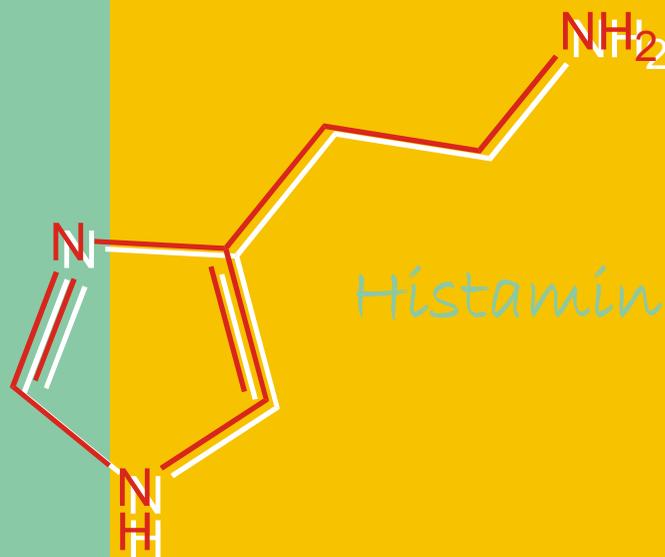


Modulation der Histaminfreisetzung aus Schweinehaut, humaner Haut sowie humanen Bronchien



BJÖRN HOELPER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Betreuer: Prof. Dr. I. Wessler

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. R. Gerstberger

Modulation der Histaminfreisetzung aus Schweinehaut, humaner Haut sowie humanen Bronchien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität
Gießen

Eingereicht von
BJÖRN HOELPER
aus Düsseldorf

Mainz, 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ignaz Wessler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2004

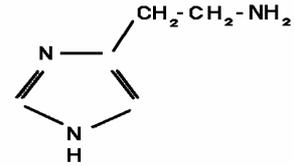
Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Histamin	1
1.2	Vorkommen von Histamin	1
1.3	Biosynthese, Freisetzung und Abbau	2
1.4	Histaminrezeptoren und ihre Funktion	4
1.5	Die Mastzelle als ein Hauptspeicher von Histamin	6
1.6	Mastzellmediatoren	7
1.7	Mastzellaktivierung	9
1.8	Pharmakologische Beeinflussung von Mastzellen	10
2.	Ziel der Untersuchung	13
3.	Material und Methoden	15
3.1	Gewebe und Präparation	15
3.1.1	Hautgewebe von Mastschweinen	15
3.1.2	Humane Haut	15
3.1.3	Humane Bronchien	16
3.2	Versuchsaufbau	17
3.3	Allgemeiner Versuchsablauf	17
3.3.1	Schema des Versuchsprotokolls	18
3.4	Spezieller Versuchsablauf	19
3.4.1	Stimulation der Histaminfreisetzung aus der Haut von Mastschweinen	19
3.4.2	Stimulation der Histaminfreisetzung aus humaner Haut	20
3.4.3	Stimulation der Histaminfreisetzung aus humanen Bronchien	20
3.5	Analytik	21
3.5.1	Derivatisierung von Proben und Standards	21
3.5.2	Protokoll der Derivatisierung	22

3.5.3	Messung der Histaminkonzentration mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie	22
3.6	Berechnung, graphische Darstellung und Statistik	24
3.6.1	Berechnung der Histaminkonzentration der Proben	24
3.6.2	Auswertung der Freisetzungsversuche	24
3.6.3	Statistik und graphische Darstellung	25
3.7	Substanzliste und verwendete Lösungen	26
4.	Ergebnisse	28
4.1	Histaminfreisetzung aus der Haut von Mastschweinen	28
4.1.1	Bestimmung der Ruheabgabe	28
4.1.2	Versuche zur Stimulation der Histaminfreisetzung	29
4.1.3	Kontrollversuche mit Compound 48/80	29
4.1.4	Auswirkung von FE 200440 auf die Histaminfreisetzung	31
4.1.5	Kontrollversuche mit A23187	34
4.2	Histaminfreisetzung aus humaner Haut	35
4.2.1	Kontrollversuche mit Compound 48/80	35
4.2.2	Auswirkung von FE 200440 auf die Histaminfreisetzung	36
4.2.3	Auswirkung des Acetat-Puffers auf die Histaminfreisetzung	39
4.3	Histaminfreisetzung aus humanen Bronchien	41
4.3.1	Kontrollversuche mit A23187	41
4.3.2	Auswirkung von FE 200440 auf die Histaminfreisetzung	42
4.3.3	Auswirkung des Acetat-Puffers auf die Histaminfreisetzung	44
4.4	Histaminfreisetzung aus humanen Bronchien von Patienten mit oder ohne COPD	48
4.4.1	Histaminfreisetzung aus Bronchien von Patienten ohne oder mit leichter COPD	50
4.4.2	Histaminfreisetzung aus Bronchien von Patienten mit schwerer COPD	51
5.	Diskussion	53
5.1	Analytisches Verfahren	53
5.2	Freisetzungsversuche	54

5.2.1	Haut von Mastschweinen	54
5.2.2	Humane Haut	56
5.2.3	Humane Bronchien	58
5.3	Muskarinerge Inhibition der Mastzellfunktion humaner Bronchien	60
6.	Zusammenfassung	68
7.	Literaturverzeichnis	69
8.	Danksagung	84

1. Einleitung



1.1 Histamin (5-[aminoäthyl]imidazol)

Bereits im frühen 20. Jahrhundert wurden Histamin und besonders seine physiologischen Effekte auf glatte Muskulatur und Blutgefäße von Dale und Laidlaw (1910) beschrieben. Sie zeigten, dass Histamin eine Obstruktion der Bronchien durch Kontraktion der Bronchialmuskulatur sowie eine lokale Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur verursachte (Dale und Laidlaw, 1910). Sie stellten einen Zusammenhang zwischen der Wirkung von Histamin und einer anaphylaktischen Reaktion her, die nach Injektion von Fremdprotein in die Haut von vorher sensibilisierten Tieren auftrat. Lewis T. (1927) beschrieb eine, durch Histamin verursachte, charakteristische Rötung der Haut, Austritt von Plasma und die Entwicklung eines Ödems, begleitet von Juckreiz (Lewis T., 1927). Im gleichen Jahr gelang es Best und Mitarbeitern, Histamin aus dem Gewebe von Säugetieren zu isolieren (Best et al., 1927). Aufgrund der Erkenntnis, dass es bei Zerstörung von Gewebe zu einer Histaminfreisetzung kam, wurde die Theorie entwickelt, Histamin sei ein endogener Mediator bei Zellschädigungen (Best et al., 1927). Spätere Studien lieferten eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Erkenntnissen über die Rolle von Histamin, zum Beispiel bei Entzündung, Allergie, Anaphylaxie und bestimmten Reaktionen auf Arzneimittel. Eine Beteiligung von Histamin bei Allergien beschrieben Schild et al. schon 1951 anhand von Messungen der immunologischen Histaminfreisetzung aus Bronchialgewebe allergischer Testpersonen (Schild et al., 1951). Vugman und Rocha e Silva (1966) führten umfangreiche Untersuchungen über den Histamingehalt von Organen und Körperflüssigkeiten verschiedenster Tierspezies durch (Vugman und Rocha e Silva, 1966). 1953 wurde Histamin erstmals in Zusammenhang mit Mastzellen gebracht (Riley und West, 1953). Seine Funktion als Mediator bei entzündlichen Erkrankungen und akuten allergischen Reaktionen beschrieb Metcalfe 1997 in einer ausführlichen Übersichtsarbeit (Metcalfe et al., 1997).

1.2 Vorkommen von Histamin

Endogenes Histamin ist im Gewebe von Säugetieren weit verbreitet, die Konzentration variiert jedoch zwischen einzelnen Organen sowie bei unterschiedlichen Spezies stark (Forth

et al., 1996). Der Gewebsgehalt ist zum Beispiel relativ hoch bei Ziegen, Hunden und Schweinen und gering bei Pferden, Kaninchen und Meerschweinchen (Lorenz et al., 1973). Beim Menschen enthalten Lungen, Haut und Magen-Darmtrakt die höchsten Mengen an Histamin (Dvorak, 1998).

Histamin ist in verschiedenen Geweben von Säugetieren gespeichert, wobei die Verteilung auf die einzelnen Gewebe artspezifisch ist (Kilzer et al., 1985). Histamin kommt zum einen in einer biologisch inaktiven Form in den Granula von Mastzellen und basophilen Leukozyten und zum anderen in den enterochromaffinartigen Zellen, sogenannten Histaminozyten, der Magenschleimhaut und in histaminergen Neuronen im Gehirn vor (Uvnas, 1992). Die höchsten Konzentrationen von Histamin sind im Bindegewebe des Körpers zu finden, entsprechend der Bereiche, in denen viele Bindegewebsmastzellen vorkommen (Iwamura et al., 2002). Dies trifft besonders in Umgebung von Blutkapillaren, Nerven und in der Nähe von Oberflächen, die mit der äußeren Umwelt interagieren, zu (Garbarg et al., 1976). Im Gehirn wird Histamin in spezifischen histaminergen Neuronen gebildet, die besonders in hypothalamischen und medullären Kerngebieten lokalisiert sind. Aufgrund des Histamingehaltes von Thrombozyten, in denen nur geringe Mengen zu messen sind, und basophilen Leukozyten ist der eigentliche Histamingehalt im Blut wesentlich höher als im Plasma. Im anaphylaktischen Schock kann der Histaminspiegel im Plasma jedoch auf mehr als den hundertfachen Wert steigen (Levy et al., 1986).

1.3 Biosynthese, Freisetzung und Abbau

Histamin ist das einzige biogene Amin, das in Mastzellen gebildet wird (Metcalf et al., 1997). Es wird durch das Enzym Histidin-Decarboxylase aus der Aminosäure L-(+)-Histidin im Golgi-Apparat der Zellen synthetisiert (White et al., 1987). Das spezifische Enzym kommt vor allem in Gewebsmastzellen und basophilen Leukozyten vor, in deren Granula Histamin gespeichert wird. Dort geht Histamin mit dem Mucopolysaccharid Heparin und einem basischen Protein eine ionale Bindung ein (Abb. 1.3), was zur biologischen Inaktivierung führt (Uvnas et al., 1970).

Das in den sekretorischen Granula gespeicherte Histamin kann durch unterschiedliche Faktoren freigesetzt werden. Der einfachste Weg ist die Zerstörung der Mastzelle, zum Beispiel durch ein Trauma (Nielsen et al., 1996). Der physiologisch bedeutendere Weg ist die Histaminfreisetzung durch Stimulation der Mastzelle. Diese erfolgt entweder als

immunologische Antwort auf Antigenkontakt, insbesondere bei Allergie oder durch verschiedenste Arzneimittel und Chemikalien (Amon et al., 1996; Weltman, 2000). Auf biochemischer Ebene kommt es bei Mastzellstimulation zu bekannten, sekretorischen Vorgängen wie Aktivierung der Phospholipase C, Bildung von Diacylglycerin und IP_3 sowie Mobilisierung von Ca^{2+} . Der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle führt zu einer Fusion der sekretorischen Granula mit der Zellmembran, was letztlich zur Exocytose führt (Wu et al., 1993). Nach der Exocytose wird der Ladungsausgleich der Zelle durch Aufnahme von extrazellulären Kationen wiederhergestellt. Histaminliberation durch Arzneimittel tritt bei verschiedenen Substanzen auf, besonders bei intravenöser sowie subkutaner Applikation (Clough, 1999). Nachweislich setzen Pharmaka, wie zum Beispiel Tubocurarin, Morphin, Codein, Papaverin sowie einige Röntgenkontrastmittel, Narkotika und Chemotherapeutika Histamin frei (Mutschler und Schäfer-Korting, 1996). In den meisten Fällen ist die Menge an freigesetztem Histamin erst bei hoher Dosierung signifikant. Bestimmte Substanzen, die als Histaminliberatoren eingestuft sind, besitzen weitaus höhere histaminfreisetzende Wirkungen (Sugimoto et al., 1998). Dazu gehört besonders *Compound 48/80*, ein Kondensationsprodukt aus p-Methoxyphenyläthylmethylamin mit Formaldehyd und das Kalziumionophor *A23187* (Goth und Johnson, 1975).

Weitere Substanzen wie Dextran, Albumin oder Histone können zu einer Histaminfreisetzung führen. Hierbei handelt es sich aber um ein allergisches Geschehen, bei dem es zur Bildung von Antikörperkomplexen kommt.

Der genaue Vorgang der immunologischen Mastzellstimulation wird im Kapitel „Mastzellaktivierung“ beschrieben.

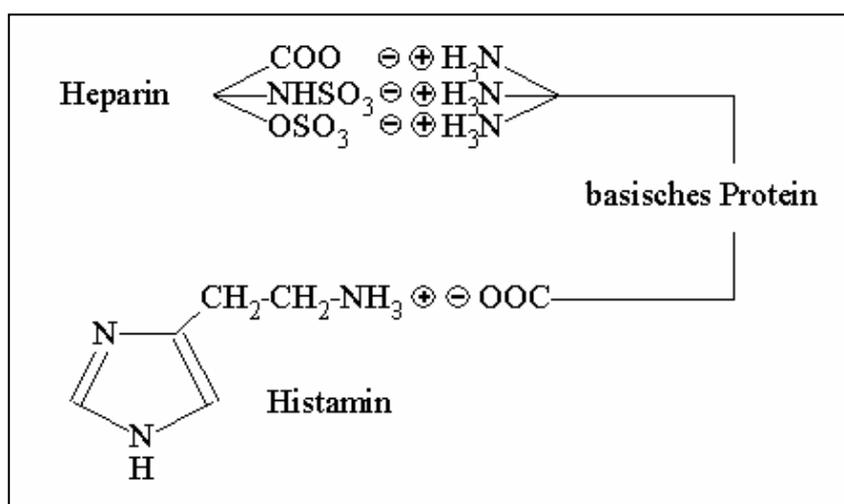


Abb. 1.3: ionale Bindung von Histamin im Mastzellgranulum (Uvnas et al., 1970)

Histamin wird mittels des Enzyms Histamin-N-Methyltransferase rasch im Körper deaktiviert (Sekizawa et al., 1993). Bei dem Abbau entsteht tele-Methylhistamin, das durch Monoaminoxidase B und einer Aldehyddehydrogenase weiter zu tele-Methylimidazolessigsäure umgewandelt wird und zu 70-80% über den Urin ausgeschieden wird (Granerus et al., 1998). Histamin kann auch auf direktem Wege durch das Enzym Diaminoxidase zu Imidazolessigsäure oxidiert werden; dieser Umbauvorgang ist jedoch von geringerer Bedeutung (Schayer und Karjala, 1956).

1.4 Histaminrezeptoren und ihre Funktion

Die Wirkung von Histamin wird durch bisher vier bekannte Rezeptoren vermittelt, i.e. H₁-, H₂-, H₃ und H₄-Rezeptoren (Karow, 1996; Schneider et al., 2002). Sie gehören zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. H₁-Rezeptorwirkungen werden über Phospholipase C vermittelt. Es kommt zur Bildung von IP₃ und Diacylglycerol aus Phospholipiden der Zellmembran, was letztlich zur Aktivierung von Proteinkinasen und Phospholipase A₂ führt (Stanimirovic et al., 1994). Der Stimulation von H₂-Rezeptoren folgt eine Aktivierung der Adenylatcyclase, was wiederum cAMP-abhängige Proteinkinasen aktiviert (Repka-Ramirez, 2003). H₁-Rezeptoren sind an Muskelzellen glatter Muskulatur, zum Beispiel der Bronchien, des Uterus oder des Darmes sowie Gefäßendothelzellen und sensible Nervenendigungen in der Haut oder Schleimhaut lokalisiert (Togias, 2003). Die Drüsen in der Magenschleimhaut sowie Gefäßmuskulatur besitzen H₂-Rezeptoren. H₃-Rezeptoren sind im ZNS lokalisiert, wo sie als präsynaptische Autorezeptoren die Histaminfreisetzung aus histaminergen Neuronen hemmen (Brown et al., 2001). Ein kürzlich neu entdeckter H₄-Rezeptor, der vorwiegend von medullären Zellen und peripheren Zellen der Hämatopoese (Eosinophile, Neutrophile und CD4+T Zellen) exprimiert wird, vermittelt vermutlich immunologische und hämatopoetische Funktionen (Schneider et al., 2002).

Jedem Rezeptortyp können spezifische Effekte zugeordnet werden. Die Wirkung und ihr Ausmaß sind innerhalb der einzelnen Tierspezies jedoch recht verschieden (Ahmed et al., 1980; McLeod et al., 1994). Im Weiteren werden, wenn nicht anders erwähnt, die Wirkungen beim Menschen beschrieben.

Histamin verursacht über H₁-Rezeptoren eine Kontraktion glatter Muskulatur, besonders in Bronchien und im Darm (Knight et al., 1997). Im Gegensatz dazu kommt es bei Wiederkäuern am Vormagen zu einer Relaxation (Noble et al., 1986). Die

Bronchokonstriktion ist, pathophysiologisch gesehen, von großem Interesse, bedenkt man die Auswirkungen bei allergischem Asthma oder COPD-Erkrankung bei Pferden. Verursacht wird die Kontraktion der glatten Muskulatur durch vermehrte Kalzium-Mobilisation, das zur Bildung von Ca^{2+} -Calmodulin führt. Dieses aktiviert wiederum eine Myokinase, die eine Phosphorylierung des Myosins bewirkt und somit zur Kontraktion führt (Knight et al., 1997). Bei Schafen führt Histamin zu einer Bronchorelaxation, da ihre Brochialmuskulatur vorwiegend H_2 -Rezeptoren besitzt (Parsons et al., 1992). Eine weitere H_1 -Rezeptor-vermittelte Histaminwirkung ist eine Blutdrucksenkung durch Vasodilatation und Permeabilitäts­erhöhung in kleinen Venolen. Die Gefäßerweiterung wird auf zwei Wegen vermittelt, bei der auch H_2 -Rezeptoren beteiligt sind. Die Stimulation der H_1 -Rezeptoren bewirkt eine Freisetzung von Stickstoffmonoxyd. Dies aktiviert die Guanylatzyklase und es kommt zur Erschlaffung der Gefäßmuskulatur (Beyak und Vanner, 1995). Die Bindung von Histamin an H_2 -Rezeptoren der Muskelzellen führt zu einer cAMP-vermittelten Tonusverminderung der Muskulatur (Fullerton et al., 1996). Die Permeabilitäts­erhöhung wird auf eine Kontraktion der Gefäßendothelzellen zurückgeführt. Es kommt zum Austritt von Plasma in den Extravasalraum und ein Ödem entsteht (Abbott, 2000).

Die charakteristische Symptomatik bei Kontakt von Histamin mit der Haut führt zu der sogenannten „triple response“, wie sie zum Beispiel bei der Berührung von Brennnesselhaaren auftritt (Greaves und Sabroe, 1996). Die erste Reaktion ist eine punktförmige, direkt erscheinende Rötung. Darauf folgt nach ca. 30-45 Sekunden die Entstehung eines vorübergehenden, unregelmäßig begrenzten Erythems. Der dritte Effekt ist das Ödem. Die Ursache für diesen Reaktionskomplex ist die beschriebene Histaminwirkung auf lokale Arteriolen und Venolen sowie sensible Nervenendigungen (Greaves und Sabroe, 1996).

Drüsenzellen in der Magenschleimhaut besitzen H_2 -Rezeptoren. Bei Erregung durch Histamin kommt es zu einer vermehrten Sekretion von Magensäure und Pepsin (Pendleton et al., 1985). Daraus ergibt sich eine große, therapeutische Bedeutung der H_2 -Rezeptor-Antagonisten bei der Behandlung zum Beispiel von Gastritis oder Magengeschwüren besonders bei Hund, Katze oder Fohlen.

Experimentell kann eine H_2 -Rezeptor-vermittelte, positiv chronotrope und inotrope Wirkung an Herzmuskelzellen hervorgerufen werden. Eine Bedeutung ist aber fraglich, denn solche Effekte sind eher auf eine reflektorische Zunahme der Sympathikusaktivität zurückzuführen (Kopec et al., 2001).

Juckreiz und Schmerzen sind unter anderem H_1 -Rezeptor vermittelt, die an sensiblen Nervenendigungen lokalisiert sind (Wahlgren, 1991).

1.5 Die Mastzelle als ein Hauptspeicher von Histamin

Der Entdecker der Mastzellen, Paul Ehrlich (1878), gab diesen Zellen ihren Namen aufgrund der Annahme, es handele sich bei dem Inhalt dieser granulabeladenen Zellen um Phagozytosematerialien. Später stellte sich jedoch heraus, dass es sich um Speichergranula mit einer Vielzahl an Botenstoffen handelte (Uvnas, 1969). Die Aufgaben von Mastzellen sind sehr vielfältig. Sie spielen hauptsächlich eine Rolle bei angeborenen Immunitäten, Abwehrreaktionen des Körpers gegen Fremdmoleküle und infektiöse Agentien, besonders parasitäre Infektionen, anaphylaktische Reaktionen, Modulation des Immunsystems, Gewebsreparaturen und der Angiogenese (Knudsen und Johansen, 1990).

Mastzellen sind im gesamten Körper im Gewebe ansässig, besonders in der Umgebung von Blutgefäßen, Lymphgefäßen, Nervenendigungen und in der Nähe von epithelialen Oberflächen der Haut, des Respirationsapparates sowie der Mukosa des Gastro-Intestinal-Traktes (Lagunoff, 1972). Die Größe humaner Mastzellen variiert zwischen 5 und 15 μm . Ihr Erscheinungsbild ist meist oval oder spindelförmig. Hauptcharakteristika sind zytoplasmatische Granula mit einem Durchmesser von 0.2-0.5 μm , die zahlreiche, biologisch hochwirksame Mediatoren enthalten (Huntley, 1992). Die Gesamtzahl der Mastzellen beläuft sich beim Menschen auf $7-10 \times 10^3$ Zellen/ mm^3 Gewebe, je nach Organ, Alter und Geschlecht (Irani et al., 1989). Mastzellen entstehen aus multipotenten CD34+Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, welche anschließend als mononukleare Zellen im Blut zirkulieren (Catto-Smith und Ripper, 1995; Ishizaka et al., 1993). Ihr typisches Erscheinungsbild erlangen Mastzellen erst nach Wanderung ins Gewebe, wo es zur Ausdifferenzierung der Zellen kommt (Church und Levi-Schaffner, 1997). Hierzu werden spezifische Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel „stem cell factor“ SCF und Interleukin-3, das von T-Lymphozyten gebildet wird, benötigt. Die Lebensdauer von Mastzellen kann Monate bis Jahre betragen (Ishazaka et al., 1993).

Unterteilt werden Mastzellen anhand der Morphologie und ihrer biochemischen Eigenschaften (Lee et al., 1985). Die meisten Mastzellen der Haut und der Submukosa des Darmes enthalten zytoplasmatische Granula mit gitterförmiger Struktur. Die Granula der Mastzellen in der Lunge und der Mukosa des Darmes besitzen hauptsächlich

schneckenähnliche Strukturen (Devorak, 2002). Biochemische Untersuchungen zeigen ebenfalls Unterschiede dieser beiden Zelltypen anhand ihres Gehaltes an neutralen Proteasen. Die Hauptzahl der Mastzellen mukosaler Oberflächen enthalten nur Tryptase. Dieser Phänotyp wird als MC_T bezeichnet (Lee et al., 1985). Bei parasitären und allergischen Erkrankungen ist besonders dieser Zelltyp vermehrt. Mastzellen des Bindegewebes und serosaler Oberflächen enthalten granulaassoziierte Tryptase und Chymase. Dieser Phänotyp wird als MC_{TC} bezeichnet (Ishizaka et al., 1991). Aufgaben dieses Zelltyps liegen wahrscheinlich im Rahmen von Reparaturvorgängen des Gewebes, der Angiogenese und der Thrombenbildung (Irani et al., 1989). Nur selten findet man den MC_C-Typ, der nur Chymase enthält. Damit Mastzellen auf die unterschiedlichen Stimuli und pharmakologischen Substanzen reagieren können, exprimieren sie eine Vielzahl an Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen, wie zum Beispiel MHC (*major histocompatibility complex*), CR (*complement receptors*), ICAM (*intercellular adhesion molecule*) und Integrine (Pearce et al., 1985).

