Rodriguez PH, Hoffmann R, Jung S, Thalhofer HP, Harris BG, Hofer HW (1996): Comparison of the substrate specificities

- of cAMP-dependent protein kinase from bovine heart and *Ascaris suum* muscle. *Biol Chem Hoppe Seyler* 377, 203-9
- Turner CR, Darowski MJ, Sampson HA, Spannhake EW, Hirshman CA (1989): Dermal mast cell releasability and end organ responsiveness in atopic and nonatopic dogs. *J Allergy Clin Immunol* 83, 643-648
- Venge E, Dahl R, Hallgren R (1979): Enhancement of factor XII dependent reactions by eosinophil cationic protein. *Thromb Res* 14, 641-649
- von Recklinghausen F (1863): Über die Eiter- und Bindegewebskörperchen. *Virchows Arch Path Anat* 28, 157
- Wagenmann M, Baroody FM, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Naclerio RM (1994): The effect of terfenadine on unilateral nasal challenge with allergen. *J Allergy Clin Immunol* 93, 594-605
- Wang DY, Hanotte F, de Vos C, Clement P (2001): Effects of cetirizine, levocetirizine, and dextrocetirizine on histamine-induced nasal response in healthy adult volunteers. *Allergy* 56, 339-343
- Warner JA, MacGlashan DW jr. (1989a): Protein kinase C changes in human basophils. *J Immunol* 142, 1669-1677
- Warner JA, Peters SP, Lichtenstein LM, Hubbard W, Yancey KB, Stevenson HC, Miler PJ, MacGlashan DW jr. (1989b): Differential release of mediators from human basophils: differences in arachidonic acid metabolism following activation by unrelated stimuli. *J Leukocyte Biol* 45, 558-571
- Wedemeyer J, Galli SJ (2000): Mast cells and basophils in acquired immunity. *British Medical Bulletin* 56, 936-955
- Weidner N, Austen F (1990): Evidence for morphologic diversity of human mast cells. An ultrastructural study of mast cells from multiple body sites. *Lab Invest* 63, 63-72
- Weller PF, Lee CW, Foster DW, Corey EJ, Austen KF, Lewis RA (1983): Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: predominant production of leukotriene C₄. *Proc Nat Acad Sci* 80, 7626-7630
- With MV, Kaliner MA (1992): Mediators of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 90, 699-704
- Woschnagg C, Rak S, Venge P (1996): Oxygen radical production by blood eosinophils is reduced during birch pollen season in allergic patients. *Clin Exp Allergy* 26, 1064-1072
- Yecies LD, Wedner HJ, Parker CW (1979): Slow reacting substance from ionophore stimulated human leukemic basophils. *J Immunol* 123, 2814-2816

Aus dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:

Amon U, Amon S, Gibbs BF (2000): In vitro studies with fexofenadine, a new histamine H₁ receptor antagonist, on isolated human effector cells. *Inflam Res* 49 Suppl. 1, 13-4

Amon S, Amon U, Gibbs BF (2000): Antiallergic activity of fexofenadine in vitro. *Allergy Clin Immunol*, 105, 382 (Abstract)

Amon U, Voges A, Amon S (2000): In vitro investigations with the histamine H₁ receptor antagonist fexofenadine on different elements of signal transduction. *Allergy Clin Immunol Intern Suppl* 2, 213 (Abstract)

Amon U, Amon S (2001): Fexofenadine inhibits activation of basophils and eosinophils in ex vivo-in vitro experiments. *Allergy Clin Immunol* 107, 151 (Abstract)

Abkürzungen

A23187	Kalziumionophor
AD	atopische Dermatitis
Ag	Antigen
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C3a, C5a	Komplementfaktoren
c-AMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CYP450	Cytochrom450
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECP	<i>Eosinophil cationic protein</i>
EDN	<i>Eosinophil derived neutotoxin</i>
EDTA	Etylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i>
EPX	<i>Eosinophil peroxidase X</i>
FcεRI	hochaffiner IgE-Rezeptor
FMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
Gp	Glycoprotein
G-Protein	Guanidinnukleotid-bindendes Protein
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure
HETE	Hydroeicosatetraensäure
HPETE	Hydroperoxieicosatetraensäure
HRA	Histaminrezeptorantagonist
IC ₅₀	Konzentration eines Wirkstoffs, bei der 50 % Hemmung der Mediatorfreisetzung erreicht wurde
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5,-triphosphat
KDa	Kilodalton
LT	Leukotrien
Lyn	Tyrosinkinase
MBP	<i>Major basic protein</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PG	Prostaglandin
PKA	Proteinkinase A