1.6 Mastzellmediatoren

Mastzellen üben ihre lokalen und systemischen Effekte durch die Freisetzung einer Vielzahl von biologisch aktiven Mediatoren aus. Nicht jede Mastzelle enthält alle oder die gleiche Menge an Mediatoren. Die Ausprägung der Mediatoren ist abhängig von der Lokalisation der Zelle, des Reifestadiums und ihrer Beeinflussung durch die Umgebung (Ishizaka et al., 1993). Man unterscheidet die Botenstoffe der Mastzellen in präformierte Mediatoren, die in den sekretorischen Granula gespeichert sind und bei Mastzellaktivierung freigesetzt werden, und Mediatoren, die bei Stimulation neu gebildet werden (Church et al., 1991). Zur ersten Gruppe gehören vor allem Histamin und die neutralen Proteasen, Tryptase oder Chymase sowie die Proteoglykane Heparin und Chondroitinsulfat. MC_{TC}-Zellen enthalten zusätzlich noch eine Carboxypeptidase und Cathepsin G (Church et al., 1991). Zu der zweiten Gruppe gehören die Lipidmediatoren Prostaglandin PGD₂ und PGB₂, Leukotrien LTC₄ und LTD₄, Thromboxan B₂, und der Plättchen-Aktivierende-Faktor PAF. Eine dritte wichtige Gruppe von Botenstoffen in Mastzellen sind die Zytokine. Hierzu zählen die Interleukine (IL), nachweislich IL-1, -3, -4, -6, -8, -10, -12, -13 und -16 sowie der Tumornekrosefaktor TNF- α (Henz et al., 2001). Interleukin-8 und TNF- α sind, ähnlich den präformierten Mediatoren, in der Mastzelle gespeichert. Die anderen Interleukine werden erst nach Stimulation gebildet

(Gibbs et al., 2001). Im Weiteren wird kurz auf die wichtigsten Funktionen und Wirkungen einzelner Mediatoren eingegangen.

Heparin besitzt antikoagulatorische Wirkung, es bindet mit Antithrombin-3 und senkt die Complementaktivierung. Desweiteren unterstützt Heparin die Bindung des Fibronektins an Kollagen und reguliert die Aktivität von Tryptase, Chymase sowie neutrophiler Elastase (Hallgren et al., 2001).

Tryptase spaltet Fibrinogen, steigert die Fibroblastenproliferation und senkt die Blutgerinnung durch Beeinflussung des Hageman-Faktors (Wang et al., 1998).

Durch das Enzym Chymase wird die Epidermis von der Dermis gelöst, Angiotensin I zu Angiotensin II gewandelt, die Zahl der Keratinozyten verringert und das Fibroblastenwachstum gehemmt. Die Wirkung der Carboxypeptidase ist ähnlich (Naukkarinen et al., 1994).

Lipidmediatoren besitzen inflammatorische Eigenschaften. Prostaglandin D₂ führt zu Vasodilatation kleiner Venolen sowie Bronchokonstriktion, erhöht die Gefäßpermeabilität, hemmt die Thrombozytenaggregation und besitzt chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten (Matsuoka et al., 2000). Die Leukotrine C₄ und D₄ besitzen ebenfalls vasodilatatorische und permeabilitätssteigernde Wirkung (Secrest und Chapnick, 1988). Außerdem vermitteln sie die Synthese von Prostaglandin PGD₂, PGB₂ und Leukotrin E₄. Neben gerinnungsfördernden Eigenschaften besitzt der Plättchen-Aktivierende-Faktor PAF noch chemotaktische Wirkung auf Monozyten (Heller et al., 1998).

Zytokine vermitteln unter anderem immunmodulatorische Effekte. TNF α steigert die Fibroblastensprossung, die Produktion von PGE₂ und Kollagenase. Es fördert die Freisetzung von Histamin und Tryptase und induziert Adhäsionsmoleküle an Langerhansschen- und Epithelzellen (Holmdahl und Ivarsson, 1999). Interleukin-4 erhöht gleichfalls die Fibroblastenproliferation, IgE-Produktion, B- und T-Zellproliferation und senkt die Aktivität von Makrophagen. Interleukin-5 besitzt chemotaktische Wirkung auf Eosinophile und fördert deren Wachstum. Interleukin-6 steigert die IgE-Produktion sowie das T-Zellwachstum und deren Differenzierung (Hultner et al., 2000).

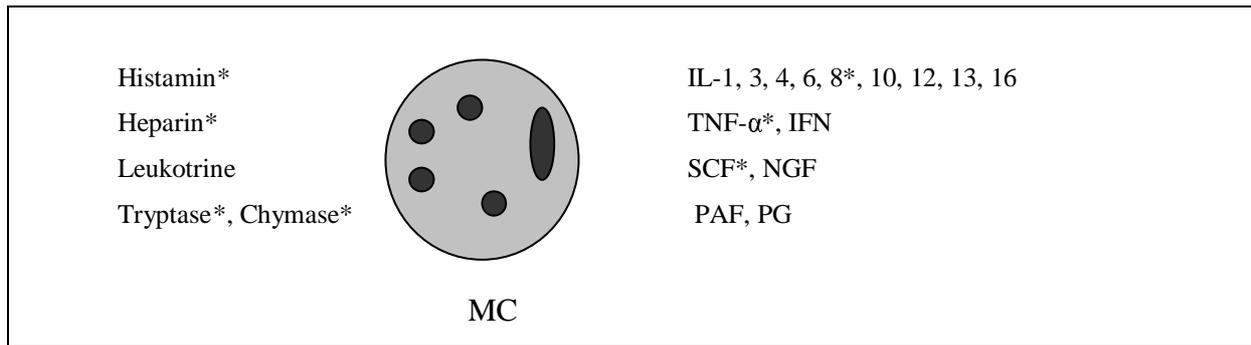


Abb. 1.5: Mediatoren der Mastzelle (MC); präformierte Mediatoren (*) und Mediatoren, die bei Mastzellstimulation neu gebildet werden. (PAF=Plättchen-Aktivierender-Faktor; PG=Prostaglandine; IL=Interleukin; TNF=Tumor Nekrose Faktor; IF=Interferone; SCF=*stem cell factor*; NGF=*nerve growth factor*)

1.7 Mastzellaktivierung

Die Mastzellstimulation kann auf immunologischem und auf nicht-immunologischem Wege ablaufen (Rosengard et al., 1986). Am intensivsten erforscht ist der Vorgang der immunologischen Aktivierung, bei der es durch „Cross-linking“ der Immunglobulin (IgE)-Antigenkomplexe an den hochaffinen Fc ϵ RI-Rezeptoren zur Verschmelzung der sekretorischen Granula mit der Plasmamembran und somit zur Exocytose der Mastzellmediatoren kommt (Pearlman, 1999). Biochemisch gesehen bewirkt „Cross-linking“ eine Aktivierung der Phospholipase C, das zur Bildung der „second-messenger“ Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) führt. IP3 ist verantwortlich für den Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels (Broide, 2001). Proteinkinasen C (PKC) werden Kalziumabhängig an die Zellmembran gekoppelt und aktiviert. Im Weiteren wird die Phospholipase A2 und D aktiviert und es kommt zur Bildung der sogenannten Fusogene, Lysophosphatidylcholin und Lysophosphat, was letztendlich zur exozytotischen Sekretion der Mediatoren führt (Ishizaka et al., 1987).

Die Aktivierung der Mastzellen kann aber auch durch andere Substanzen ausgelöst werden, zum Beispiel durch Opiate, Röntgenkontrastmittel, Polymyxin B, Zytokine, Neuropeptide, dem Histamin-Releasing-Faktor und Fremdmolekülen, wie zum Beispiel Lipopolysacchariden (LPS) aus Bakterienwänden (Rosengard et al., 1986). Untersuchungen zeigen, dass unterschiedliche Stimuli wahrscheinlich auf verschiedenen biochemischen Wegen die Freisetzung der Mediatoren verursachen. Die Art der Stimulation und die Lokalisation der Mastzellen im Gewebe führen zu einer sehr unterschiedlichen Reaktion der einzelnen Mastzellen und auch zur Freisetzung unterschiedlicher Botenstoffe und deren Menge (Church

et al., 1991). Zum Beispiel führen Substanzen wie Compound 48/80, Substanz P, Complement C5a und das Vasoaktive Intestinale Peptid (VIP) zu einer Mediatorfreisetzung aus Mastzellen humaner Haut, haben aber wenig Effekt auf Mastzellen in Lunge und Darm (Church et al., 1991).

1.8 Pharmakologische Beeinflussung von Mastzellen

Die Degranulation von Mastzellen und ihre Folgen können auf zwei Arten medikamentös gesteuert werden. Mastzellstabilisatoren werden prophylaktisch zur Hemmung der Freisetzung von Histamin und Leukotrienen eingesetzt (Marone et al., 1998). Im Gegensatz dazu werden Antihistaminika als kompetitive Rezeptorantagonisten in der Therapie eingesetzt, um die Wirkung von Histamin aufzuheben (Graziano et al., 2000; Herman und Bernhard, 1991).

Die einzig bekannten Substanzen, die Mastzellen stabilisieren, sind Cromoglycinsäure, das strukturverwandte Nekomil sowie β_2 -Sympathomimetika (Marone et al., 1998). Der eigentliche Wirkungsmechanismus ist bisher nicht geklärt, nachgewiesen ist lediglich die Blockade von Chloridkanälen aktivierter Mastzellen nach Anreicherung der Substanzen in der Membran (Albegger, 1990). Mastzellstabilisatoren kommen bei allergischen Geschehen sowie lokal bei allergischer Konjunktivitis zum Einsatz (Bielory, 2002). Für beide Substanzen liegen jedoch noch keine Erfahrungen beim Tier vor.

Weit größere Bedeutung kommt den Antihistaminika zu. Anhand ihrer Rezeptorbindung unterscheidet man zwischen H_1 - und H_2 -Antihistaminika (Black et al., 1972). Indikation der H_1 -Antihistaminika sind die Prophylaxe und die Therapie allergischer Erkrankungen, wie zum Beispiel Heuschnupfen, Urtikaria, Quincke-Ödem, Serumkrankheit oder Insektenstiche (Herman und Bernhard, 1991). Die „erste Generation“ der H_1 -Antihistaminika reagiert relativ unspezifisch auch mit anderen Rezeptortypen, zum Beispiel muscarinischen Acetylcholin-Rezeptoren und zeigt daher verschiedene Nebenwirkungen wie zentral-dämpfende oder antiemetische Effekte (Aelony, 1998). Zu dieser Gruppe gehören Clemastin, Dimetinden, Levocabastin, Fenestil, Pheniramin, Bamipin und die häufig in der Veterinärmedizin eingesetzten Vertreter Mepyramin und Diphenhydramin (Benadryl) (Löscher et al., 1994). Die sedierenden Wirkungen von Diphenhydramin und Doxylamin sind so ausgeprägt, dass diese als Schlafmittel oft beim Transport von Tieren (zum Beispiel Hunden) eingesetzt

werden. Meclozin, Promethazin und Dimenhydrinat werden als Antiemetika in der Therapie eingesetzt (Mutschler und Schäfer-Korting, 1996).

Zu der „zweiten Generation“ der H₁-Antihistaminika zählen die Terfenadin-Metabolite Fexofenadin, Astemizol, Azelastine, Cetrizin, Mizolastin, Loratidin sowie Ketotifen. Sie besitzen durch höhere Rezeptorselektivität und Abwesenheit von zentral-nervösen Nebenwirkungen einen deutlich besseren therapeutischen Nutzen (Mutschler und Schäfer-Korting, 1996).

H₂-Antihistaminika regulieren die Histamin-gesteuerte Salzsäureproduktion der Belegzellen im Magen, was ihren Einsatz in der Ulcusterapie bedingt. Anwendungsgebiete sind unter anderem auch Ulcus-Rezidivprophylaxe, Gastritis, Reflux-Ösophagitis oder andere Schleimhautläsionen. Verwendete Substanzen sind Famotidin, Nizatidin, Roxatidin und vor allem, besonders in der Veterinärmedizin bei Hund und Katze eingesetzt, Cimetidin und Ranitidin (McQuaid und Isenberg, 1992; Löscher et al., 1994).

Muskarinerge Inhibition der Mastzellfunktion

Anticholinergika werden häufig in der Behandlung von chronischen obstruktiven Lungenerkrankungen eingesetzt (Barnes, 2003; Beeh et al., 2000). Ihre bronchienerweiternde Wirkung wird über eine Blockade der M₃ Rezeptoren an der glatten Bronchialmuskulatur vermittelt. Desweiteren kann eine Blockade muskarinerger M₁ Rezeptoren durch die Hemmung der Signalübertragung peripherer Nervenendigungen zur Abnahme des Vagustonus und somit zu einer Verminderung der Sekretion submuköser Drüsen führen (Campbell, 2000).

Die Histaminfreisetzung aus mukosalen Mastzellen humaner Bronchien wird durch einen inhibitorischen Muskarinrezeptor vom Subtyp M₁ reguliert (Reinheimer et al., 2000). Blockade der Rezeptoren durch muskarinergen Antagonismus führt zu erhöhter exocytotischer Aktivität der Mastzellen und so zu einer Steigerung der Histaminfreisetzung.

Atropin und Scopolamin, die natürlichen Alkaloide der Tollkirsche und des Stechapfels sind wohl die bekanntesten Anticholinergika, doch wegen ihrer ausgeprägten systemischen Nebenwirkungen besitzen sie nur eingeschränkte Anwendung als Therapeutika (Löscher et al., 1994). Derzeit in der Behandlung von Bronchialobstruktionen bei COPD eingesetzte Substanzen sind die quartären Derivate Ipratropiumbromid und Oxitropiumbromid, die beide unselektiv an allen Muskarinrezeptorsubtypen binden sowie Tiotropiumbromid, ein

Antagonist mit einer geringen M3 Rezeptorblockade (Witek, 1999). Diese Substanzen können nicht durch die Blut-Hirn-Schranke diffundieren. Außerdem zeigen sie auch in hohen Dosen keine cardiogenen Seiteneffekte und sind daher in der Therapie als Bronchodilatator sehr geeignet. Jedoch wird durch die Blockade der inhibitorischen M1 muskarinergen Rezeptoren gleichzeitig auch die cholinerge Kontrollfunktion der Mastzellen unterdrückt. Das erklärt die teilweise bei Patienten aufgetretene paradoxe Bronchokonstriktion nach Inhalation von Ipratropiumbromid (Disse, 2001). In der Veterinärmedizin finden die Substanzen Ipratropiumbromid, Oxitropiumbromid sowie Tiotropiumbromid bisher keinen Einsatz in der Therapie von Bronchialobstruktionen, zum Beispiel bei COPD-Erkrankung bei Pferden, da diese ausschließlich inhalativ applizierbar sind und es ein hohes Maß an „Mitarbeit“ des Patienten bedarf, um einen ausreichenden Wirkspiegel zu erreichen. Duvivier und Mitarbeiter bewiesen, dass es zu keiner ausreichenden bronchodilatatorischen Wirkung nach Inhalation von Ipratropiumbromid in der Erholungsphase nach einem COPD-Anfall kam (Bayly et al., 2002; Duvivier et al., 1999). Mittel der Wahl in der Therapie von COPD bei Pferden sind heute spezifische β_2 -Sympathomimetika besonders Clenbuterol. Diese werden oft in Kombination mit Glukokortikoiden eingesetzt (Sander et al., 2002; Harkins et al., 2000).

2. Ziel der Untersuchung

Das Vorkommen, die Freisetzung und die Wirkung von Histamin im Organismus sind weitreichend erforscht. Durch die deutliche Zunahme der Zivilisationskrankheiten und besonders der Allergien bei Mensch und Tier haben besonders Histamin aber auch alle anderen Mastzellmediatoren in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Eine Beteiligung zum Beispiel beim *Asthma bronchiale* ist unumstritten. Die außerordentlich komplexen Verhältnisse und Wechselwirkungen der Mediatoren in entzündlichen und allergischen Geschehen sind in ihren Wirkungswegen jedoch noch nicht vollständig geklärt. Neue Erkenntnisse über die physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften sowie die pharmakologische Beeinflussung von Mastzellen sind daher von großem Interesse.

Ziel der vorliegenden Arbeit war erstens, die Wirkung eines neuentwickelten Oxytocinantagonisten (Ferring Pharmazeutika, Kopenhagen) auf die Histaminfreisetzung aus humaner Haut zu untersuchen. Grundlage der Untersuchung war die Erkenntnis, dass der Oxytocinantagonist nach subkutaner Injektion eine konzentrationsabhängige Hautrötung hervorrief. Hierfür sollte eine bereits etablierte Methode zur Messung des freigesetzten Histamins aus Bindegewebsmastzellen im Zellverband verwendet werden (Reinheimer et al., 1997). Die quantitative Auswertung sollte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie erfolgen. Zusätzlich sollte die Wirkung der Oxytocinantagonisten an mukosalen Mastzellen humaner Bronchien getestet werden.

Die zweite Fragestellung der Arbeit lautete, ob die, bei humanem Gewebe angewendete Methodik von Reinheimer et al., an Schweinehaut reproduziert werden kann. Die basale Histaminfreisetzung und die Degranulation der Bindegewebsmastzellen sollten untersucht werden. Um eine Histaminfreisetzung aus den Mastzellen zu provozieren, sollten die pharmakologischen Stimuli Compound 48/80 und das Kalziumionophor A23187 eingesetzt werden, um eine konzentrationsabhängige Wirkung zu erforschen. Desweiteren sollte ebenfalls die Wirkung des Oxytocinantagonisten (Ferring Pharmazeutika, Kopenhagen) auf die Histaminfreisetzung bei Schweinehaut untersucht werden.

Ein drittes Hauptziel der Arbeit war die Untersuchung, ob in der Aktivierung mukosaler Mastzellen aus humanen Bronchien Unterschiede bei Patienten mit oder ohne chronischen, obstruktiven Lungenerkrankungen vorliegen. Mukosale Mastzellen humaner Bronchien

unterliegen unter anderem der Kontrolle inhibitorischer Muskarinrezeptoren. Die Funktion inhibitorischer Muskarinrezeptoren kann unter inflammatorischen Bedingungen beeinträchtigt sein (Coulson und Fryer, 2003). Frühere Untersuchungsergebnisse hatten bereits erste Hinweise darauf ergeben, dass die M1-muskarinerge Inhibition der Mastzellfunktion bei Patienten mit schwerer COPD gestört war und es zu vermehrter Histaminfreisetzung kam. Der hemmende Effekt von Acetylcholin und Oxotremorin auf die durch den Kalziumionophor A23187-induzierte Histaminfreisetzung wurde mehrfach bewiesen (Reinheimer et al., 1997; Möhlig, 2000). Zur weiteren Untersuchung sollte daher die Wirkung von Oxotremorin, einem muskarinergem Agonisten und Acetylcholin, einem Agonisten an muskarinergen und nikotinergen Rezeptoren auf die basale und stimulierte Histaminfreisetzung aus Mastzellen humaner Bronchien von Patienten mit und ohne COPD geprüft werden.

3. Material und Methoden

3.1 Gewebe und Präparation

3.1.1 Hautgewebe von Mastschweinen

Die für die Versuche verwendete Haut von Mastschweinen wurde von einer lokalen Metzgerei zur Verfügung gestellt. Den frisch geschlachteten Tieren wurde direkt bei der Zerlegung ein Stück Bauchhaut der Größe 5x5 cm mit subkutanem Fettgewebe entnommen.

Die Haut wurde in einem mit gekühlter, physiologischer Nährlösung (Zusammensetzung siehe Substanzliste 3.7.1) gefüllten Behälter transportiert. Die Sauerstoffversorgung des Gewebes wurde mit Carbogen (95% Sauerstoff zu 5% Kohlendioxid) sichergestellt und damit ebenfalls ein konstanter pH-Wert von 7.3 der Nährlösung gewährleistet.

Im Labor erfolgte direkt im Anschluss die weitere Präparation der Haut in Stücke zu durchschnittlich 100 mg Feuchtgewicht. In einer mit Carbogen begaster Nährlösung gefüllten Petri-Schale wurde als erstes das subkutane Fettgewebe weitgehend entfernt, um möglichst nur Epidermis und Dermis zu erhalten. Dadurch wurde eine möglichst gute Versorgung des Präparates mit Sauerstoff, Nährstoffen und mit den eingesetzten Stimulantien während des Versuchsablaufes gewährleistet. Nach der Präparation wurden die Gewebstücke an den beiden gegenüberliegenden Enden mit Baumwollfäden versehen, um sie in den Organbädern der Versuchsapparatur zu fixieren. Die Zeit ab der Entnahme des Gewebes bis zum Beginn der Versuche dauerte maximal 60 Minuten.

3.1.2 Humane Haut

Die humane Haut wurde zum einen von der Klinik für Geburtshilfe und Frauenkrankheiten der Universitätsklinik Mainz, die im Rahmen von Mastektomien bei Patientinnen mit Mammakarzinom resiziert wurde, zur Verfügung gestellt, zum anderen von einer Klinik für Plastische Chirurgie in Mainz. In letzteren Fall stammte das Gewebe aus kosmetischen Operationen.

Die Haut wurde nach Resektion schnellstmöglich in oxygenierte Nährlösung überführt und im Labor präpariert. Der Vorgang entsprach dem der Haut von Schweinen, allerdings wogen die

Stücke im Durchschnitt 80 mg. Zur Fixierung der Präparate in den Organbädern wurden ebenfalls Baumwollfäden benutzt.

3.1.3 Humane Bronchien

Das Bronchialgewebe, das für die wissenschaftlichen Untersuchungen verwendet wurde, entstammte aus Lob- und Pneumektomien, die im Rahmen von Tumoroperationen im St. Hildegardis-Krankenhaus in Mainz und der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universität Mainz stattgefunden haben.

Der in der Operation entnommene Lungenlappen wurde direkt im Anschluss steril in die Pathologie der Universitätsklinik gebracht und dort wurden die Bronchien nach vorheriger Untersuchung durch einen Pathologen präpariert. Es wurde besonders darauf geachtet, dass die entnommenen Gewebstücke in ausreichendem Abstand zum Tumor entnommen wurden, um kein Tumorgewebe im Versuch zu verwenden. Im ersten Schritt wurden die Bronchien mit einem Durchmesser größer als 3 mm vorsichtig längs eröffnet und anschließend aus dem umliegenden Gewebe freipräpariert. Die Bronchien wurden sofort in Carbogen begaste, gekühlte Nährlösung gelegt, ins Labor transportiert und dort feinpräpariert. Das restliche umgebende Gewebe der Lunge wurde in mit begaster Nährlösung gefüllten Petri-Schalen weggeschnitten. Die meist vorhandenen Pigmentablagerungen, die sich durch Nikotinabusus angereichert hatten, wurden weitmöglichst entfernt. Daraufhin wurden Präparate von durchschnittlich 70 mg, gleich den Hautpräparaten, an den gegenüberliegenden Enden mit Baumwollfäden versehen und in die Organbäder gehängt.

Die wissenschaftliche Verwendung von reseziertem Operationsmaterial (sowohl Haut als auch Bronchialgewebe) war durch die zuständige Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt worden.

3.2 Versuchsaufbau

Die Organbäder (Dinkelacker, Mainz), in denen die Inkubationsversuche durchgeführt wurden, bestanden aus einem inneren Glaszylinder mit einem Innendurchmesser von 1,5 cm und einer Höhe von 8 cm sowie aus einem äußeren Glasmantel, durch den mittels Umlaufthermostat (Julabo P, Julabo Labortechnik) auf 37°C temperiertes Wasser floss, um die Nährlösung im inneren Teil zu erwärmen. Der innere Zylinder wurde nach unten mit einem Stopfen verschlossen, der einen Zugang für die Begasung mit Carbogen bot und einen

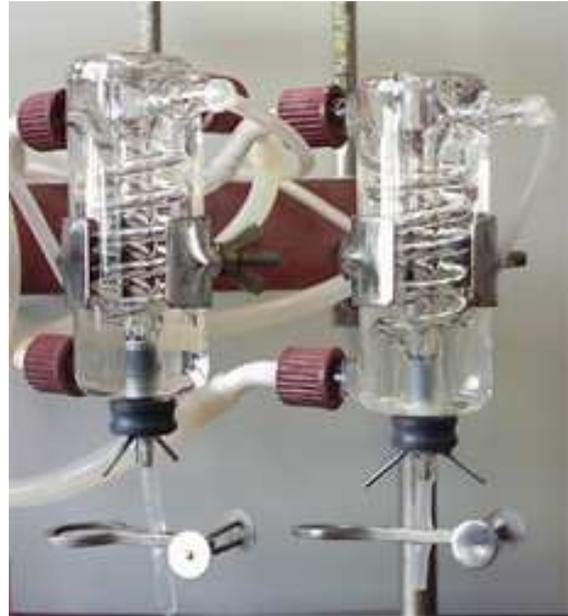


Abb.3.2: Zwei Organbäder (Dinkelacker, Mainz), in denen die Inkubationsversuche durchgeführt wurden.

Ablass, um die Proben zu sammeln. Die obere Öffnung blieb offen, damit die verschiedenen Substanzen zugegeben werden konnten. Der innere Zylinder verfügte weiterhin über jeweils einen spiralförmig, im äußeren Mantel verlaufenden Zufluss unten und einen Ablauf oben, über die mittels Peristaltikpumpe (Minipuls 2, Gilson, Viliers-Le Bell, Frankreich) ein konstantes Volumen an Nährlösung zu- beziehungsweise abgeführt werden konnte. Die Nährlösung wurde über den spiralförmigen Zulauf somit schon vor Erreichen des eigentlichen Organbades auf 37°C vorgewärmt. Im inneren Zylinder wurden dann die Gewebeproben mittels der genannten Baumwollfäden eingespannt.

3.3 Allgemeiner Versuchsablauf

Der Versuchsablauf wurde anlehnend an frühere Arbeiten zur Stimulation der Histaminfreisetzung aus Mastzellen gewählt (Baumgärtner, 1998; Zimmermann, 2000; Möhlig, 2000). Der allgemeine Verlauf, mit einer Gesamtdauer von 90 Minuten, war in zwei Phasen eingeteilt. Die erste Phase war die Äquilibrationsphase von insgesamt 30 Minuten, die zweite war die Sammelphase von insgesamt 60 Minuten. Nachdem die Organbäder auf 37°C vorgewärmt, mit Carbogen fortlaufend über den gesamten Zeitraum des Versuches

begast und die Gewebstücke eingespannt worden waren, begann die Äquilibrationsphase. In den ersten 15 Minuten wurden die Präparate mit Hilfe der Peristaltikpumpe bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min umspült. Dann wurde die Pumpe gestoppt und der Zufluss abgeklemmt.

Das Medium wurde abgelassen und 1,1 ml frische Pufferlösung wurde von oben in den Zylinder pipettiert. Die Gewebeproben mussten so positioniert sein, dass die Präparate mit 1,1 ml der Lösung vollständig umspült waren. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Lösung wieder abgelassen. Dieser Schritt wurde 3-mal wiederholt.

Nach der letzten Probe der Äquilibrationsphase begann direkt die Sammelphase von 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. 1,1 ml der Pufferlösung wurden in jedes Organbad pipettiert und nach 5 Minuten Inkubation in Eppendorf® Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 1,5 ml abgelassen. Die gesammelten Proben wurden auf Eis gekühlt und im Anschluss an den Versuch bei -20°C eingefroren.

Nach Ende des Inkubationsversuches wurden die Gewebstücke aus den Organbädern entnommen, die Baumwollfäden entfernt und anschließend das Feuchtgewicht bestimmt.

Die während der Versuche zugegebenen Lösungen wurden vorher im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und mit Carbogen begast.

3.3.1 Allgemeines Schema des Versuchsablaufes

Zeit in Minuten	Phase	Protokoll
1 - 15	Äquilibrationsphase	Superfusion des Gewebes mit Nährlösung (Pumpenfluss 2 ml / min)
16 - 30		Inkubation und Austausch des Organbadmediums (1,1ml Nährlösung) im Abstand von 5 Minuten
31 - 90	Sammelphase	Inkubation und Sammeln des Organbadmediums (1,1 ml) im Abstand von 5 Minuten zu 12 Proben

3.4 Spezieller Versuchsablauf

Aufgrund der unterschiedlichen Stimulation der Histaminfreisetzung aus humaner und Schweinehaut sowie aus humanen Bronchien und der Zugabe der verschiedenen Testsubstanzen ergaben sich geringe Unterschiede in der Durchführung der Versuche. Diese werden im Folgenden einzeln beschrieben.

3.4.1 Versuchsablauf zur Stimulation der Histaminfreisetzung aus der Haut von Mastschweinen

Die Freisetzung von Histamin aus den Gewebestücken wurde zum einen durch das Kalziumionophor A23187 und zum anderen durch die Zugabe von Compound 48/80 stimuliert. In den Versuchen mit dem Kalziumionophor A23187 wurde dieser in der 64. Minute, also in die 7. Probe der Sammelphase, zusätzlich in die Nährlösung pipettiert, so dass die Wirkdauer bei 1 Minute lag. Es wurden Konzentrationen von 3 μM und 10 μM getestet.

In Versuchen zur Stimulation durch Compound 48/80 wurde dieser in der 61. Minute zugegeben, ebenfalls zusätzlich in die 7. Probe, so dass die Einwirkzeit bei 5 Minuten lag. Hier wurden effektive Konzentrationen im Organbad von 0.055 mM, 0.164 mM und 0.3 mM getestet.

Zur Untersuchung der Histaminfreisetzung durch den Oxytocinantagonisten wurden Nährlösungen mit den effektiven Konzentrationen des Antagonisten von 0.03 mM, 0.3 mM und 3 mM angesetzt. 1,1 ml der Lösung wurden ab der 4. – 12. Probe (ab der 46. Minute), anstelle der eigentlichen Nährlösung, in das Organbad pipettiert und im regulären Wechsel des Mediums ausgetauscht und gesammelt. Zusätzlich wurde in den Versuchen mit dem Oxytocinantagonisten die Histaminfreisetzung, wie oben beschrieben, durch Compound 48/80 stimuliert.

In Kontrollversuchsreihen mit der Pufferlösung (Mannitolpuffer) des Oxytocinantagonisten wurde nach dem gleichen Schema vorgegangen. Die Zugabe geschah ebenfalls ab der 4. - 12. Probe (ab der 46. Minute) in der effektiven Konzentration im Organbad von 0.04 M Mannitol.

3.4.2 Versuchsablauf zur Stimulation der Histaminfreisetzung aus humaner Haut

Humane Haut wurde ausschließlich mit Compound 48/80 stimuliert. Hier wurde eine effektive Organbadkonzentration von 0.3 mM eingesetzt. Die Zugabe erfolgte, ebenso wie bei der Haut von Schweinen, in der 61. Minute (7. Probe).

Der Oxytocinantagonist wurde, wie oben beschrieben, in den Konzentrationen von 0.03, 0.3 und 3 mM wiederum direkt in der Nährlösung angesetzt und dann jeweils 1,1 ml der Lösung ab der 4. – 12. Probe in das Organbad pipettiert, im zeitlichen Rhythmus abgelassen und aufgefangen. Bei diesen Versuchen wurde Compound 48/80 ebenfalls in die 7. Probe gegeben, um die Freisetzung von Histamin zu induzieren.

Die Pufferlösung (Mannitolpuffer) des Oxytocinantagonisten wurde in der Konzentration von 0.04 M Mannitol getestet.

3.4.3 Versuchsablauf zur Stimulation der Histaminfreisetzung aus humanen Bronchien

In den Versuchen mit humanem Bronchialgewebe wurde das Kalziumionophor A23187 eingesetzt, um die Histaminfreisetzung zu stimulieren. Die Zugabe erfolgte in der 64. Minute, also der 7. Probe der Sammelphase. Damit lag die Wirkdauer hier bei 1 Minute. Es wurde jeweils ein Bolus von 50 μ l in das Organbad pipettiert, sodass sich eine Endkonzentration von 10 μ M ergab.

Zur Messung der Histaminfreisetzung durch den Oxytocinantagonisten wurde dieser, wie auch bei den Versuchen mit Hautgewebe, in den Konzentrationen von 0.03, 0.3 und 3 mM Nährlösung getestet. Der Ablauf der Versuche und der Test der Pufferlösung (0.04 M) waren analog zu den Versuchen mit Haut.

In einer späteren Versuchsreihe mit humanen Bronchien wurde versucht, die durch das Kalziumionophor A23187 stimulierte Histaminfreisetzung durch Zugabe von Oxotremorin und Acetylcholin zu beeinflussen.

Oxotremorin wurde in den effektiven Konzentrationen von 10 nM und 1 nM, Acetylcholin in den effektiven Konzentrationen 100 nM und 10 nM getestet. Beide Substanzen wurden direkt in der physiologischen Nährlösung gelöst und dann jeweils 1,1 ml der zu testenden Substanzlösung ab der 4. – 12. Probe, anstelle der eigentlichen Nährlösung, in das Organbad pipettiert. Die Proben wurden im ursprünglichen Zeitschema gesammelt.

3.5 Analytik

3.5.1 Derivatisierung von Proben und Standards

Die während des Versuches gesammelten Proben wurden zur nachfolgenden fluorometrischen Histaminbestimmung in einer Zentrifuge (Eppendorf Zentrifuge 3200) drei Minuten bei 12000 U/min zentrifugiert. Eventuelle Verunreinigungen, die die Messung beeinflussen oder die Trennsäule des HPLC-Systems verstopfen können, wurden damit ebenfalls sedimentiert.

900µl jeder Probe wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gestellt. Im Folgenden wurden zu jeder Probe 200µl 1 N Natronlauge pipettiert, um den pH-Wert der Lösung in einen basischen Bereich zu bringen, der für den nächsten Reaktionsschritt nötig war. Der folgende Schritt bestand dann aus der Zugabe von jeweils 200µl einer 0,1%igen Lösung O-Phthaldialdehyd in Methanol. Dadurch kam es zu einer Reaktion von Histamin mit O-Phthaldialdehyd, bei der zwei Kondensationsprodukte entstanden, die fluorometrisch detektierbar waren. Die Reaktionszeit betrug 3 Minuten, wobei die Proben die ersten 20 Sekunden geschüttelt wurden, um eine ausreichende Vermischung der Substanzen zu erreichen. Nach Ablauf der drei Minuten wurde die Reaktion durch die Zugabe von 35µl 50%iger Phosphorsäure gestoppt. Der pH-Wert wurde dadurch auf pH 4 eingestellt, sodass O-Phthaldialdehyd und Histamin nicht mehr bindungsfähig waren.

Nach Abschluss der Derivatisierung lag das Endvolumen somit bei 1335 µl pro Reaktionsgefäß.

Histaminstandards wurden in einer Konzentration von 18,5 µM hergestellt und nach dem gleichen Schema derivatisiert. Bei dem genannten Endvolumen von 1335 µl pro Reaktionsgefäß ergab sich eine Endkonzentration von 125 nM pro zu messendem Standard. Bei einem Injektionsvolumen von 200 µl des Standards ergab sich eine Gesamtmenge von 25 pmol Histamin pro Standard (siehe 3.6.1).

3.5.2 Protokoll der Derivatisierung

-	900 µl	Proben- oder Standardvolumen
-	200 µl	1 N Natronlauge
-	200 µl	0,1%iges O-Phthaldialdehyd in Methanol
-	35 µl	50%ige Phosphorsäure

-	1335 µl	Endvolumen

3.5.3 Messung der Histaminkonzentration mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Das verwendete System zur Histaminmessung bestand aus einem Probenautoinjektor (Biorad, Model AS 100 HRLC Automatic Sampling System), einer Hochdruckpumpe (Gynkotec High Precision Pump Model 300, Gynkotec, Germering), einer Umkehrphasen-HPLC-Trennsäule (LiChrospher® 60 RP-select B 5 µm, Merck, Darmstadt) mit Vorsäule, einem HPLC-Fluoreszenzdetektor (RF 1001, Gynkotec, Germering) und einem Integrator (C-R 6A Chromatopac, Gynkotec, Germering). Die mobile Phase im System bestand aus einer rezirkulierenden Lösung mit folgender Zusammensetzung:

- 76,9 mM Essigsäure
- 0,85 mM 1-Pentansulfonsäure
- 15% (V/V) Acetonitril

Die Proben und Standard wurden direkt nach der Derivatisierung in den Autoinjektor gestellt, der sie auf 2°C abkühlte und in einem Abstand von 14 Minuten ein Volumen von 200 µl jeder Probe in das HPLC-System injizierte. Durch die Hochdruckpumpe wurden die Proben anschließend mit einem Druck von 60 bis 80 bar und einer Flussrate von 1,2 ml/min durch die Trennsäule und nachfolgend in den Fluoreszenzdetektor gepumpt.

Mittels der Umkehrphasen-Trennsäule des HPLC-Systems wurde das in den Proben beziehungsweise Standard enthaltene Histamin von den übrigen Inhaltsstoffen abgetrennt. Die Detektion der zwei Histaminderivate erfolgte bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm

und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Die Summe beider Peaks der im Fluoreszenzdetektor gemessenen Lichtemission war der gemessenen Histaminkonzentration proportional (Dissertation Dirk Baumgärtner, Mainz, 1998). Ein angeschlossener Integrator zeichnete die gemessenen Chromatogramme graphisch auf und berechnete die Fläche der einzelnen Peaks (Abb.3.5.3). Aufgrund zunehmender Verunreinigung im System wurde die mobile Phase alle 10 Tage ausgetauscht.

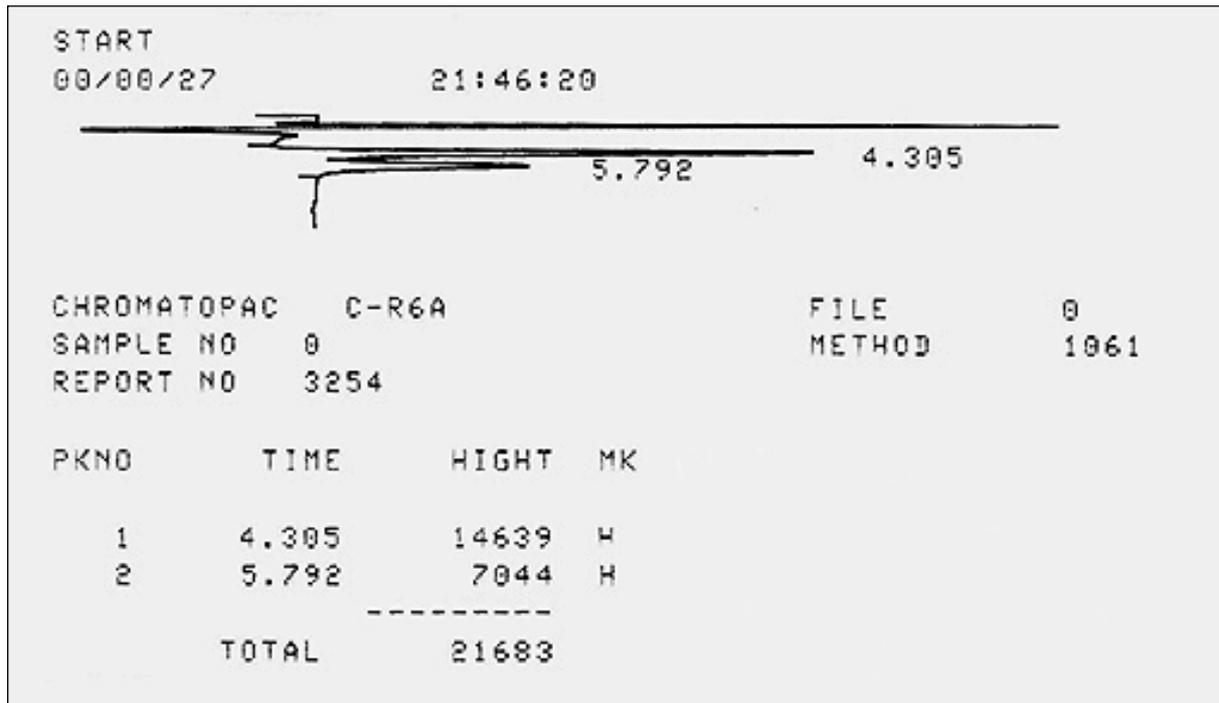


Abb.3.5.3: Beispiel eines HPLC-Chromatogrammes des in einer Probe enthaltenen Histamins. Peak 1 (PKNO) zur Zeit (TIME) 4.305 Minuten mit der berechneten Fläche von 14639 (HIGHT). Peak 2 zur Zeit 5.792 Minuten mit der Fläche von 7044. Gesamtfläche 21683 (HIGHT).

3.6 Berechnung , graphische Darstellung und Statistik

3.6.1 Berechnung der Histaminkonzentration der Proben

Die Histaminkonzentration des Standard im HPLC-System (25 pM Histamin pro Injektion), gemessen anhand der Summe der beiden detektierten Peaks und deren Gesamtfläche im arithmetischen Mittel, wurde in Relation zu jeder einzelnen Probe gesetzt und so die eigentliche Konzentration der jeweiligen Probe bestimmt. Unter Berücksichtigung des Volumens im HPLC-System, des Derivatisierungsvolumen, des eigentlichen Probenvolumens und der Masse des eingesetzten Gewebes im Organbad wurde die Histaminmenge in pMol pro Gramm Feuchtgewebe bestimmt.

Die Linearität der Messungen in der verwendeten Apparatur wurde mit Standard unterschiedlicher Konzentration bestimmt (Reinheimer et al., 1997).

3.6.2 Auswertung der Freisetzungsversuche

Grundlage zur Auswertung der Freisetzungsversuche war die berechnete Menge an Histamin in pMol pro Gramm Gewebe jeder fünfminütigen Sammelfase. Die basale ebenso wie die stimulierte Histaminabgabe der Gewebstücke variieren innerhalb einzelner Individuen. Daher wurden die Proben 1-3 (1-15. Minute) jeweils individuell gemittelt und als Kontrollabgabe [K = 100%] definiert. So wurde eine bessere Vergleichbarkeit der individuellen und interindividuellen Ergebnisse der Histaminabgabe erreicht. Die Werte der Kontrollabgabe wurden mit den Mittelwerten der stimulierten Histaminabgabe [S] der Proben 7-9 (Haut), bzw. 8-10 (Bronchien) in ein prozentuales Verhältnis gesetzt, um die Relationen im einzelnen Versuch zu ermitteln. Die Berechnung erfolgte nach der Formel $[(S/K)-1]*100$. Desweiteren wurde die individuelle Basalabgabe [B] (mittlere, basale Histaminabgabe ohne Zusatz von Testsubstanzen) aus den Proben 1-3 (1-15. Minute) bestimmt. Anhand der Formel $[(K/B)-1]*100$ wurde die Basalabgabe mit der Kontrollabgabe auf eventuelle Unterschiede verglichen.

In den Versuchsreihen, bei denen ab der 4. Probe Testsubstanzen zugegeben wurden, galt ebenfalls die mittlere Histaminfreisetzung der Proben 1-3 als Kontrollabgabe [K]. Die Freisetzung in den Proben 4-6, 7-9 (Haut) und 8-10 (Bronchien) wurde als stimulierte Freisetzung [S] in ein Verhältnis mit der Kontrollabgabe [K] gesetzt.

Alle Freisetzungsversuche mit identischen Protokollbedingungen wurden über alle 12 Einzelwerte gemittelt und der Standardfehler der Mittelwerte errechnet.

3.6.3 Statistik und graphische Darstellung

Bei der statistischen und graphischen Auswertung wurden die Computer-Programme Microsoft Excel®, GraphPad InStat™ und GraphPad Prism™ benutzt. Balkendiagramme stellen die Histaminfreisetzung in Abhängigkeit zum zeitlichen Verlauf dar. Der jeweilige Stichprobenumfang ist als n bezeichnet; der Standardfehler des Mittelwertes [SEM] wurde aus der Division der Standardabweichung (SD) durch die Quadratwurzel des Stichprobenumfanges ($SEM=SD / \sqrt{n}$) berechnet und als Fehlerbalken graphisch dargestellt. Der Vergleich zweier unabhängiger Messreihen mit kleinem Stichprobenumfang, Standardabweichung gleicher Größenordnung und Gauß'scher Verteilung erfolgte anhand des t-Tests nach STUDENT. Bei signifikant abweichender Standardabweichung der beiden Messreihen kam der konservativere, modifizierte t-Test nach Welch zur Anwendung. Mehrfachvergleiche erfolgten anhand des ANOVA-Tests mit dem Folgetest nach BONFERRONI. Statistische Unterschiede $p < 0.05$ wurden als signifikant gewertet.

3.7 Substanzliste und verwendete Lösungen

3.7.1 Physiologische Nährlösung

- NaCl	125	mM
- NaHCO ₃	23,8	mM
- Glucose	5,05	mM
- KCl	2,68	mM
- CaCl ₂ •2H ₂ O	1,80	mM
- MgCl ₂ •6H ₂ O	1,04	mM
- NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	0,54	mM
- L-Ascorbinsäure	0,057	mM
- Cholinchlorid	0,001	mM

Um einen konstanten pH-Wert von 7.3 zu gewährleisten, wurde die Nährlösung ständig mit Carbogen, einer Mischung aus 5% Kohlendioxid in Sauerstoff (V/V) begast. Außerdem wurde die Nährlösung während des Transportes und der Präparation gekühlt.

3.7.2 Mobile Phase des HPLC-Systems

- 76,9 mM Essigsäure
- 0,85 mM 1-Pentansulfonsäure
- 15% (V/V) Acetonitril

Die mobile Phase wurde vor der Verwendung im HPLC-System durch einen Membranfilter (RC 58 Schleicher & Schüll, Dassel; mit einer Porengröße von 0,2 µm.) gefiltert.

3.7.3 Substanzliste

- Acetonitril	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Acetylcholinchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- L(+)-Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
- Kalziumionophor A23187	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

- Cholinchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Compound 48/80	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Essigsäure	Riedel-de Haen AG, Seelze
- D(+)Glucose	Merck, Darmstadt
- Histaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Methanol	Mallinckrocht Baker B.V., Deventer / Holland
- Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
- Oxotremorin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Oxytocinantagonist FE200440	Ferring International, Copenhagen
- Pentansulfonsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- O-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
- O-Phthaldialdehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Alle Substanzen wurden in, durch ein Millipore®-System gereinigtem, entmineralisiertem Wasser gelöst.

Ausnahmen:

- Kalziumionophor A23187 in Äthanol
- O-Phthaldialdehyd in Methanol

4. Ergebnisse

4.1 Histaminfreisetzung aus der Haut von Mastschweinen

4.1.1 Bestimmung der Ruheabgabe

Zur Messung der Histaminfreisetzung und Bestimmung der Ruheabgabe wurden Kontrollversuche in Abwesenheit von Testsubstanzen durchgeführt. Zweck dieser Versuche war die Fragestellung, ob Haut von Schweinen in der gegebenen Versuchsanordnung überhaupt geeignet ist, Histaminmessungen durchzuführen und ob etwaige Schädigungen des Gewebes durch den Transport oder temporäre Hypoxie auszuschließen sind. Die Ergebnisse dienen auch als Vergleichswert für nachfolgende Versuche unter Einfluss von Testsubstanzen.

Neun Gewebeproben von insgesamt sechs verschiedenen Mastschweinen wurden hierzu 60 Minuten in den Organbädern inkubiert und im Abstand von 5 Minuten die insgesamt 12 Proben gesammelt. Die Mittelwerte aller Versuche wurden wiederum gemittelt und als Kontrollabgabe gewertet. Die mittlere Ruheabgabe ergab einen Wert von 175 ± 27 pmol Histamin / g Feuchtgewebe (Abb. 4.1.1)

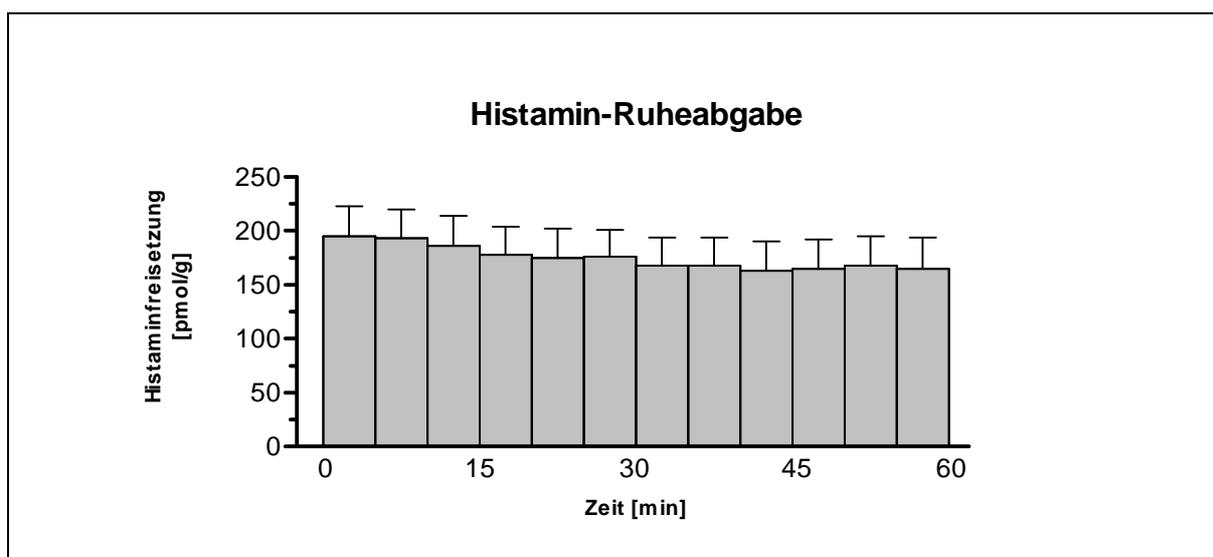


Abb. 4.1.1: Kontrollversuch zur basalen Histaminabgabe aus Haut von Mastschweinen, angegeben in pmol/g \pm SEM. Die Inkubation lief über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Der Mittelwert der Proben 1-12 betrug 175 ± 11 pmol/g. Es wurden 9 Gewebeproben (n= 9) von 6 Mastschweinen (N=6) getestet.