PKC	Proteinkinase C
PL	Phospholipase
Poly (Tyr:Glu 1:4) _n : (³² P-)RCML:	Polymerisat aus Tyrosin und Glutamat (1:4) (Tyrosinphosphoryliertes) Reduziertes, carboxymethyliertes, maleyliertes Lysozym
PRA	perenniale Rhinitis allergica
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SRA	saisonale Rhinitis allergica
Syk	Tyrosinkinase
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Tx	Thromboxan
U	Urtikaria
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Gerhard Heldmaier für die Bereitschaft danken, mich bei dieser extern durchgeführten Arbeit zu unterstützen.

Weiter gilt mein Dank der Firma Aventis, die es finanziell ermöglicht hat, diese Arbeit durchzuführen. Vor allem Herrn Dr. Thomas Höhler ist es zu verdanken, dass es trotz einiger Schwierigkeiten gelungen ist, diese Arbeit zu beenden.

Vor Ort war besonders mein Mann, Herr Professor Ulrich Amon, mein Ansprechpartner für Probleme und Fragen, dem ich auch ganz herzlich für die Durchsicht dieser Arbeit danke.

Für die Hilfe bei den Messungen der zahlreichen ELISA möchte ich der MTA Frau Lisa Bröhl danken.

Herrn Dr. Andre Voges und Herrn Dr. Bernhard Gibbs danke ich für ihre Unterstützung in Konstanz und in Lübeck.

Auch meinem Vater, Herrn Professor Friedhelm Schneider, danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Tabellarischer Lebenslauf

1. Persönliche Daten

- **Name:** Regina Sabine Amon, geb. Schneider
- **Geburtsdatum und -ort:** 3. August 1966, Tübingen
- **Eltern:** Prof. Dr. rer. nat. Friedhelm Schneider, Hochschullehrer (Biochemie), Marianne Schneider, geb. Meier, Hausfrau
- **Ehestand:** seit Mai 1991 verheiratet mit Prof. Dr. Ulrich Amon, Hautarzt
- **Kinder:** im Juli 1993 Geburt des Sohnes Julian Leander

2. Schulische Ausbildung

- bis 1977: Besuch der Mittelpunktschule Marburg/Cappel
- bis 1986: Besuch des Gymnasium Philippinum Marburg/Lahn
- Juni 1986: Abitur (Allgemeine Hochschulreife)

3. Studium und beruflicher Werdegang

- WS 1986: Beginn des Studiums der Biologie und der Chemie für das Lehramt an Gymnasien an der Philipps-Universität, Marburg/Lahn
- SS 1988: Zwischenprüfung
- WS 1989: Fortsetzung des Studiums an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br.
- SS 1990: Praktikum in der Pharmaforschung bei F. Hoffmann-La Roche, Basel
- SS 1991: Rückkehr an die Philipps-Universität, Marburg/Lahn
- WS 1991: Anfertigung der experimentellen Staatsexamens- und Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Pflanzenphysiologie der Philipps-Universität, Marburg/Lahn
- November 1992: Erstes Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien in den Fächern Biologie, Chemie und Pädagogik
- Mai 1993: Beginn des Vorbereitungsdienstes (Referendariat) am Studienseminar in Lüneburg. Vorzeitige Beendigung wegen Geburt des Kindes
- September 1993: Diplomhauptprüfung für das Fach Biologie an der Philipps-Universität, Marburg/Lahn
- August 1995-April 1996: Wissenschaftliche Tätigkeit an der Medizinischen Universität zu Lübeck, Institut für Physiologie, Prof. Dr. Jelkmann (Wiedereinstieg-Stipendium)
- Mai 1996: Umzug nach Hersbruck und Unterrichtstätigkeit an verschiedenen Krankenpflegesschulen in der Region Nürnberg
- März 1999: Beginn der externen Promotion in der PsoriSol-Klinik Hersbruck bei Nürnberg, Klinik für Dermatologie und Allergologie