4.1.2 Versuche zur Stimulation der Histaminfreisetzung

4.1.3 Kontrollversuche mit Compound 48/80

Die Histaminfreisetzung wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von Compound 48/80 stimuliert. Dabei wurden Konzentrationen von 0.055, 0.164, und 3 mM im Organbad getestet. Die Zugabe der Substanz erfolgte in der 31. Minute der Sammelphase (Abb. 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4). Um Effekte einer möglichen Stimulation berechnen zu können, wurden die Ergebnisse der Proben 1-3, 4-6 und 7-9 gemittelt und in Bezug zueinander gesetzt. Das Verhältnis der Mittelwerte der Proben 1-3 und Proben 7-9 ergab den Grad der Stimulation. Die Mittelwerte der Proben 1-3, 4-6, 7-9 und 10-12 wurden untereinander und mit den Mittelwerten der Ruheabgabe verglichen (Abb. 4.1A).

Das Ergebnis zeigte, dass keine der drei getesteten Konzentrationen von Compound 48/80 eine signifikante Beeinflussung der Histaminfreisetzung im Gewebe und keine Veränderung zur Kontrolle verursacht. Die Mittelwerte sind unter den entsprechenden Grafiken angegeben.

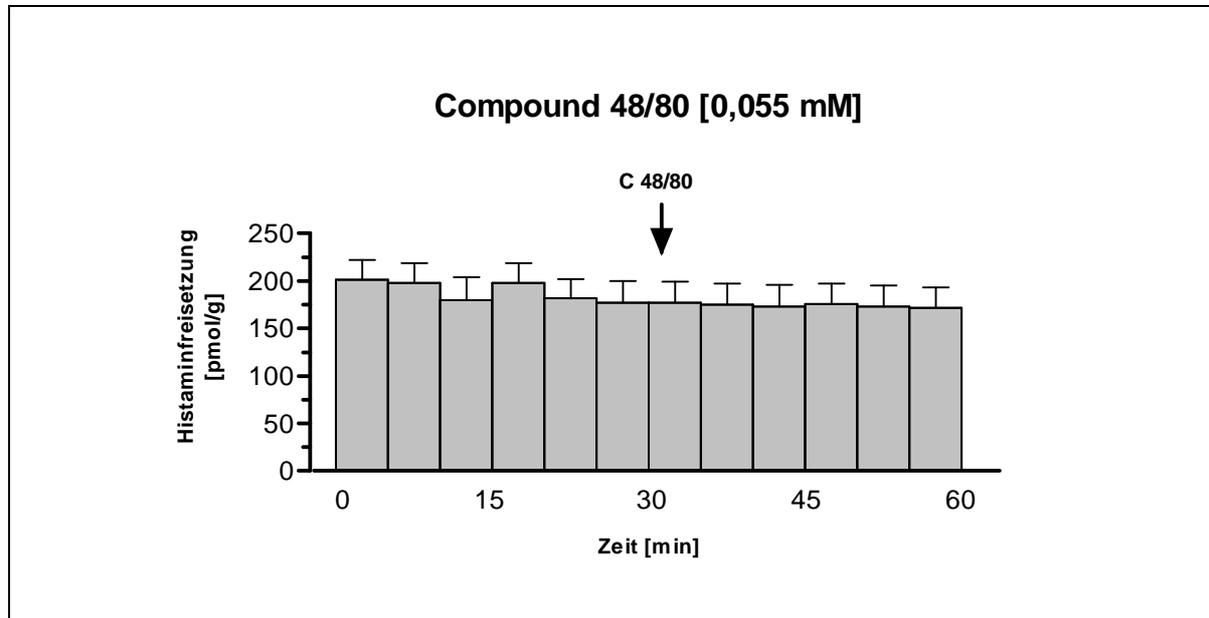


Abb. 4.1.2: Stimulation der Histaminabgabe mit Compound 48/80 der Konzentration 0.055 mM. Die Zugabe erfolgte in die 7. Probe. Die Inkubation lief über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Histaminfreisetzung angegeben in pmol/g \pm SEM. Mittelwerte der Proben 1-3: 197 pmol/g; 4-6: 186 pmol/g; 7-9: 175 pmol/g. Compound 48/80 der Konzentration 0.055 mM verursachte keine signifikante Beeinflussung der Histaminfreisetzung. Es wurden 8 Gewebeproben (n= 8) von 6 Mastschweinen (N=6) getestet.

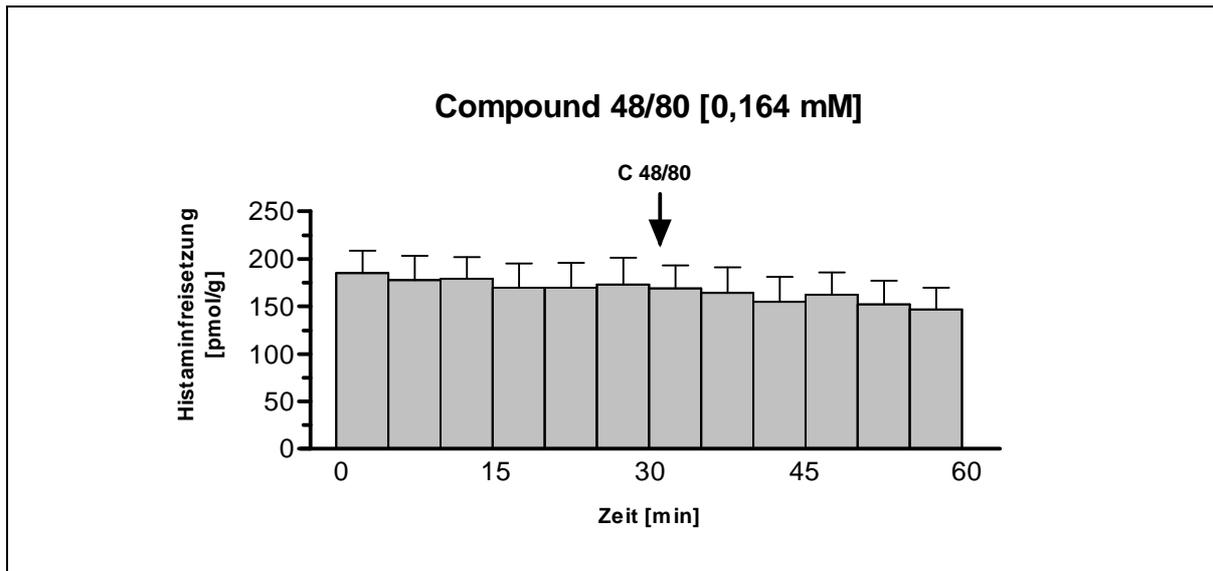


Abb. 4.1.3: Stimulation der Histaminabgabe mit Compound 48/80 der Konzentration 0.164 mM. Die Zugabe erfolgte in die 7. Probe. Die Inkubation lief über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Histaminfreisetzung angegeben in pmol/g \pm SEM. Mittelwerte der Proben 1-3: 180 pmol/g; 4-6: 171 pmol/g; 7-9: 163 pmol/g. Compound 48/80 der Konzentration 0.164 mM verursachte keine signifikante Beeinflussung der Histaminfreisetzung. Es wurden 8 Gewebeproben (n= 8) von 6 Mastschweinen (N=6) getestet.

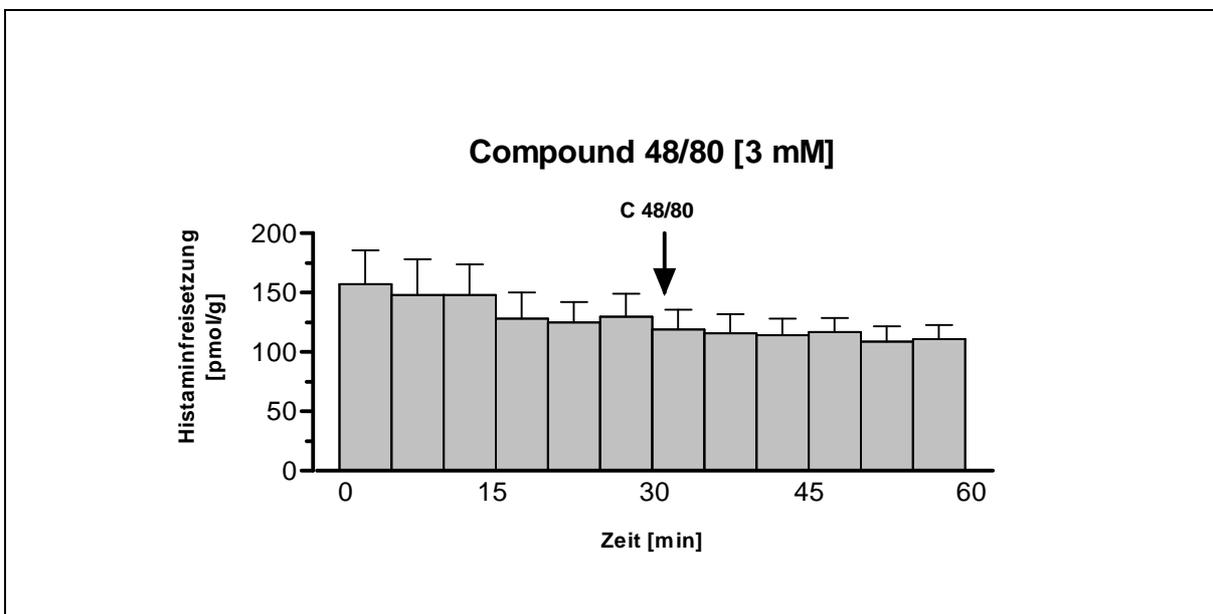


Abb. 4.1.4: Stimulation der Histaminabgabe mit Compound 48/80 der Konzentration 3 mM. Die Zugabe erfolgte in die 7. Probe. Inkubation über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Histaminfreisetzung angegeben in pmol/g \pm SEM. Mittelwerte der Proben 1-3: 155 pmol/g; 4-6: 128 pmol/g; 7-9: 116 pmol/g. Compound 48/80 der Konzentration 3 mM verursachte keine signifikante Beeinflussung der Histaminfreisetzung. Es wurden 8 Gewebeproben (n= 8) von 6 Mastschweinen (N=6) getestet.

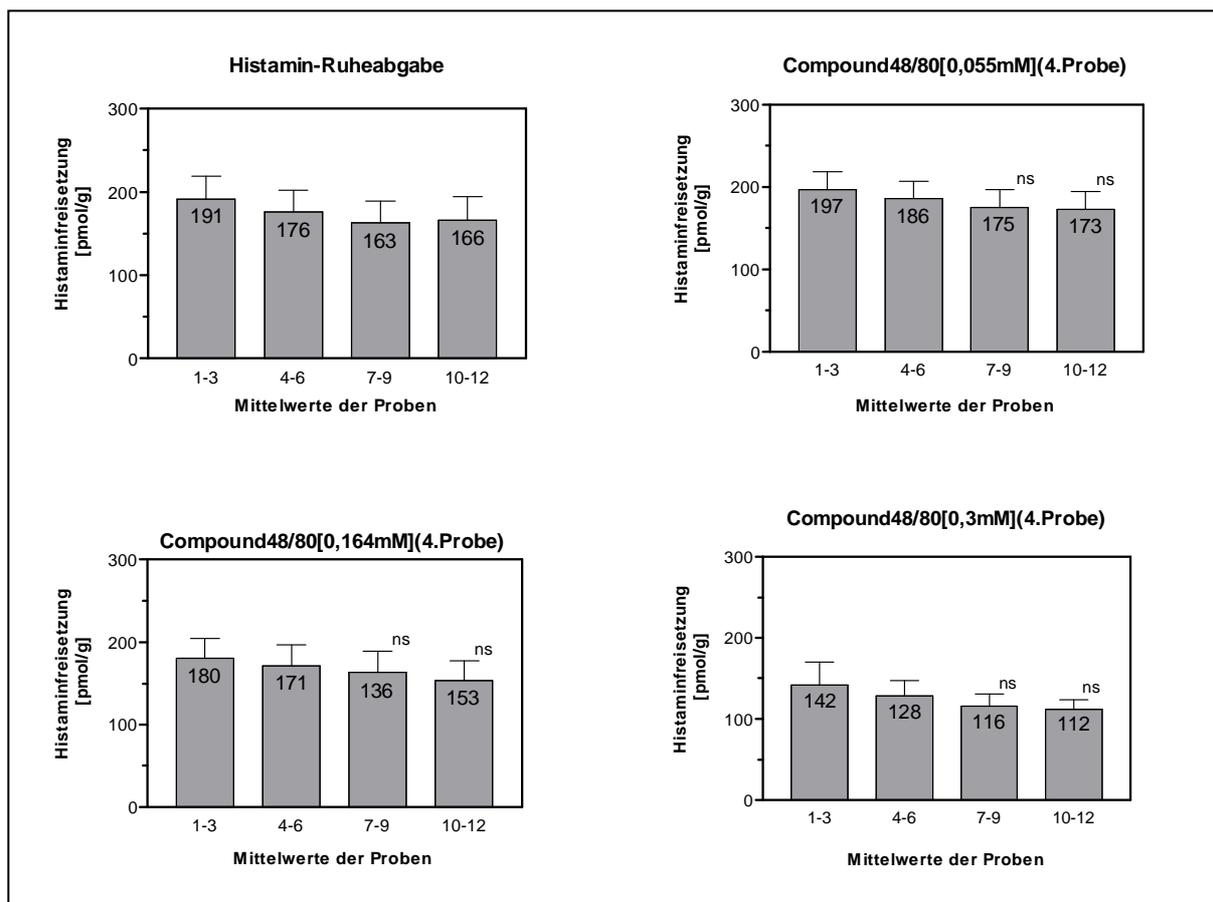


Abb.4.1A: Mittelwerte der Histaminfreisetzung der Proben 1-3, 4-6, 7-9 und 10-12 aus den Messungen der Ruheabgabe und der Stimulation mit Compound 48/80 in den Konzentrationen 0.055, 0.164 und 0.3 mM. Die 4 Grafiken sind eine Zusammenfassung der Abbildungen 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3 und 4.1.4. In den Balken ist jeweils der Mittelwert der Histaminfreisetzung in pmol/g angegeben. Die Mittelwerte der Proben wurden jeweils untereinander und mit der Histaminruheabgabe verglichen. Die Vergleiche ergaben keine signifikanten Unterschiede (ns) der stimulierten Proben verglichen mit der basalen Freisetzung.

4.1.4 Auswirkung von FE 200440 auf die Histaminfreisetzung

FE 200440 wurde in den Konzentrationen 0.03, 0.3 und 3 mM getestet. Ab der 16. Minute der Sammelphase wurde FE 200440, versetzt mit Tyrode, anstelle des ursprünglichen Organbadmediums zugegeben. Zusätzlich wurde Compound 48/80 in der Konzentration von 0.3 mM jeweils in die 7. Probe injiziert. Das Verhältnis der Mittelwerte der Proben 1-3 zu 4-6 ergab den Effekt von FE 200440 auf die basale Histaminabgabe. Das Verhältnis der Mittelwerte der Proben 1-3 zu 7-9 zeigte wiederum den Effekt von Compound 48/80. Die entsprechenden Mittelwerte sind unter den Grafiken angegeben. Die Mittelwerte der Proben 1-3, 4-6, 7-9 und 10-12 wurden untereinander und mit den Mittelwerten der Kontrolle verglichen (Abb. 4.1B).

Die Versuche zeigten, dass die Testsubstanz FE 200440 in den eingesetzten Konzentrationen keinen signifikanten Effekt auf die Histaminfreisetzung verursachte und keine nennenswerte Veränderung zur Kontrolle aufwies (Abb. 4.1.5; 4.1.6; 4.1.7).

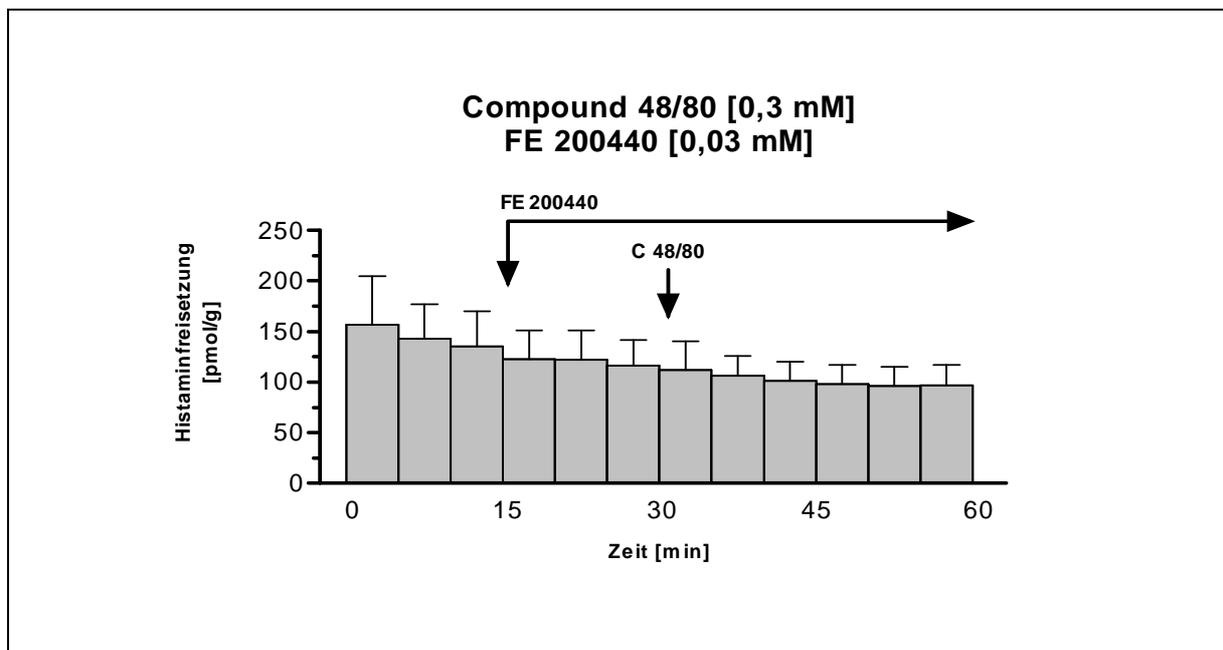


Abb. 4.1.5: Effekt von FE 200440 in der Konzentration von 0.03 mM auf die Abgabe von Histamin aus dem Gewebe. Die Zugabe erfolgte ab der 4.-12. Probe, bei einer Inkubation über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Die Zugabe von Compound 48/80 der Konzentration 0.3 mM erfolgte in die 7. Probe. Die Histaminfreisetzung ist angegeben in pmol/g \pm SEM. Mittelwerte der Proben 1-3: 145 pmol/g; 4-6: 120 pmol/g; 7-9: 106 pmol/g. FE 200440 in der Konzentration von 0.03 mM verursachte keine signifikante Beeinflussung der Histaminfreisetzung. Es wurden 8 Gewebeproben (n= 8) von 6 Mastschweinen (N=6) getestet.

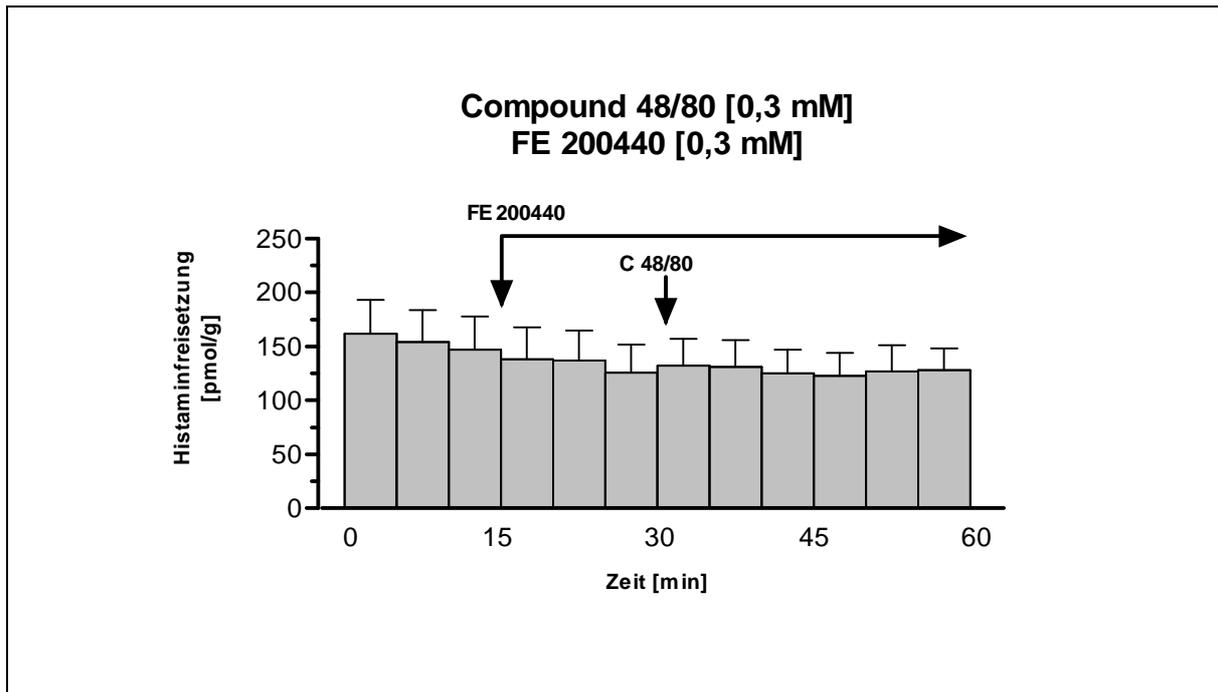


Abb. 4.1.6: Effekt von FE 200440 in der Konzentration von 0.3 mM auf die Abgabe von Histamin aus dem Gewebe. Die Zugabe erfolgte ab der 4.-12. Probe, bei einer Inkubation über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Die Zugabe von Compound 48/80 der Konzentration 0.3 mM erfolgte in die 7. Probe. Histaminfreisetzung ist angegeben in pmol/g \pm SEM. Mittelwerte der Proben 1-3: 154 pmol/g; 4-6: 134 pmol/g; 7-9: 129 pmol/g. FE 200440 in der Konzentration von 0.3 mM verursachte keine signifikante Beeinflussung der Histaminfreisetzung. Es wurden 7 Gewebeproben (n= 7) von 6 Mastschweinen (N=6) getestet.

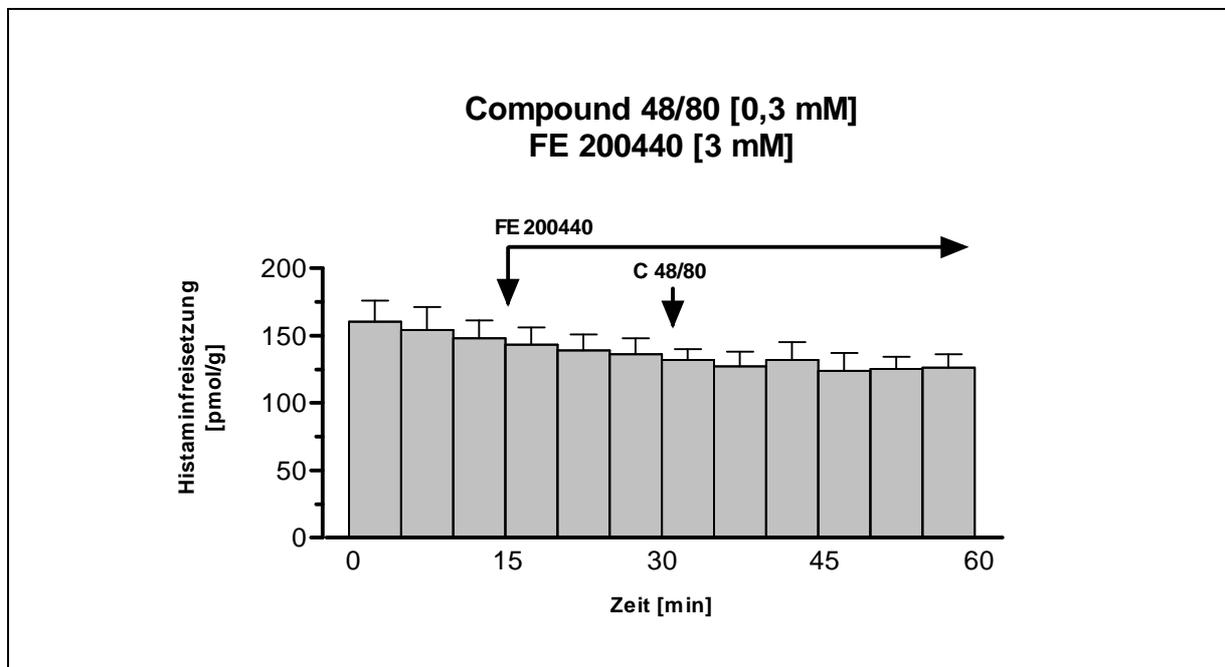


Abb. 4.1.7: Effekt von FE 200440 in der Konzentration von 3 mM auf die Abgabe von Histamin aus dem Gewebe. Die Zugabe erfolgte ab der 4.-12. Probe bei einer Inkubation über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Die Zugabe von Compound 48/80 der Konzentration 0.3 mM erfolgte in die 7. Probe. Histaminfreisetzung angegeben in pmol/g \pm SEM. Mittelwerte der Proben 1-3: 154 pmol/g; 4-6: 139 pmol/g; 7-9: 131 pmol/g. FE 200440 in der Konzentration von 3 mM verursachte keine signifikante Beeinflussung der Histaminfreisetzung. Es wurden 9 Gewebeproben (n= 9) von 6 Mastschweinen (N=6) getestet.

4.1.5 Kontrollversuche mit A23187

Als weiteren Stimulus für eine Histaminausschüttung aus dem Gewebe wurde das Kalziumionophor A23187 getestet. Die eingesetzte Konzentration betrug $10\ \mu\text{M}$, da diese in Freisetzungsvorsuchen mit humanen Bronchien den höchsten Stimulationseffekt verursachte (Zimmermann, 2000). Die Zugabe erfolgte in der 34. Minute. Der Vergleichswert der basalen Histaminabgabe (Proben 1-3) zu den stimulierten Proben (8-10) ergab die Wirkung von A23187 auf das Gewebe. Das Ergebnis zeigte keinen signifikanten Unterschied der Mittelwerte verglichen mit der Kontrolle (Abb. 4.1.8 und 4.1.B).

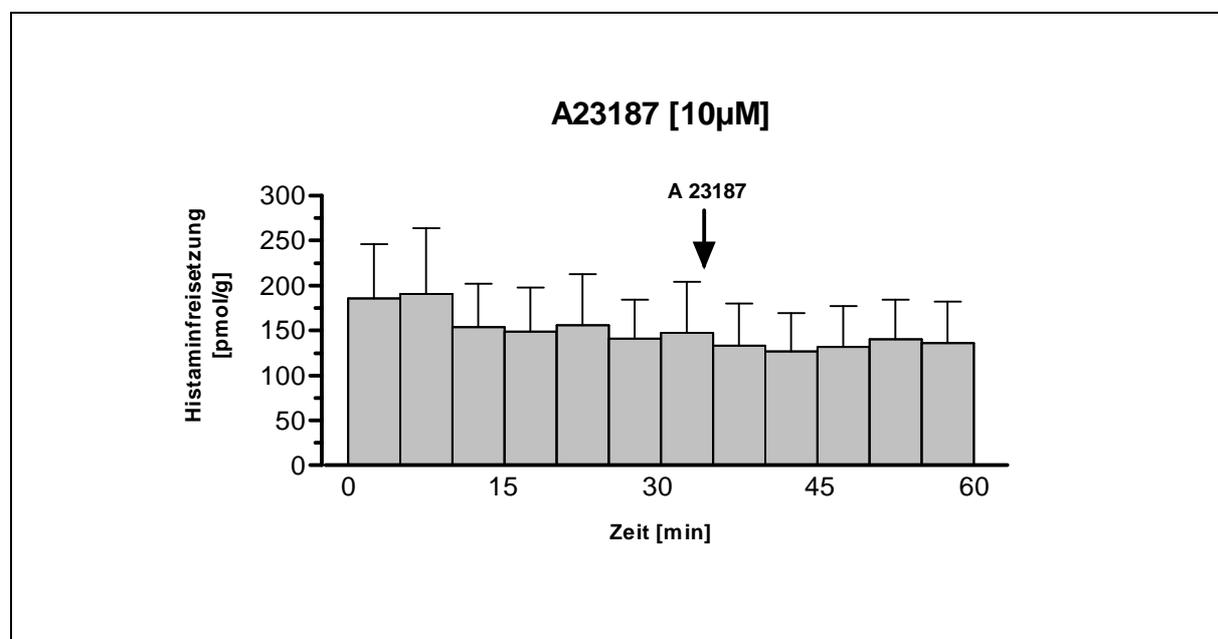


Abb. 4.1.8: Einfluss des Kalziumionophor A23187 in der Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ auf die Histaminfreisetzung. Die Zugabe erfolgte in der 34. Minute. Inkubation über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Histaminfreisetzung angegeben in $\text{pmol/g} \pm \text{SEM}$. Mittelwerte der Proben 1-3: $213\ \text{pmol/g}$; 4-6: $181\ \text{pmol/g}$; 8-10: $165\ \text{pmol/g}$. A23187 in der Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ verursachte keine signifikante Beeinflussung der Histaminfreisetzung. Es wurden 8 Gewebeproben ($n=8$) von 6 Mastschweinen ($N=6$) getestet.

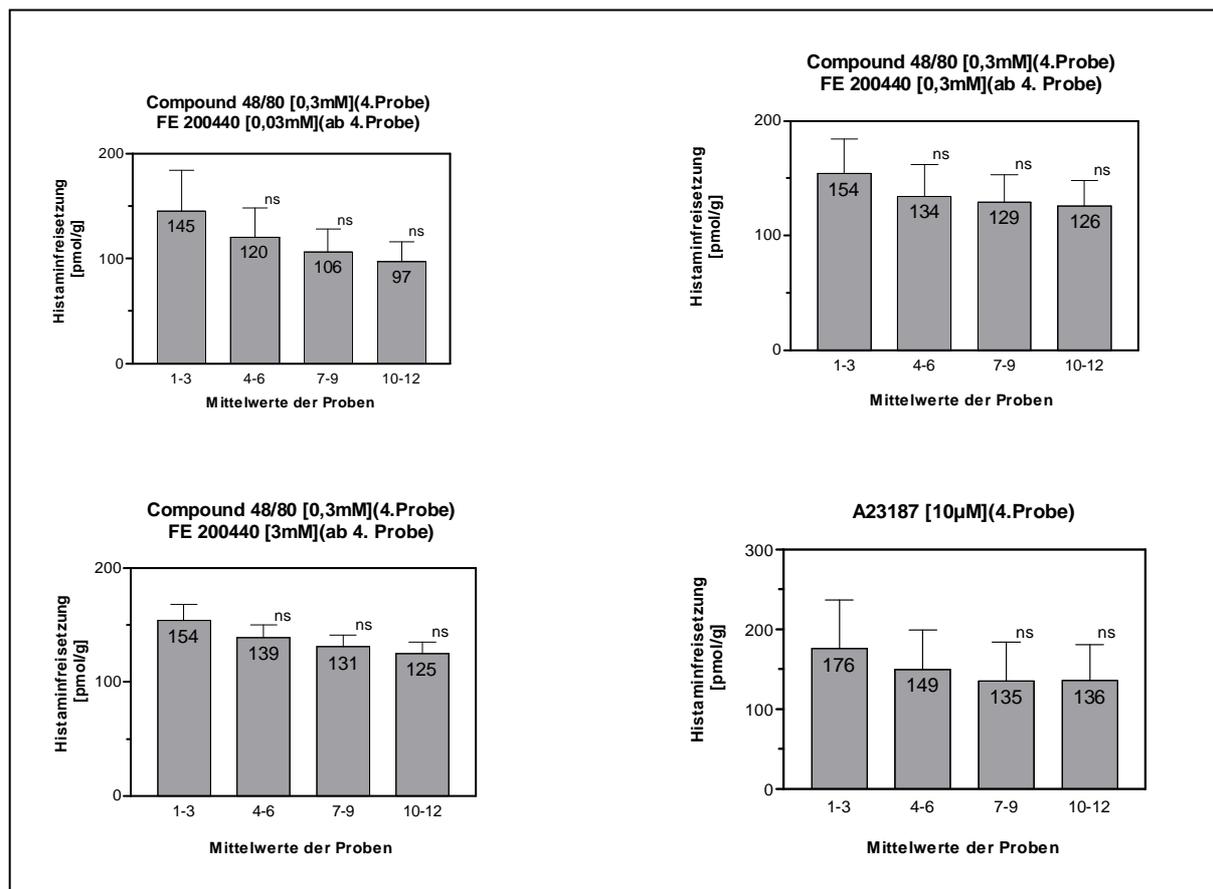


Abb.4.1B: Mittelwerte der Histaminfreisetzung der Proben 1-3, 4-6, 7-9 und 10-12 aus den Messungen der Stimulation mit Compound 48/80 in der Konzentration 0.3 mM und FE 200440 in den Konzentrationen 0.03, 0.3 und 3 mM sowie der Stimulation mit A23187 der Konzentration 10 µM. Die 4 Grafiken sind eine Zusammenfassung der Abbildungen 4.1.5, 4.1.6, 4.1.7 und 4.1.8. In den Balken ist jeweils der Mittelwert der Histaminfreisetzung in pmol/g angegeben. Die Mittelwerte der Proben wurden jeweils untereinander und mit der Histaminruheabgabe verglichen. Die Vergleiche ergaben keine signifikanten Unterschiede (ns) der stimulierten Proben verglichen mit der basalen Freisetzung.

4.2 Histaminfreisetzung aus humaner Haut

4.2.1 Kontrollversuche mit Compound 48/80

Humane Haut wurde in Versuchen mit Compound 48/80 in der Konzentration 0.3 mM im Organbad stimuliert. Nach Zimmermann (2000) erwies sich diese Konzentration als optimaler Stimulus für humane Haut. Die Zugabe erfolgte in die 7. Probe (30. Minute) (Abb. 4.2.1). Die basale Histaminfreisetzung (Proben 1-3) lag bei 537 ± 60 pmol/g (1-15.min) und sank auf 453 ± 50 pmol/g in den Proben 4-6 (15-30. min), ersichtlich auch aus dem Verhältnis der Proben 4-6 zu 1-3 von 0.85 ± 0.02 . Die Zugabe von Compound 48/80 verursachte einen direkten und signifikanten ($p < 0.0001$) Anstieg der Histaminfreisetzung auf 261 % der basalen Abgabe

(Proben 7-9: 1269 ± 158 pmol/g). Das zeigte das Verhältnis der Proben 7-9 zu 4-6, welches bei 3.35 ± 0.68 lag beziehungsweise dem Verhältnis 7-9 zu 1-3, das bei 2.79 ± 0.49 lag. Die Mittelwerte der Proben 1-3, 4-6, 7-9 und 10-12 wurden untereinander verglichen (Abb. 4.2.1 rechte Grafik). Die Mittelwerte der einzelnen Proben sind in Tabelle 4a zusammengefasst.

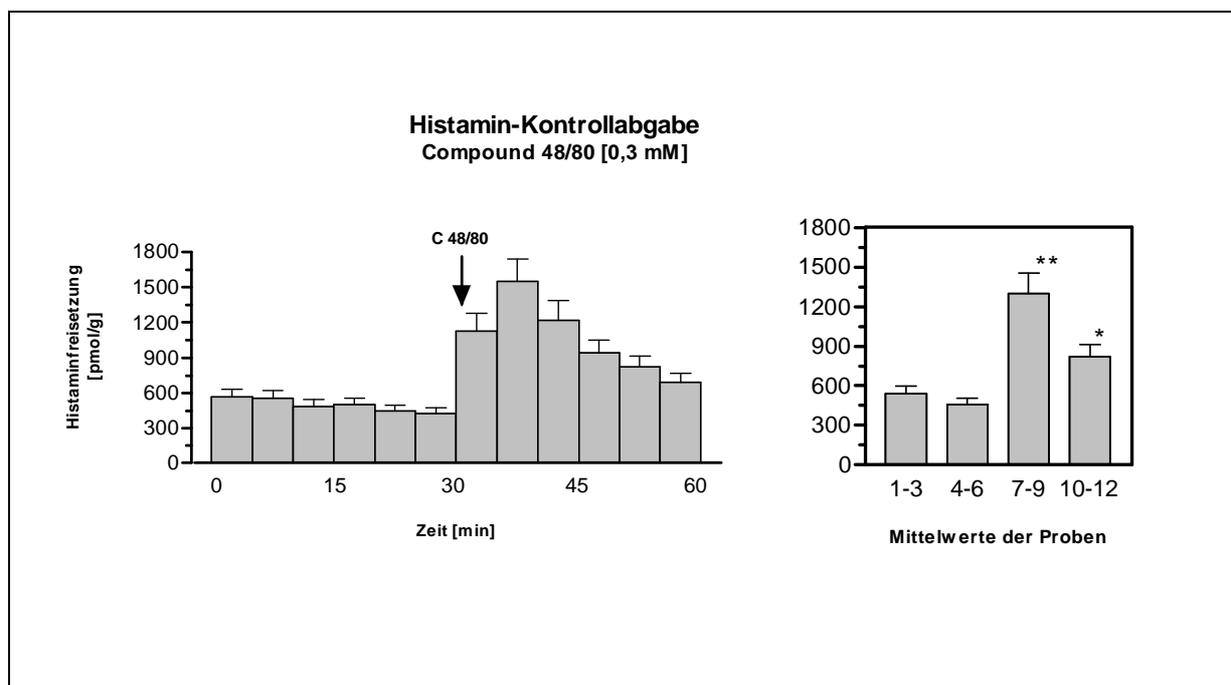


Abb. 4.2.1: Kontrollversuche zur Histaminstimulation mit Compound 48/80 der Konzentration 0.3 mM zur 30. Minute. Die Histaminmenge ist angegeben in pmol/g \pm SEM. Die Inkubation lief über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben, genommen im Abstand von 5 Minuten (linke Grafik). Die rechte Grafik zeigt die Mittelwerte der Proben 1-3, 4-6, 7-9 und 10-12. Die mittlere Histaminfreisetzung der Proben 7-9 beziehungsweise 10-12 ist signifikant verschieden zu der mittleren Freisetzung der Proben 4-6 ($p < 0.002^*$, $p < 0.0001^{**}$); Stichprobenumfang ($n=13$) von 7 unterschiedlichen Patienten ($N=7$).

4.2.2 Auswirkung von FE 200440 auf die Histaminfreisetzung

Die Testsubstanz FE 200440 wurde ab der 16. Minute der Sammelphase, im Austausch zur ursprünglich FE 200440-freien Nährlösung, in den Konzentrationen 0.03, 0.3 oder 3 mM dem Organbad zugesetzt. Zusätzlich wurde das Gewebe, gleich den Kontrollversuchen, zur 30. Minute mit Compound 48/80 0.3 mM stimuliert. Um den Effekt von FE 200440 auf die Histaminfreisetzung zu bewerten, wurden die Werte der Proben 1-3, 4-6 und 7-9 gemittelt und in Verhältnisse zueinander gesetzt.

Die Konzentration von 0.03 mM beeinflusste weder die basale Histaminabgabe (Proben 1-3: 327 ± 58 pmol/g), noch wurde die stimulierte Freisetzung verändert (Proben 7-9: 1066 ± 207 pmol/g). Dies ergab das Verhältnis der Proben 4-6 zu 1-3 (0.87 ± 0.02) bzw. 7-9 zu 4-6 (4.68 ± 0.87) im Vergleich mit den Kontrollversuchen (Abb. 4.2.2).

In der mittleren Konzentration von 0.3 mM verursachte FE 200440 ebenfalls keinen signifikanten Anstieg der Histaminfreisetzung (Probe 4-6/1-3: 0.96 ± 0.13 und Probe 7-9/4-6: 2.52 ± 0.30) verglichen mit der Kontrolle (0.87 ± 0.02 bzw. 3.35 ± 0.68). Der Mittelwert der Proben 4-6 lag bei 586 ± 56 pmol/g, der Proben 7-9 bei 1558 ± 306 pmol/g (Abb. 4.2.3 und Tabelle 4a).

FE 200440 in einer Konzentration von 3 mM führte allerdings zu einem direkten und anhaltenden Anstieg der gemessenen Histaminkonzentration (Abb. 4.2.4) auf 224% der basalen Abgabe (Probe 4-6/1-3: 2.24 ± 0.21). Der Stimulationseffekt war vergleichbar mit dem Effekt von Compound 48/80 in der Konzentration 0.3 mM. Dies war ersichtlich aus dem Verhältnis Proben 7-9/4-6 (1.09 ± 0.07). Verglichen mit den Kontrollversuchen ergab sich eine Signifikanz $P < 0.0001$ bei der Stimulation mit FE 200440 der Konzentration 3 mM. Die Mittelwerte der Histaminfreisetzung der Proben 1-3, 4-6, 7-9 und 10-12 wurden untereinander und mit den Mittelwerten der Kontrolle verglichen, um die Signifikanzen deutlich zu machen (Abb. 4.2A). Die Mittelwerte sind in der Tabelle 4a zusammengestellt.

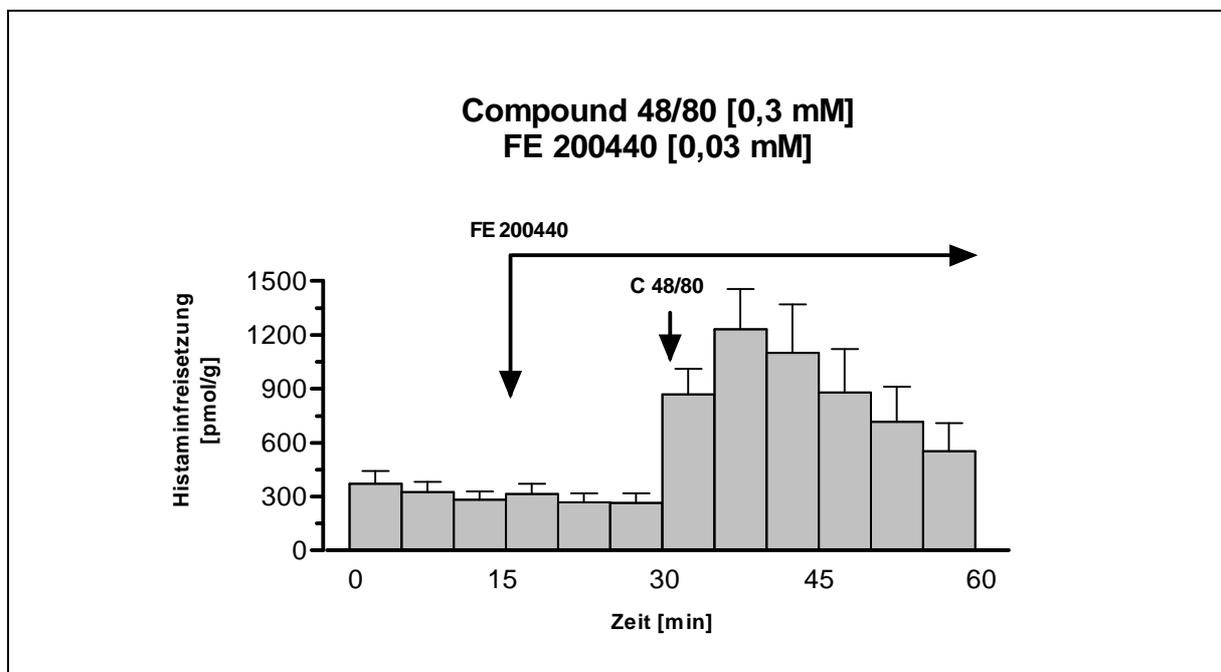


Abb. 4.2.2: Effekt von FE 200440 0.03 mM auf die Abgabe von Histamin aus dem Gewebe, bei Zugabe ab der 4. Probe. Stimulation erfolgte mit Compound 48/80 der Konzentration 0.3 mM zur 30. Minute. Die Inkubation lief über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Die Histaminmenge ist angegeben in pmol/g \pm SEM; Stichprobenumfang (n=9) von 6 unterschiedlichen Patienten (N=6).

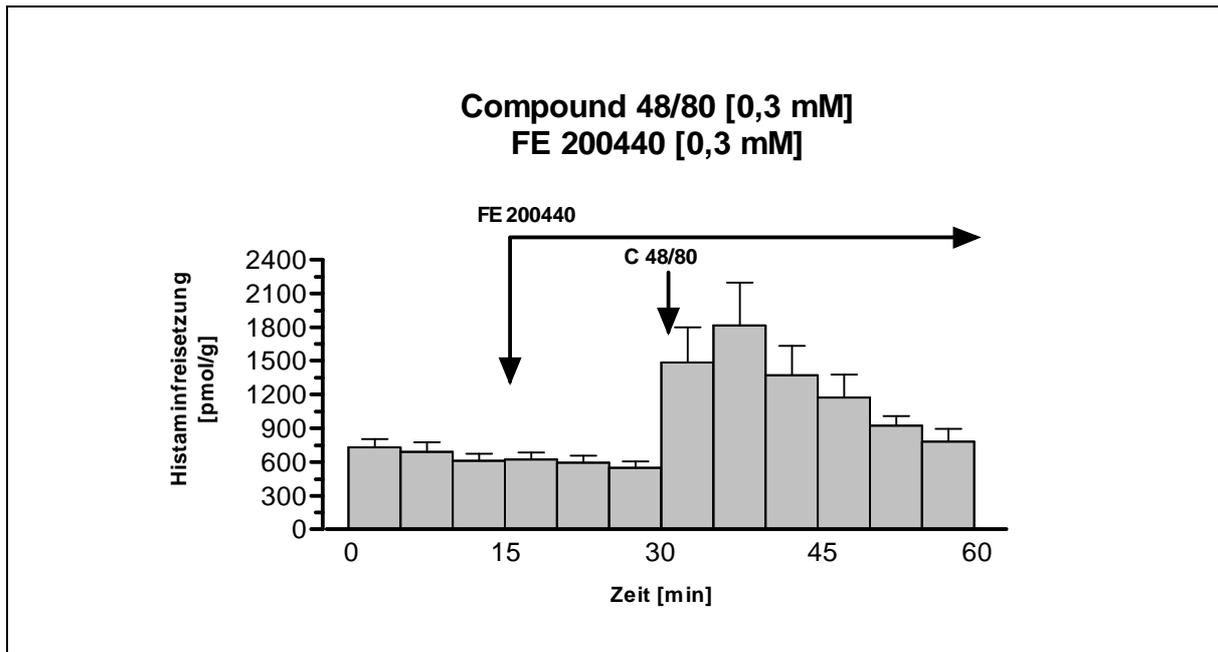


Abb. 4.2.3: Effekt von FE 200440 0.3 mM auf die Abgabe von Histamin aus dem Gewebe, bei Zugabe ab der 4. Probe. Die Inkubation lief über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Stimulation erfolgte mit Compound 48/80 der Konzentration 0.3 mM in der 30. Minute. Die Histaminmenge ist angegeben in pmol/g \pm SEM; Stichprobenumfang (n=13) von 7 unterschiedlichen Patienten (N=7).

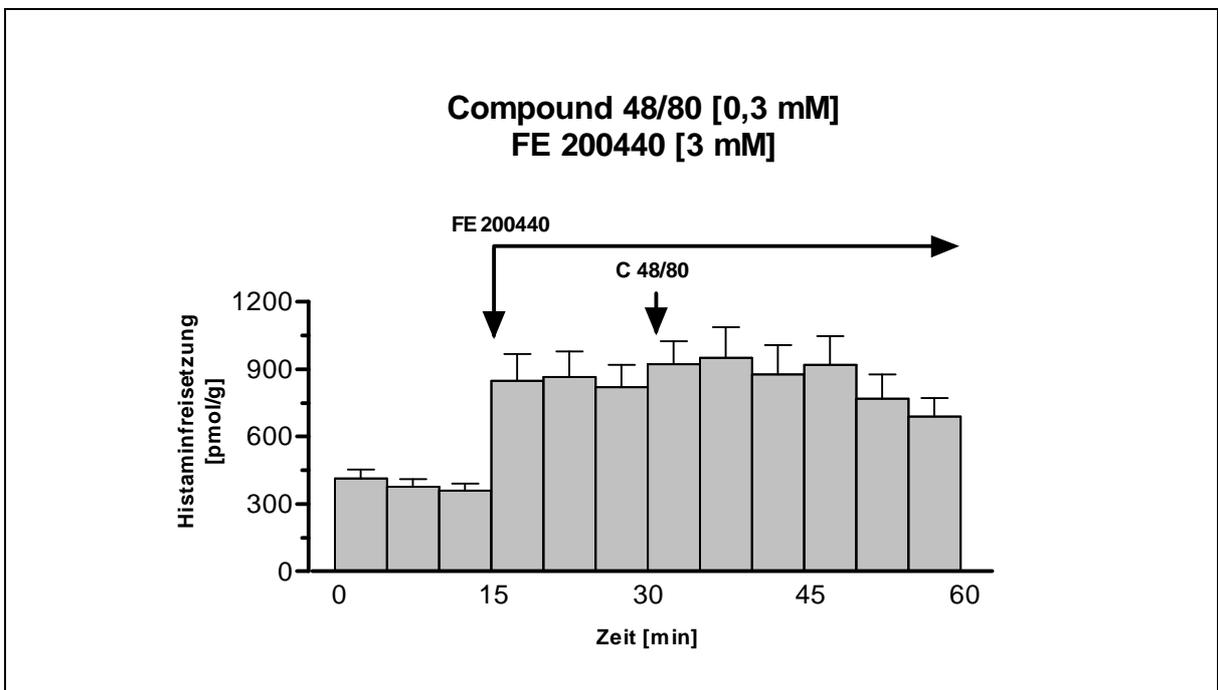


Abb. 4.2.4: Effekt von FE 200440 3 mM auf die Abgabe von Histamin aus dem Gewebe, bei Zugabe ab der 4. Probe. Die Inkubation lief über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Stimulation erfolgte mit Compound 48/80 der Konzentration 0.3 mM in der 30. Minute. Die Histaminmenge ist angegeben in pmol/g \pm SEM; Stichprobenumfang (n=10) von 6 unterschiedlichen Patienten (N=6).

4.2.3 Auswirkung des Mannitol-Puffers auf die Histaminfreisetzung

In Anlehnung an die stimulierende Wirkung von FE 200440, in der Konzentration 3 mM, wurde die vergleichbare Menge des Mannitol-Puffers auf seine Wirkung auf das Gewebe untersucht. Dies entsprach einer Konzentration von 0.04 M im Organbad. Entsprechend der Versuche mit Testsubstanz wurde im Austausch die Mannitol-Pufferlösung ab der 16. Minute dem Organbad zugesetzt (Abb. 4.2.5). Der Mittelwert der basalen Abgabe (418 ± 45 pmol/g) ergab keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollversuchen (Probe 4-6/1-3: 0.86 ± 0.03 ; Kontrolle: 0.85 ± 0.02). Der Stimulationseffekt von Compound 48/80 der Konzentration 0.3 mM war nicht signifikant größer (1843 ± 256 pmol/g) als bei der Kontrolle (1296 ± 158 pmol/g) (siehe auch Tabelle 4a).

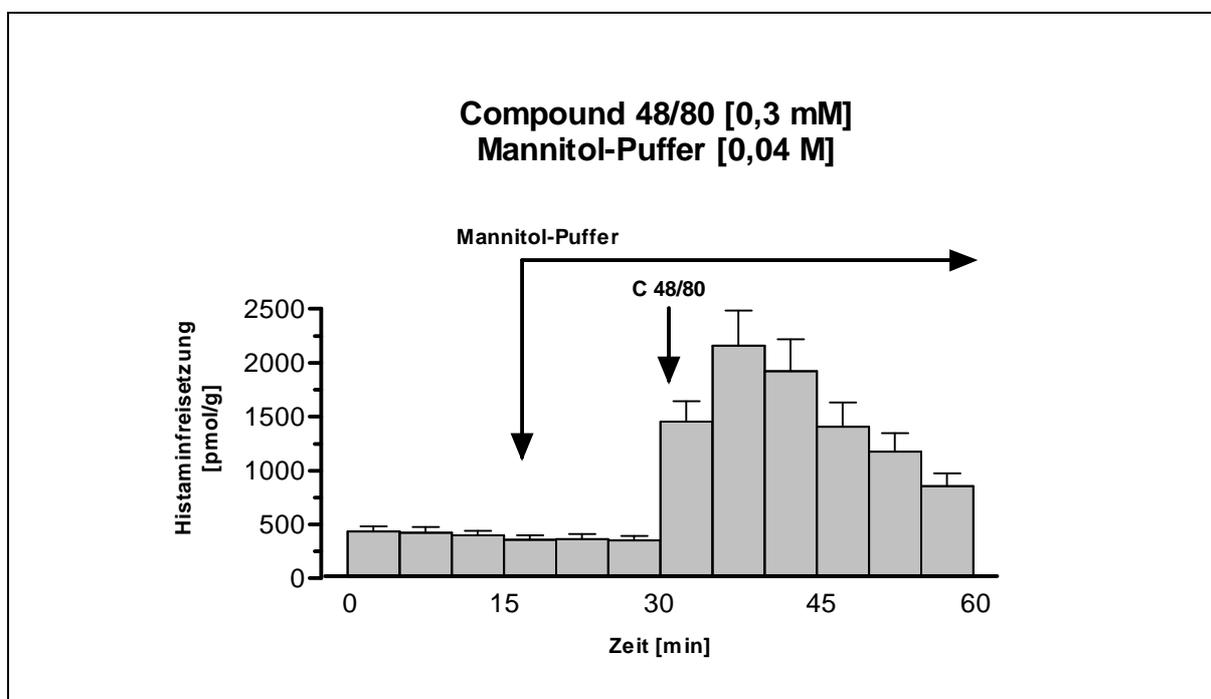


Abb. 4.2.5: Auswirkung des Mannitol-Puffers der Konzentration 0.04 M auf die Abgabe von Histamin aus dem Gewebe bei Zugabe ab der 4. Probe. Die Inkubation lief über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Stimulation erfolgte mit Compound 48/80 der Konzentration 0.3 mM in der 30. Minute. Die Histaminmenge ist angegeben in pmol/g \pm SEM; Stichprobenumfang (n=10) von 6 unterschiedlichen Patienten (N=6).

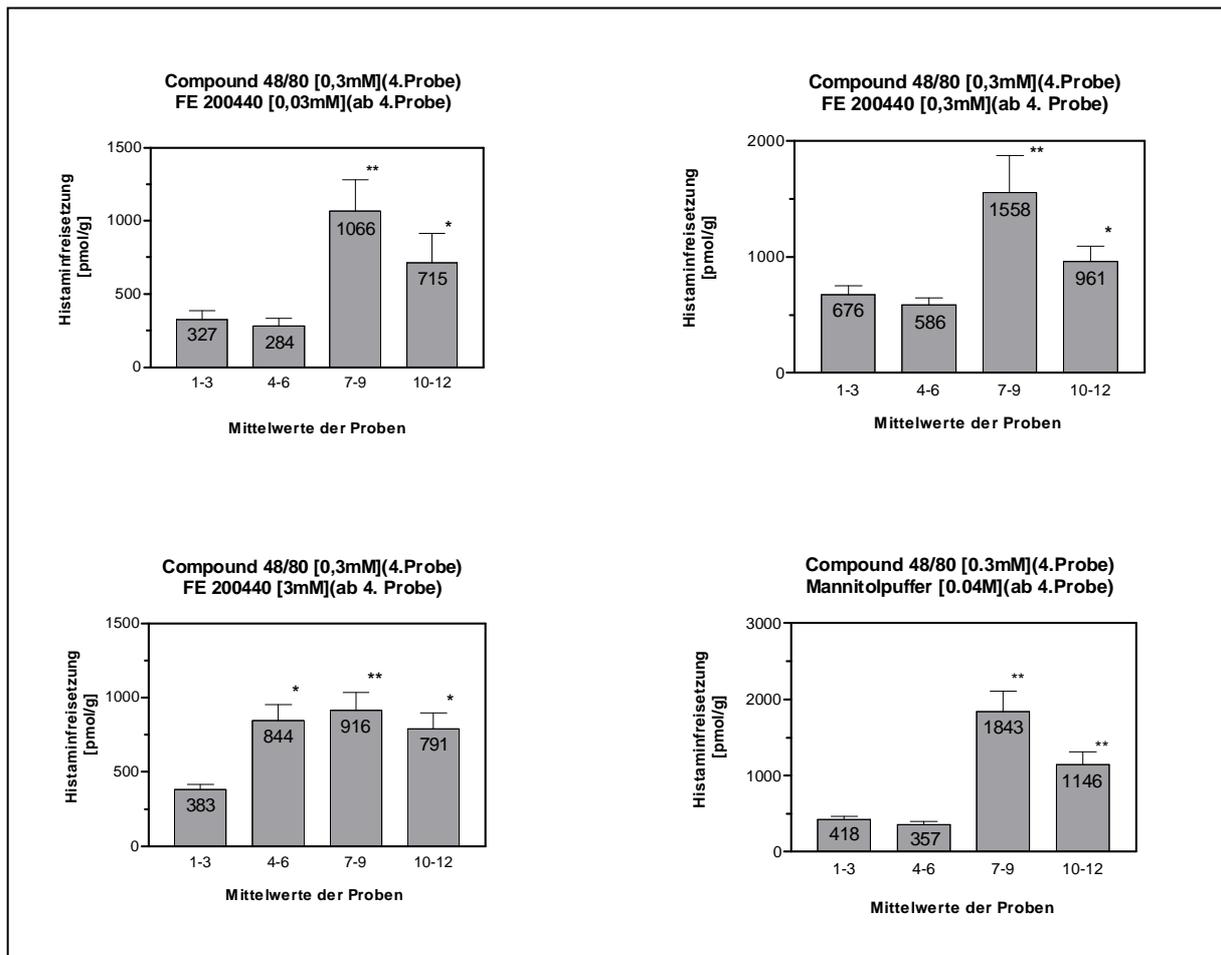


Abb.4.2A: Mittelwerte der Histaminfreisetzung der Proben 1-3, 4-6, 7-9 und 10-12 aus den Messungen der Stimulation mit Compound 48/80 in der Konzentration 0.3 mM und FE 200440 in den Konzentrationen 0.03, 0.3 und 3 mM sowie des Mannitolpuffers der Konzentration 0.04 M. Die 4 Grafiken sind eine Zusammenfassung der Abbildungen 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4 und 4.1.5. In den Balken ist jeweils der Mittelwert der Histaminfreisetzung in pmol/g angegeben. Die Mittelwerte der Proben wurden jeweils untereinander und mit der Histaminruheabgabe verglichen. Grafik oben links, oben rechts und unten rechts: Die mittlere Histaminfreisetzung der Proben 7-9 beziehungsweise 10-12 ist jeweils signifikant verschieden zu der mittleren Freisetzung der Proben 4-6. Grafik unten links: Die mittlere Histaminfreisetzung der Proben 4-6, 7-9 beziehungsweise 10-12 ist jeweils signifikant verschieden zu der mittleren Freisetzung der Proben 1-3 und der Proben 4-6 der Kontrolle ($p < 0.005^*$; $p < 0.0001^{**}$).

Tabelle 4a: Mittelwerte der stimulierten Histaminfreisetzung humaner Haut [pmol/g +/- SEM]
(die Signifikanzen beziehen sich auf die basale Histaminfreisetzung der Proben 4-6 der Kontrollfreisetzung; $p < 0.005$ *, $p < 0.0001$ **, nicht signifikant = ns)

Probe	Kontrolle	FE200440 [0.03mM]	FE200440 [0.3mM]	FE200440 [3mM]	Mannitol-Puffer [0.04M]
1	566 +/- 62	370 +/- 71	728 +/- 76	414 +/- 38	436 +/- 47
2	552 +/- 66	326 +/- 57	690 +/- 83	376 +/- 34	423 +/- 52
3	486 +/- 55	282 +/- 48	609 +/- 66	358 +/- 32	398 +/- 40
4	496 +/- 58	315 +/- 56	622 +/- 62	849 +/- 118	356 +/- 43
5	441 +/- 51	269 +/- 47	592 +/- 64	865 +/- 114	361 +/- 48
6	425 +/- 46	266 +/- 50	546 +/- 58	818 +/- 100	355 +/- 40
7	1122 +/- 158	869 +/- 141	1486 +/- 313	922 +/- 102	1453 +/- 189
8	1548 +/- 192	1229 +/- 224	1817 +/- 379	951 +/- 134	2156 +/- 324
9	1218 +/- 168	1099 +/- 271	1370 +/- 261	876 +/- 132	1922 +/- 296
10	942 +/- 110	879 +/- 242	1174 +/- 205	918 +/- 129	1408 +/- 225
11	821 +/- 90	716 +/- 196	925 +/- 86	767 +/- 108	1177 +/- 170
12	690 +/- 72	551 +/- 157	783 +/- 113	688 +/- 82	853 +/- 119
<hr/>					
Mittelwert 1-3	537 +/- 60	327 +/- 58 ns	676 +/- 73 ns	383 +/- 34 ns	418 +/- 45 ns
Mittelwert 4-6	453 +/- 50	284 +/- 50 ns	586 +/- 56 ns	844 +/- 107*	357 +/- 43 ns
Mittelwert 7-9	1296 +/- 158**	1066 +/- 207**	1558 +/- 306**	916 +/- 121**	1843 +/- 256**
Mittelwert 10-12	818 +/- 91*	715 +/- 198*	961 +/- 135*	791 +/- 106*	1146 +/- 171*

4.3 Histaminfreisetzung aus humanen Bronchien

4.3.1 Kontrollversuche mit A23187

Die Stimulation humaner Bronchien wurde mit dem Kalziumionophor A23187 in der Konzentration von 10 μ M induziert (Abb. 4.3.1). Nach Zimmermann (2000) erwies sich das Kalziumionophor A23187 dieser Konzentration als optimaler Stimulus für die Histaminfreisetzung aus humanen Bronchien. Die Zugabe erfolgte in der 34. Minute der Sammelphase, sodass die Inkubation eine Minute dauerte. A23187 führte zu einem sofortigen signifikanten Anstieg der Histaminfreisetzung auf 354 % über der basalen Freisetzung. (Proben 1-3: 701 ± 105 pmol/g; Proben 8-10: 2482 ± 810 pmol/g). Das Verhältnis der Proben 4-6/1-3 ergab 0.96 ± 0.03 , das der stimulierten Proben 8-10/4-6 ergab 3.52 ± 0.58 . Die Mittelwerte der Proben 1-3, 4-6 und 8-10 wurden untereinander verglichen, um Signifikanzen deutlich zu machen (Abb. 4.3A).

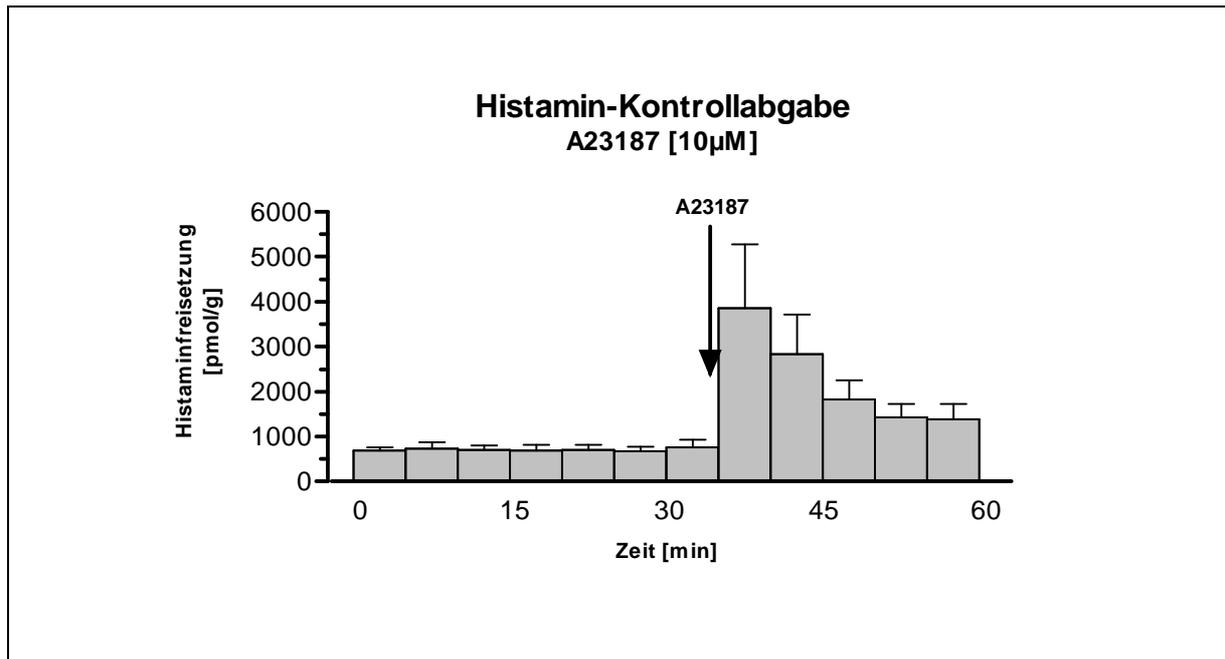


Abb. 4.3.1: Kontrollversuch zur Histaminfreisetzung aus humanen Bronchien mit dem Kalziumionophor A23187 in der Konzentration von 10 µM. Die Zugabe erfolgte in der 34. Minute. Die Histaminfreisetzung ist angegeben in pmol/g ± SEM. Die Sammelfase lief über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Stichprobenumfang n=12 von 8 unterschiedlichen Patienten (N=8).

4.3.2 Auswirkung von FE 200440 auf die Histaminfreisetzung

Humane Bronchien wurden mit FE 200440-haltigem Medium in den Konzentrationen 0.3 mM und 3 mM superfundiert. Der Zusatz erfolgte ab der 16. Minute im Austausch mit der eigentlichen Nährlösung. Zur Stimulation wurde wiederum A23187 in der Konzentration von 10 µM in die 7. Probe (34. Minute) appliziert.

In einer Konzentration von 0.3 mM konnte, verglichen mit der basalen Abgabe, keine Beeinflussung der Histaminfreisetzung durch FE 200440 festgestellt werden (Abb. 4.3.2). Das Verhältnis der Proben 4-6/1-3 lag bei 0.88 ± 0.01 und ergab somit keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollversuchen (0.96 ± 0.03). Auch das Verhältnis der stimulierten Proben ergab keine Veränderung der freigesetzten Histaminmenge (Proben 8-10/4-6: 3.65 ± 0.19 ; Kontrolle: 3.52 ± 0.58). Die Mittelwerte der Proben sind in Tabelle 4b zusammengefasst.

FE 200440 in einer Konzentration von 3 mM verursachte einen marginalen Anstieg der freigesetzten Histaminmenge aus dem Gewebe auf 162 % über der basalen Abgabe (Proben 1-3: 684 ± 134 pmol/g; Proben 4-6: 1109 ± 120 pmol/g) (Abb. 4.3.3). Das Verhältnis der Proben 4-6/1-3 ergab ein Verhältnis von 1.77 ± 0.24 (Kontrolle: 0.96 ± 0.03). Im Verlauf der

weiteren 10 Minuten der Inkubation sank die Histaminfreisetzung zur 6. Probe wieder ab auf 110 % der basalen Abgabe (755 ± 130 pmol/g). Die stimulierte Freisetzung wurde durch FE 200440 nicht signifikant beeinflusst (Proben 8-10/4-6: 2.37 ± 0.27 verglichen mit der Kontrolle: 3.52 ± 0.58). Die Mittelwerte der Histaminfreisetzung der Proben 1-3, 4-6 und 8-10 wurden untereinander und mit den Mittelwerten der Kontrolle verglichen, um die Signifikanzen deutlich zu machen (Abb. 4.2A). Die Mittelwerte sind in der Tabelle 4b zusammengestellt.

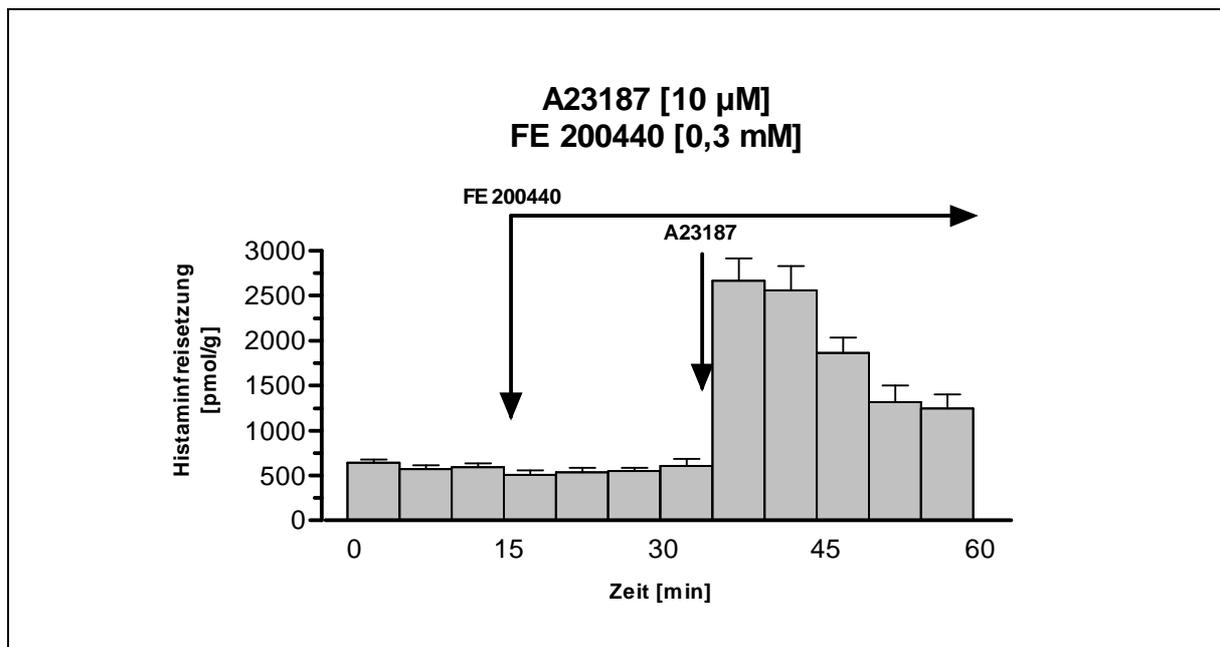


Abb. 4.3.2: Effekt von FE 200440 in der Konzentration von 0.3 mM auf die Freisetzung von Histamin aus humanen Bronchien. Die Zugabe erfolgte ab der 16. Minute, bei einer Gesamtinkubationszeit von 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Stimulation mit A23187 in der 34. Minute. Die Histaminfreisetzung ist angegeben in pmol/g \pm SEM. Stichprobenumfang n=10 von 5 unterschiedlichen Patienten (N=5).

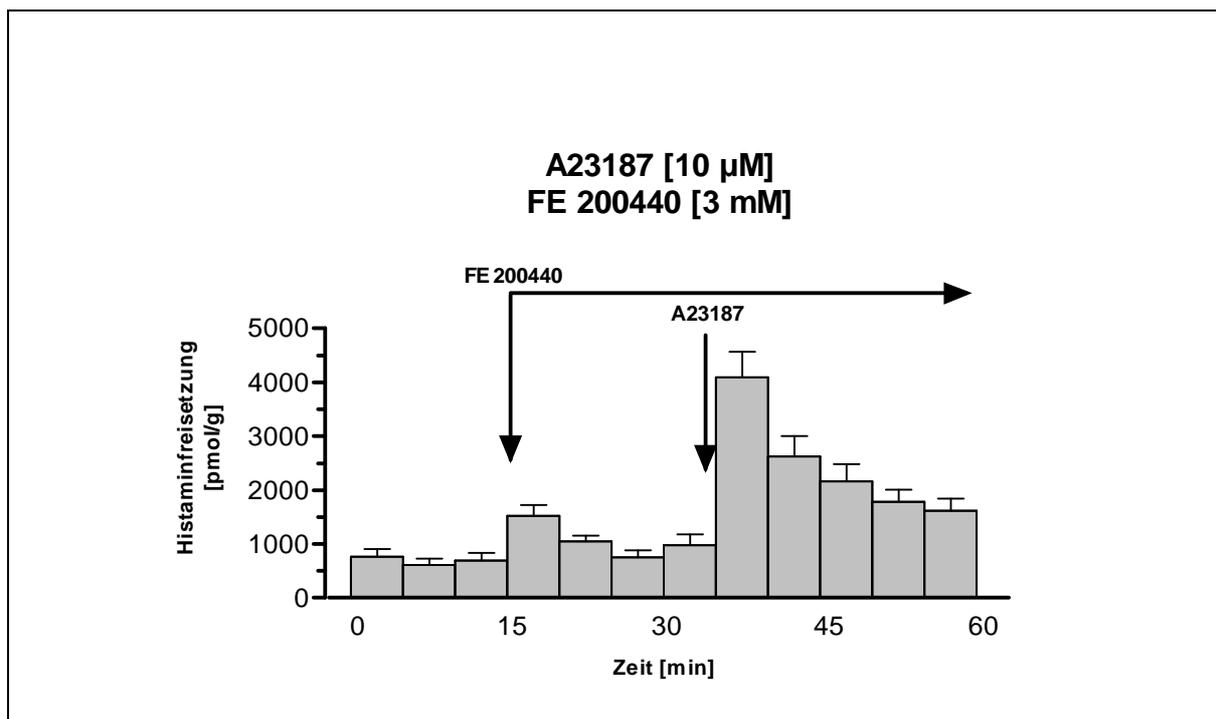


Abb. 4.3.3: Effekt von FE 200440 in der Konzentration 3 mM auf die Freisetzung von Histamin aus humanen Bronchien. Die Zugabe erfolgte ab der 16. Minute, bei einer Gesamtkubationszeit von 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Stimulation mit A23187 in der 34. Minute. Die Histaminfreisetzung ist angegeben in pmol/g \pm SEM. Stichprobenumfang n=12 von 6 unterschiedlichen Patienten (N=6).

4.3.3 Auswirkung des Mannitol-Puffers auf die Histaminfreisetzung

Der Mannitol-Puffer wurde analog humaner Haut in der Konzentration von 0.04 M ab der 16. Minute in das Organbad gegeben. In der 34. Minute wurde mit A23187 in der Konzentration 10 μ M stimuliert (Abb. 4.3.4). Das Ergebnis, verglichen mit den Kontrollversuchen, zeigte weder eine Beeinflussung der Basalabgabe (Probe 4-6/1-3: 1.05 ± 0.09 ; Kontrolle: 0.96 ± 0.03), noch der stimulierten Freisetzung (Probe 8-10/4-6: 3.57 ± 0.48 ; Kontrolle: 3.52 ± 0.58). Der Mittelwert der Proben 1-3 ergab 390 ± 116 pmol/g und der Proben 8-10 1611 ± 418 pmol/g (Tabelle 4b). Die Mittelwerte der Proben 1-3, 4-6 und 8-10 wurden untereinander verglichen, um Signifikanzen deutlich zu machen (Abb. 4.3A).

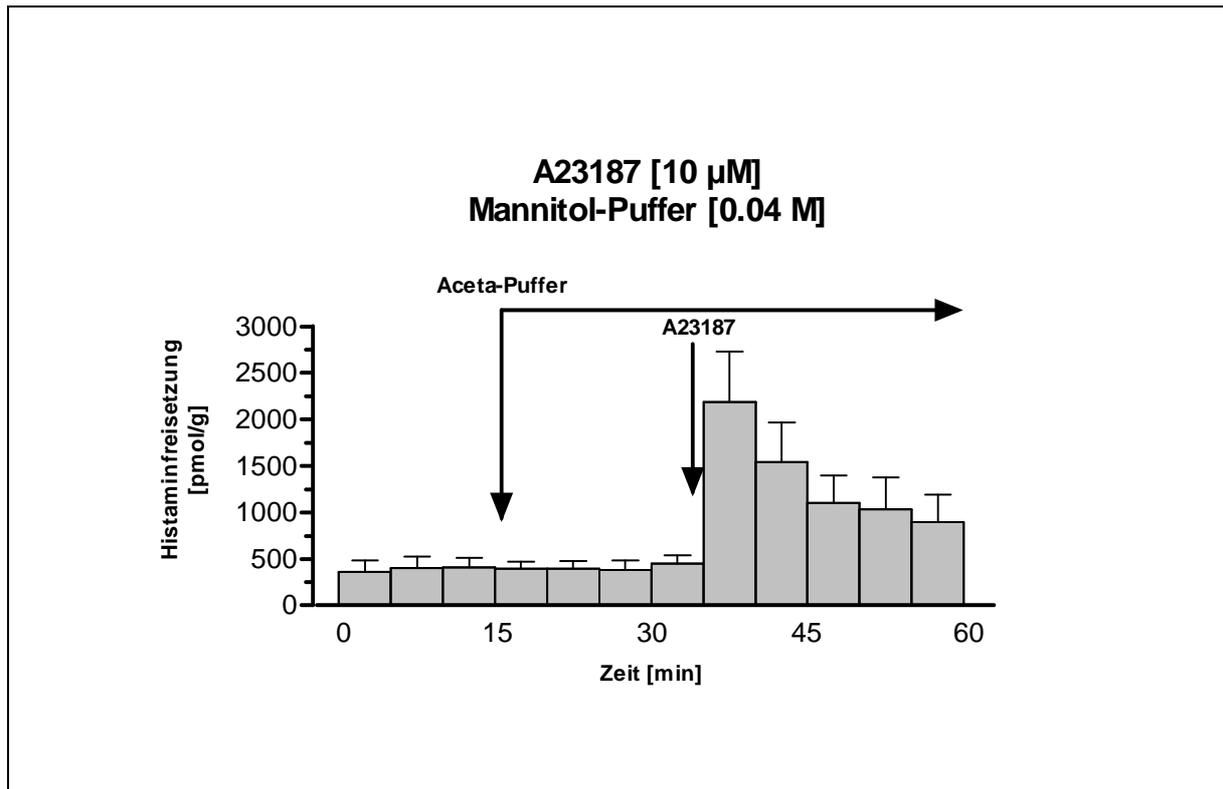


Abb. 4.3.4: Auswirkung des Mannitol-Puffers in der Konzentration 0.04 M auf die Abgabe von Histamin aus humanen Bronchien bei Zugabe ab der 16. Probe. Die Inkubation lief über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Stimulation erfolgte in der 34. Minute mit A23187 in der Konzentration 10 µM. Die Histaminmenge ist angegeben in pmol/g \pm SEM. Stichprobenumfang n=10 von 5 unterschiedlichen Patienten (N=5).

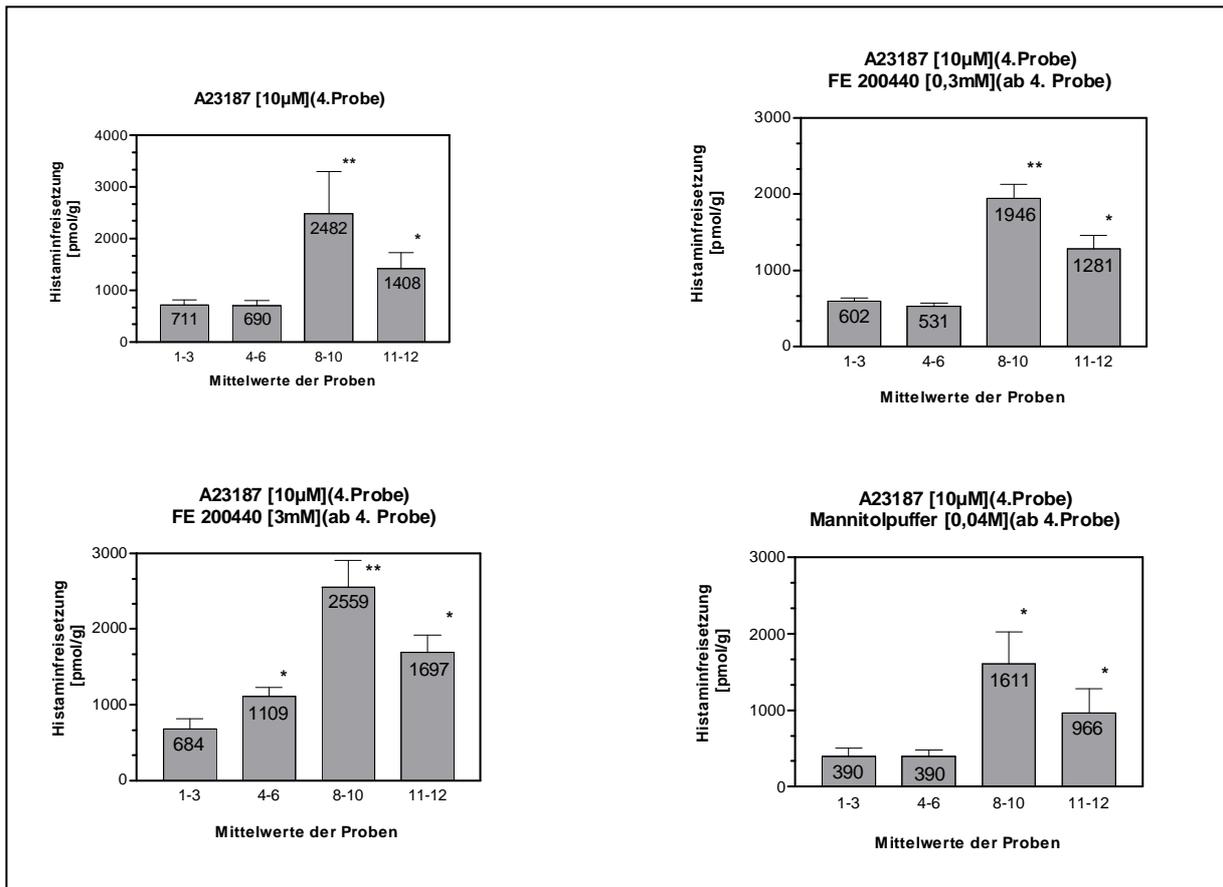


Abb.4.3A: Mittelwerte der Histaminfreisetzung der Proben 1-3, 4-6, 8-10 und 11-12 aus den Messungen der Stimulation mit A23187 in der Konzentration 10 µM und FE 200440 in den Konzentrationen 0.3 und 3 mM sowie des Mannitolpuffers der Konzentration 0.04 M. Die 4 Grafiken sind eine Zusammenfassung der Abbildungen 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3 und 4.3.4. In den Balken ist jeweils der Mittelwert der Histaminfreisetzung in pmol/g angegeben. Die Mittelwerte der Proben wurden jeweils untereinander und mit der Histaminruheabgabe verglichen. Die mittlere Histaminfreisetzung der Proben 8-10 ist jeweils signifikant verschieden zu der mittleren Freisetzung der Proben 4-6 sowie der Proben 4-6 der Kontrolle ($p < 0.05^*$; $p < 0.0001^{**}$).

Tabelle 4b: Mittelwerte der stimulierten Histaminfreisetzung humaner Bronchien [pmol/g +/- SEM]
 (die Signifikanzen beziehen sich auf die basale Histaminfreisetzung der Proben 4-6 der Kontrollfreisetzung; $p < 0.05$ *, $p < 0.0001$ **, nicht signifikant = ns)

Probe	Kontrolle	FE200440 [0.3mM]	FE200440 [3mM]	Mannitol-Puffer [0.04M]
1	659 +/- 70	642 +/- 34	759 +/- 142	361 +/- 129
2	737 +/- 141	572 +/- 44	606 +/- 119	401 +/- 123
3	701 +/- 105	591 +/- 42	687 +/- 142	408 +/- 102
4	692 +/- 121	506 +/- 54	1524 +/- 202	391 +/- 78
5	710 +/- 112	538 +/- 51	1049 +/- 106	397 +/- 82
6	670 +/- 97	550 +/- 36	755 +/- 130	382 +/- 100
7	764 +/- 161	609 +/- 73	973 +/- 203	450 +/- 88
8	3852 +/- 1414	2669 +/- 243	4086 +/- 480	2190 +/- 534
9	2830 +/- 885	2562 +/- 269	2617 +/- 380	1543 +/- 426
10	1820 +/- 430	1866 +/- 171	2156 +/- 322	1100 +/- 295
11	1426 +/- 301	1317 +/- 186	1782 +/- 220	1035 +/- 345
12	1391 +/- 335	1245 +/- 160	1613 +/- 232	898 +/- 290
Mittelwert 1-3	711 +/- 101	602 +/- 38 ns	684 +/- 134 ns	390 +/- 116 ns
Mittelwert 4-6	690 +/- 109	531 +/- 38 ns	1109 +/- 120 *	390 +/- 86 ns
Mittelwert 8-10	2482 +/- 810 **	1946 +/- 185 **	2559 +/- 347 **	1611 +/- 418 *

4.4 Histaminfreisetzung aus humanen Bronchien von Patienten mit oder ohne COPD

Aufgrund der Erkenntnis von Möhlig (2000), dass sich möglicherweise Unterschiede in der Histaminfreisetzung aus Bronchien von Patienten ohne oder mit nur einer leichten COPD und Patienten mit einer schweren COPD ergaben, wurden nachfolgende Versuche zur Hypothesenprüfung durchgeführt:

Das Bronchialgewebe von 26 Patienten wurde auf die Histaminfreisetzung unter Stimulation mit dem Kalziumionophor A23187 untersucht. In der gleichen Versuchsreihe wurde versucht, die stimulierte Histaminfreisetzung mit Oxotremorin und Acetylcholin, Agonisten am muskarinergen Rezeptor, zu hemmen. Oxotremorin wurde in den finalen Konzentrationen 1 nM und 10 nM im Organbad getestet und Acetylcholin in den Konzentrationen 10 nM und 100 nM.

Im Vorfeld der Versuche war nicht bekannt, ob das untersuchte Gewebe von Patienten mit oder ohne COPD stammte, um neutral an eine spätere Auswertung herangehen zu können. Der Versuchsablauf entsprach dem der vorherigen Versuche. Der Stimulus A23187 wurde in der 34. Minute in der Konzentration 10 μ M in das Organbad appliziert und die Rezeptoragonisten wurden ab der 15. Minute (ab der 4. Probe) dem Inkubationsmedium zugesetzt. Die Gesamtinkubation lief über 60 Minuten (12 Proben).

Anhand der Effluxkurven der einzelnen Versuche (Abbildungen 4.4.1 und 4.4.2) wurde deutlich, dass Unterschiede der Histaminfreisetzung zwischen den Bronchien von Patienten ohne oder leichter und Patienten mit schwerer COPD bestanden.

Die spätere Zuordnung der Patientendaten bezüglich Diagnosen, Nikotinabusus, vorheriger Medikation und Lungenfunktion bestätigten die bestehenden Unterschiede der beiden Gruppen. Die Patienten der ersten Gruppe wiesen keine, beziehungsweise eine geringgradige COPD (bei drei von 14 Patienten) auf. Der durchschnittliche Zigarettenkonsum lag bei 22 Packyears, wobei 21% der Patienten dieser Gruppe Nichtraucher waren. Die Lungenfunktionsprüfung ergab in dieser Gruppe einen Tiffeneau, der deutlich über 60% betrug (durchschnittlich 68%). Der mittlere FEV1-Wert lag bei 81%. Die Patienten der zweiten Gruppe wiesen alle eine mittel- bis hochgradige COPD auf, rauchten im Durchschnitt 50 Packyears und hatten deutlich schlechtere Lungenfunktionswerte (durchschnittlich 56% Tiffeneau und einen FEV1-Wert von 57%) (Tabelle 4c).

Tabelle 4c: Klinische Daten der Patienten der Gruppen ohne und mit schwerer COPD

	Gruppe 1 [14 Patienten] (keine bzw. leichte COPD)	Gruppe 2 [12 Patienten] (schwere COPD)
Geschlecht	9 x männlich; 5 x weiblich	12 x männlich
Alter	61.7 (46 - 75)	67.5 (60 - 75)
Nikotin	22 Packyears (4 - 45)	50 Packyears (20 - 96)
Tiffeneau Test	68% (56 - 84)	56% (49 - 60)
FEV1	81% (62 - 84) 2.19Liter (1.65 - 3.08)	57% (34 - 71) 1.63Liter (0.86 - 2.2)
Behandlung		
Muskarinrezeptorantagonisten	3 x (21%)	6 x (50%)
Kortikoide	3 x (21%)	5 x (42%)
β 2-Agonisten	2 x (14%)	5 x (42%)
Theophyllin	1 x (7%)	2 x (16%)

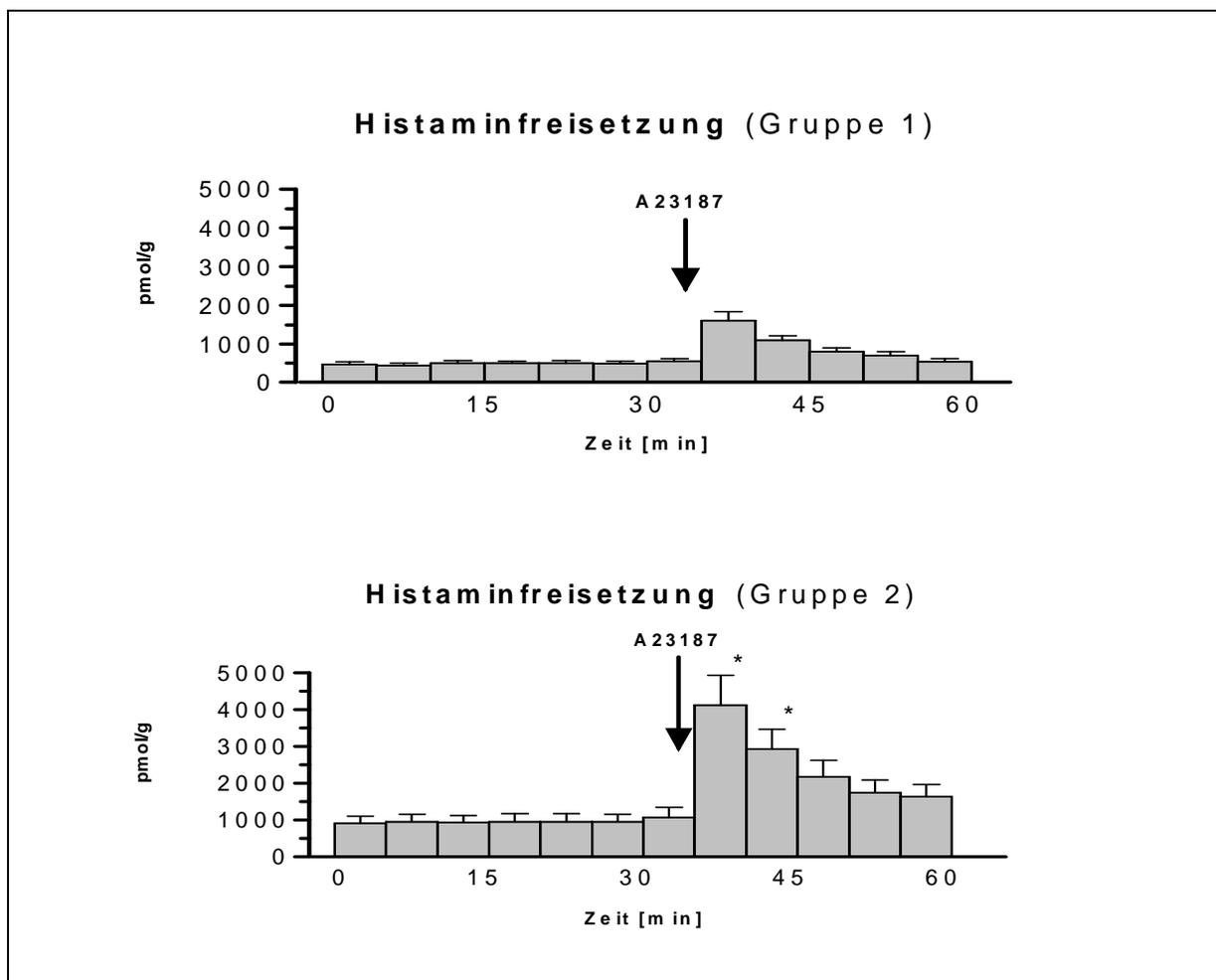


Abb. 4.4.1: Kontrollversuche der stimulierten Histaminfreisetzung durch A23187 in der Konzentration 10 μ M (Zugabe in der 34. Minute) der Patienten mit keiner oder leichter COPD (Gruppe 1) und Patienten mit schwerer COPD (Gruppe 2). Die Inkubation lief über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Die Histaminmenge ist angegeben in pmol/g \pm SEM. Die stimulierte Histaminfreisetzung der Proben 8 und 9 der Gruppe 2 ist signifikant höher als die der Gruppe 1 ($p < 0.001$). Stichprobenumfang $n=14$ (Gruppe 1); $n=12$ (Gruppe 2).

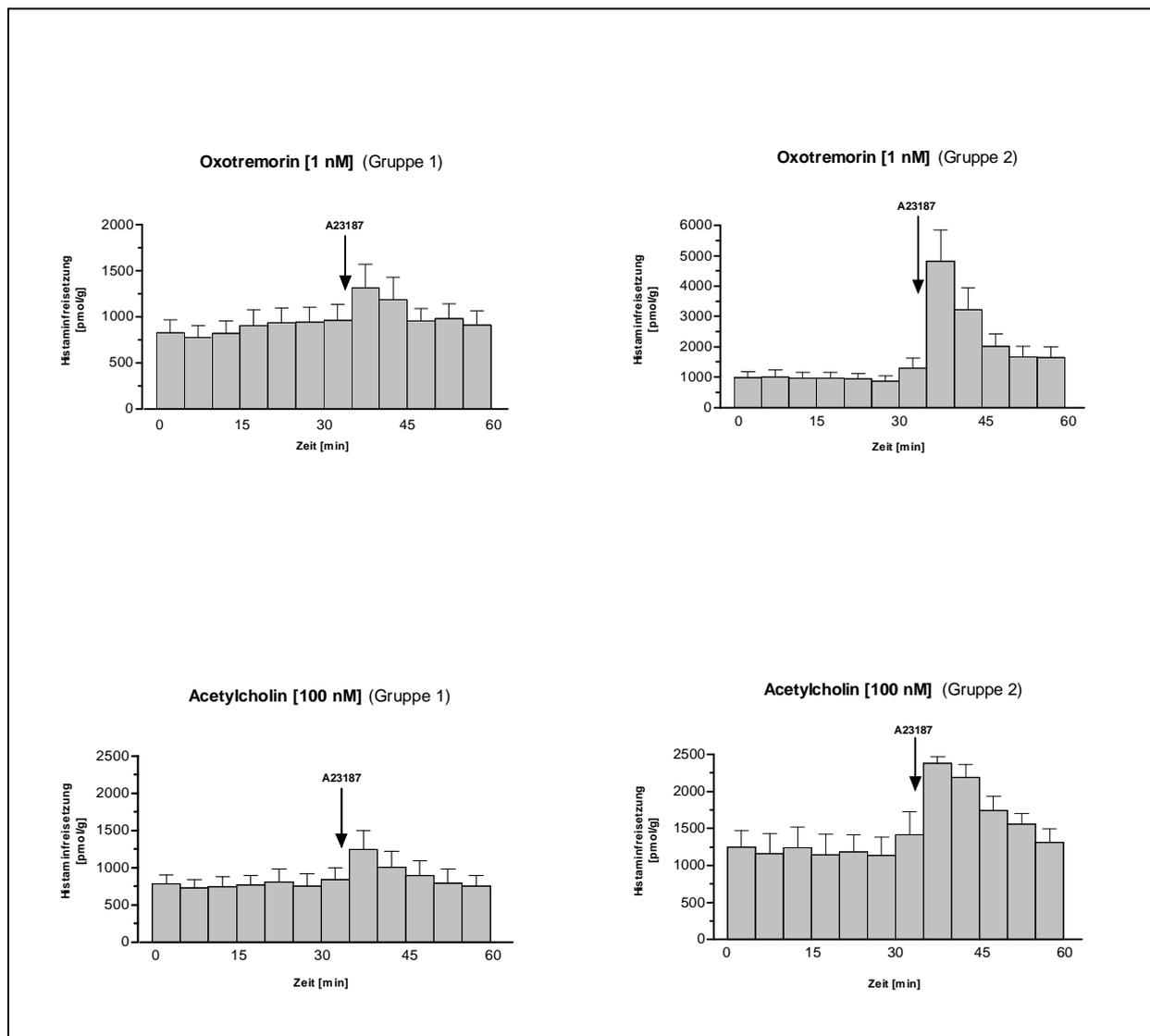


Abb. 4.4.2: Inhibitorischer Effekt von Oxotremorin in der Konzentration von 1 nM und Acetylcholin in der Konzentration von 100 nM auf die stimulierte Histaminfreisetzung durch A23187 in der Konzentration 10 μ M (Zugabe in der 34. Minute) bei Patienten mit keiner oder leichter COPD (Gruppe 1) und Patienten mit schwerer COPD (Gruppe 2). Die Inkubation lief über 60 Minuten mit jeweils 12 Proben im Abstand von 5 Minuten. Die Histaminmenge ist angegeben in pmol/g \pm SEM. Stichprobenumfang n=12 (Gruppe 1); n=8 (Gruppe 2).

4.4.1 Histaminfreisetzung aus Bronchien von Patienten ohne oder mit leichter COPD

Die mittlere Histaminfreisetzung der stimulierten Proben (8-10) mit A23187 in der Konzentration 10 μ M, verglichen mit der basalen Freisetzung (Proben 4-6) der Kontrollversuche, ergab eine Steigerung auf $261 \pm 29\%$ (Abb. 4.4.1). Durch die Zugabe von Oxotremorin in der Konzentration von 1 nM und 10 nM ab der 4. Probe wurde der stimulierende Effekt auf die Histaminfreisetzung von A23187 auf $130 \pm 9\%$, beziehungsweise

157 ± 21% der basalen (Proben 4-6) Freisetzung verringert. Acetylcholin in den Konzentrationen von 10 nM und 100 nM reduzierte den Stimulationseffekt von A23187 auf 147 ± 8%, beziehungsweise 142 ± 11% der Basalabgabe. Die Ergebnisse zeigen, dass die Rezeptoragonisten eine signifikante Hemmung der stimulierten Freisetzung verursachen (Abb. 4.4.3).

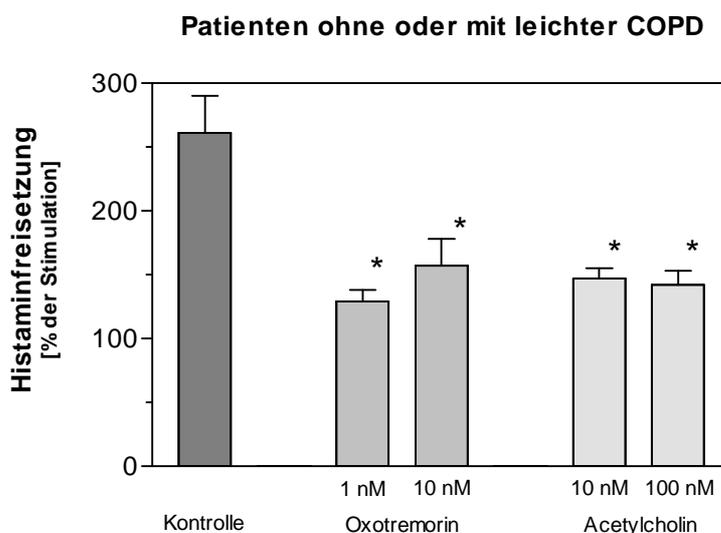


Abb. 4.4.3: Stimulationseffekt von A23187 auf die Histaminfreisetzung in den Proben 8-10 in Prozent ± SEM über der Basalabgabe der Proben 4-6 von Patienten mit keiner oder geringgradiger COPD. Der erste Balken zeigt die Kontrolle, Balken 2 und 3 zeigen die Wirkung von Oxotremorin in der Konzentration 1 nM und 10 nM und die Balken 4 und 5 die Wirkung von Acetylcholin in der Konzentration 10 nM und 100 nM. Die Signifikanzen (*) beziehen sich auf den Unterschied zur Kontrolle. Stichprobenumfang n=14.

4.4.2 Histaminfreisetzung aus Bronchien von Patienten mit schwerer COPD

Die Ergebnisse der Kontrollversuche mit A23187 in der Konzentration 10 µM zeigen eine mittlere, stimulierte Histaminfreisetzung (Proben 8-10) von 376 ± 42% der basalen Abgabe (Proben 4-6) (Abb. 4.4.1). Dies ist ein signifikanter Unterschied zu der Kontrolle der ersten Gruppe ($p < 0.001$).

Die Versuche mit den Rezeptoragonisten zeigen einen Hemmungseffekt auf die stimulierte Histaminfreisetzung, der jedoch deutlich geringer ausfällt als bei der Gruppe 1 (Abb. 4.4.4).

Die stimulierte Histaminfreisetzung (Proben 8-10) in den Versuchen mit Oxotremorin in den Konzentrationen 1 nM und 10 nM liegt bei $334 \pm 41\%$ beziehungsweise $303 \pm 53\%$ der basalen Freisetzung (Proben 4-6), in den Versuchen mit Acetylcholin in den Konzentrationen 10 nM und 100 nM bei $257 \pm 86\%$ beziehungsweise $212 \pm 47\%$.

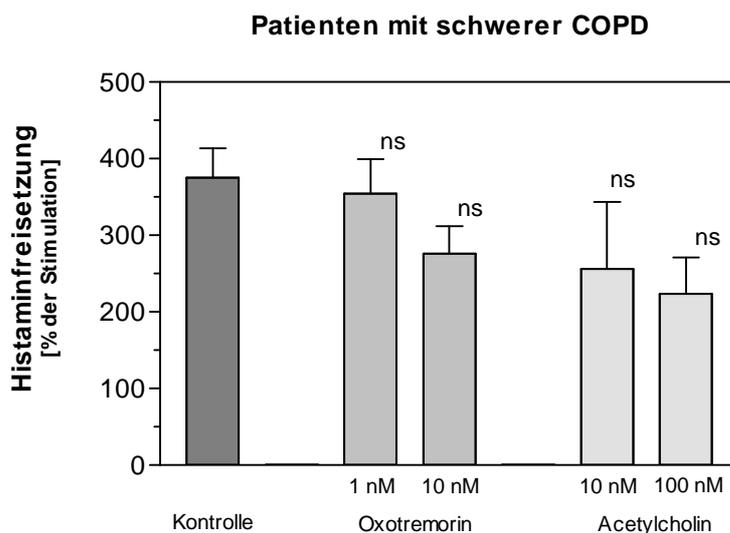


Abb. 4.4.4: Stimulationseffekt von A23187 auf die Histaminfreisetzung in den Proben 8-10 in Prozent \pm SEM über der Basalabgabe der Proben 4-6 von Patienten mit schwerer COPD. Der erste Balken zeigt die Kontrolle, Balken 2 und 3 zeigen die Wirkung von Oxotremorin in der Konzentration 1 nM und 10nM und die Balken 4 und 5 die Wirkung von Acetylcholin in der Konzentration 10 nM und 100 nM. (ns = nicht signifikant, bezogen auf die Kontrolle); Stichprobenumfang n=12.

5. Diskussion

5.1 Analytisches Verfahren

Anlehnend an frühere Arbeiten zur Stimulation der Histaminfreisetzung aus Mastzellen isolierter humaner Haut und Bronchien (Baumgärtner, 1998; Zimmermann, 2000; Möhlig, 2000) wurde die im Kapitel „Material und Methoden“ beschriebene Versuchsmethodik gewählt. Diese erwies sich mehrfach als sehr geeignet, um die basale Histaminfreisetzung, beziehungsweise die stimulierte Freisetzung aus Mastzellen im ursprünglichen Zellverbund reproduzierbar zu messen. Der Vorteil in der Verwendung kompletter Gewebstücke gegenüber isolierten Mastzellen war die Möglichkeit, physiologische Regelmechanismen und Zell-Zell Interaktionen zu erhalten (Reinheimer et al., 1997). Weiterhin konnte die Manipulation der Mastzellen durch die schonende Präparation relativ gering gehalten werden und eine vorherige mechanische oder chemische Stimulation der Zellen vermieden werden.

Die Bestimmung des Histamingehalts der Proben und Standards wurde mittels Hochdruck-flüssigkeitschromatographie mit anschließender fluorometrischer Detektion vorgenommen. Dieses Verfahren war aufgrund der relativ hohen und konstanten Histaminfreisetzung aus den verschiedenen Geweben (Schweinehaut: ~180 pmol/g; humane Haut: ~450 bis ~2000 pmol/g; humaner Bronchus: ~550 bis ~ 3800 pmol/g) ausreichend sensibel, um eine quantitative Auswertung der Versuche durchführen zu können (Reinheimer et al., 1997). Die Nachweisgrenze für Histamin in dieser Messapparatur lag ungefähr bei 50 pg Histamin/Injektion (Möhlig, 2000). Die Gleichheit der Messungen wurde im Bereich von 1-1000 pmol/Injektion nachgewiesen (Baumgärtner 1998).

Die teilweise aufgetretene Streubreite der einzelnen Messungen um bis zu 300% ist auf die nicht vermeidbare Inhomogenität der Gewebstücke und auf die individuell unterschiedliche Dichte der Mastzellen im Gewebe zurückzuführen.

Eine Lagerung von Proben und Standards bei -20° C über einen Zeitraum von mehreren Tagen ergab nachweislich keine Veränderung der Messergebnisse.

5.2 Freisetzungsversuche

5.2.1 Haut von Mastschweinen

In dieser Arbeit wurde erstmals versucht, das Modell zur Stimulation der Histaminfreisetzung aus Mastzellen im intakten Zellverbund auf Hautgewebe von Schweinen zu übertragen. Dies ist in der Hinsicht gelungen, dass eine konstante Histaminfreisetzung über einen Zeitraum von insgesamt 60 Minuten gemessen werden konnte. Die durchschnittliche Freisetzung lag bei 175 ± 27 pmol Histamin pro Gramm Feuchtgewicht. Der mittlere Gesamthistamingehalt der Bauchhaut von Schweinen lag bei 28.4 ± 2.7 µg/g Feuchtgewicht. Das entspricht den in der Literatur beschriebenen Angaben (Lorenz et al., 1973).

Der Versuch, die Histaminfreisetzung zu stimulieren, gelang jedoch weder mit dem bekannten Mastzelldegranulator Compound 48/80 in den getesteten Konzentrationen 0.055, 0.164 sowie 0.3 mM, noch mit dem Kalziumionophor A23187 in der Konzentration 10 µM. Die eingesetzten Konzentrationen wurden gewählt, weil diese nachweislich die Histaminfreisetzung aus humaner Haut, humanen Bronchien sowie Bronchien von Laborratten deutlich stimulieren konnten, teilweise auf 320% der basalen Abgabe (Reinheimer et al., 1997; Möhlig, 2000).

Der Oxytocinantagonist FE 200440 führte in den Konzentrationen 0.03, 0.3 und 3 mM ebenfalls keine Veränderung der basalen Histaminfreisetzung herbei. Die Versuche mit FE 200440 wurden hauptsächlich aus dem Grunde durchgeführt, einen Vergleich mit humaner Haut zu erbringen.

Risdahl und Mitarbeiter testeten die Wirkung von Compound 48/80 an isolierten Mastzellen vom Schwein *in vitro* und bewerteten die gemessene Histaminfreisetzung als Beweis für die aufgetretene Hautrötung und Ödembildung nach intradermaler Injektion *in vivo*. Die Ergebnisse zeigten, dass Compound 48/80 in der Lage war, enzymatisch isolierte Mastzellen zu stimulieren und eine konzentrationsabhängige Histaminfreisetzung zu provozieren. Compound in der Konzentration 0.01 mM verursachte eine Freisetzung von 7.3% des Gesamtgehaltes aufsteigend bis 28% bei einer Konzentration von 1 mM (Risdahl et al., 1995). A23187 verursachte in Experimenten, durchgeführt von Paterson und Mitarbeitern, eine um 52% erhöhte Freisetzung von Histamin aus isolierten Lungenmastzellen (Paterson et al., 1981).

Der Grund, weshalb die eingesetzten Substanzen in den durchgeführten Versuchen die Histaminfreisetzung nicht beeinflussen, ist möglicherweise eine Diffusionsbarriere der verwendeten Stimuli durch das isolierte Gewebe hin zu den Mastzellen. Dies würde bedeuten, dass das angewandte Verfahren (Baumgärtner, 1998; Zimmermann, 2000) bei Hautgewebe von Schweinen im natürlichen Zusammenhang nicht geeignet ist, eine stimulierte Histaminfreisetzung zu messen.

Die Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse zu Riesdahl oder Paterson könnte daran liegen, dass sowohl Riesdahl als auch Paterson Mastzellen verwendeten, die mit Hilfe einer enzymatischen Technik dispergiert wurden (Risdahl et al., 1995; Paterson et al., 1981). Im Gegensatz dazu wurden in den Versuchen dieser Arbeit intakte Gewebestücke verwendet, bei denen Zell-Zell Interaktionen und mögliche Regulationsmechanismen erhalten blieben. Ein weiterer entscheidender Faktor, der die Histaminfreisetzung beeinflusst, ist die Unterschiedlichkeit der Mastzellpopulationen der jeweiligen Gewebe, die sich bezüglich ihrer Stimulation teils gegensätzlich verhalten (Ennis et al., 1991).

Ausgeschlossen werden kann eine Schädigung des Gewebes durch Hypoxie während des Transportes oder bei der Präparation durch die Tatsache, dass der Ablauf der Versuche absolut identisch mit den Untersuchungen humaner Haut waren, bei der eine deutliche Stimulation der Histaminfreisetzung möglich war. Es konnte bei der Haut von Schweinen zwar eine sehr konstante Basalfreisetzung gemessen werden, jedoch wäre diese auch als reine „Leckage“ erklärbar. Eine mögliche Ursache für die nicht nachweisbare Aktivität der Mastzellen im Gewebe wäre eine Schädigung beim Schlachtvorgang der Schweine, die nach dem Entbluten in der Brüh- und Enthaarungsmaschine erhitzt wurden.

Die klinische Bedeutung der Erforschung der physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen zur Freisetzung von Mastzellmediatoren und vor allem des Histamins ist von besonderem Interesse, wenn man die Vielzahl von Erkrankungen und speziell Hauterkrankungen in Betracht zieht, die mit einer Mastzelldegranulation einhergehen (Reedy und Miller, 1989). Im Vordergrund stehen vor allem allergische Hauterkrankungen, wie Urtikaria oder das QUINKE-Ödem, Exzeme und Exantheme, die durch verschiedenste Allergene, zum Beispiel in Futtermitteln oder Arzneimitteln, verursacht werden können (Golbert, 1969; Darmon, 1996). Bei der schwerwiegendsten Form der allergischen Reaktion, dem anaphylaktischen Schock, wird Histamin in großen Mengen ins Blut freigesetzt, was lebensbedrohlichen Reaktionen zur Folge haben kann (Bronchospasmus, Herzarrhythmien) (Hartmann und Meyer, 1993). Das Wissen über die Reaktionen des Körpers auf

Fremdstoffen wie Arzneimitteln, Futtermitteln und anderen Stoffen, die mit dem Körper in Kontakt kommen, ist somit von großer Bedeutung, um schädliche Folgen im Vorhinein ausschließen zu können. Der in den Versuchen getestete Oxytocinantagonist zeigte keine Histamin-freisetzende Wirkung. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Versuchsanordnung nicht geeignet schien, Mastzellen zu stimulieren.

5.2.2 Humane Haut

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Versuche mit dem Oxytocinantagonisten FE 200440 (Ferring Pharmazeutika, Kopenhagen) an humanem Hautgewebe durchgeführt. Es wurde getestet, ob dieser Bindegewebsmastzellen stimuliert und dadurch Histamin freisetzt. Grundlage war die Erkenntnis, dass FE 200440 nach subkutaner Injektion in der Phase I der klinischen Prüfung als Nebenwirkung eine konzentrationsabhängige Hautrötung hervorrief. Die Studie über die lokale Wirkung des Oxytocinantagonisten FE 200440 an humaner Haut wurde von *Ferring Pharmazeutika*, Kopenhagen in Auftrag gegeben. FE 200440 ist ein synthetisches, zyklisches Hexapeptid, das durch Blockade der Rezeptoren im Myometrium des Uterus die physiologische Wirkung von Oxytocin verhindert. FE 200440 besitzt, verglichen mit Atosiban, eine höhere Selektivität zum Oxytocinrezeptor und hat praktisch keinen Effekt auf die Vasopressin-induzierte Kontraktion am humanen Myometrium (Nillson et al., 2003). Der Kalziumeinstrom in die Muskelzellen wird blockiert und eine Kontraktion der Uterusmuskulatur ist nicht mehr möglich (Zingg und Laporte, 2003). Die Affinitätskonstante zum Oxytocinrezeptor liegt bei 0.31 nM (K_i -Wert).

In Hinsicht auf die Veränderungen der Haut, die nach der Injektion auftraten, wurden die Konzentrationen 0.03, 0.3 und 3 mM FE 200440 getestet. In den Versuchen wurden die Hautpräparate zusätzlich mit 0.3 mM Compound 48/80 stimuliert, um die Histaminfreisetzung der Mastzellen zu provozieren. Die degranulierende Wirkung von Compound 48/80 auf Bindegewebsmastzellen humaner Haut ist bekannt (Benyon, 1986; Church, 1999).

Der Grund für eine Stimulation mit Compound war, eine mögliche Beeinflussung der stimulierten Histaminfreisetzung durch den Oxytocinantagonisten beurteilen zu können. Die in den Versuchen gewählte Konzentration von 30 µg/ml des Compounds ergab nach der Dosis-Wirkungsbeziehung den höchsten Stimulationseffekt der Mastzellen (Zimmermann, 2000).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Konzentration von 0.03 und 0.3 mM FE 200440 weder die basale noch die stimulierte Histaminfreisetzung signifikant beeinflusste. FE 200440 der Konzentration 3 mM verursachte einen deutlichen und anhaltenden Anstieg der Histaminabgabe auf 224% der Basalabgabe. Das zeigt eine konzentrationsabhängige, degranulierende Wirkung von FE 200440 auf Bindegewebsmastzellen. Die stimulierende Wirkung von Compound 48/80 belief sich in den Kontrollversuchen auf durchschnittlich 261% der basalen Histaminfreisetzung. Der Vergleich der Stimulationseffekte von Compound 48/80 und FE 200440 zeigte, dass der Oxytocinantagonist FE 200440 erst bei hohen Konzentrationen (3 mM) Bindegewebsmastzellen aktiviert.

Um die aktivierende Wirkung auf Mastzellen der eigentlichen Wirksubstanz des Antagonisten zuordnen zu können, wurden Versuchsreihen mit der Pufferlösung der Substanz durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass der Mannitol-Puffer allein keine histaminliberierende Wirkung besaß.

Die biochemischen Abläufe, über die FE 200440 die Degranulation der Mastzellen verursacht, sind nicht geklärt. Ähnlich wie bei Compound 48/80 könnte es zu einer Interaktion mit membranständigen, GTP-bindenden Proteinen kommen (Bugajski et al., 1995). Eine Beeinflussung des intrazellulären Kalziumspiegels, wie sie durch A23187 verursacht wird, wäre ebenfalls denkbar (Igarashi, 1996). Die Stimulation der Histaminfreisetzung ist in der Konzentration von 3 mM jedoch wahrscheinlich durch eine unspezifische Peptidreaktion verursacht (deShazo und Kemp, 1997). Einem Einsatz von FE 200440 bei der Behandlung vorzeitiger Wehentätigkeit steht diese Erkenntnis nicht entgegen, da die Darreichungsformen zwischen 8 und 10 mg/ml liegen (Nilsson et al., 2003).

Nach subkutaner Injektion von FE 200440 trat bei den Probanden in der klinischen Phase 1 lokal eine leichte Rötung der Haut auf. Diese Hautveränderung zählt zu den unerwünschten Nebenwirkungen des Oxytocinantagonisten. Die allgemeine Definition von Arzneimittelnebenwirkungen ist „eine Reaktion, die dem Empfänger schadet und unbeabsichtigt ausgelöst wird“ (Forth et al., 1978). Nach der klassischen Einteilung werden die Nebenwirkungen wie folgt unterschieden: 1. Toxische Nebenwirkungen 2. Nebenwirkungen im engeren Sinne (durch die pharmakologischen Eigenschaften der Substanz bedingt) 3. Sekundäre Nebenwirkungen (zum Beispiel Mykosen als Folge einer Antibiotikatherapie) 4. Idiosynkrasien (zum Beispiel genetisch bedingte Effekte) und 5. Immunologisch bedingte Nebenwirkungen (meist allergische Reaktionen). Die Arzneimittelnebenwirkungen können die unterschiedlichsten Formen und Ausprägungen

annehmen (Scheler, 1980). Zu beurteilen ist der Grad der Ausprägung, die Häufigkeit des Auftretens, eine eventuelle Dosisabhängigkeit, eine direkt schädigende Wirkung, Tolerabilität oder absolute Intolerabilität und vieles mehr (Kutter, 1978). Nebenwirkungen im eigentlichen Sinne sind Wirkungen, die zum therapeutischen Ziel nicht beitragen (Hasskarl, 1974). Bei der Entwicklung eines neuen Arzneimittels müssen besonders die drei Kriterien "Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit" erfüllt werden. Bei der Beurteilung der Nutzen / Risiko-Bilanz sind daher unerwünschte Wirkungen von Arzneimitteln von größter Bedeutung (Forth et al., 1978). Die Frage, die immer gestellt werden muss, lautet: „Können das Ausmaß und die Wahrscheinlichkeit der unerwünschten Nebenwirkungen als Risiko, angesichts des erwarteten Nutzens, in Kauf genommen werden?“.

Die Hautrötung, die nach subkutaner Injektion von FE 200440 auftrat, war lokal begrenzt und von geringem Ausmaß. Ein Zusammenhang zwischen der gemessenen Histaminfreisetzung und der Rötung der Haut ist anzunehmen. Nach intravenöser Verabreichung einer Infusionslösung kam es bei den Testpersonen nicht zu lokalen Hautveränderungen, daher ist die bedeutendere Applikationsart des Oxytocinantagonisten wahrscheinlich eine intravenöse Injektion. Die toxikologische Routineuntersuchung ergab keinen negativen Effekt. Eine abschließende Beurteilung kann bei dem derzeitigen Wissensstand jedoch noch nicht abgegeben werden.

5.2.3 Humane Bronchien

Die Wirkung von FE 200440 auf mukosale Mastzellen wurde in einer nachfolgenden Versuchsreihe an Präparaten humaner Bronchien getestet. Nach Angaben in der Literatur werden 93% der Mastzellen humaner Bronchien dem Mukosatyp zugerechnet (Irani et al., 1989). Es wurden, entsprechend den Versuchen mit humaner Haut, die Konzentrationen 0.03, 0.3 und 3 mM auf einen möglichen histaminfreisetzungseffekt getestet. Eine zusätzliche Degranulation der Mastzellen wurde mit dem Kalziumionophor A23187 in der Konzentration 10 µM provoziert, um auch die stimulierte Histaminfreisetzung zu messen. A23187 gilt als potenter Histaminliberator an mukosalen Mastzellen, jedoch nicht an Bindegewebsmastzellen (Pearce, 1989). Die degranulierende Wirkung von A23187 wird durch die Einschleusung von extrazellulärem Kalzium in die Mastzelle verursacht und umgeht dadurch den Weg der physiologischen Aktivierung (Igarashi, 1996).

Die Versuche ergaben, dass FE 200440 in den beiden niedrigen Konzentrationen (0.03 und 0.3 mM) keine Histaminfreisetzung evozieren konnte. Die hohe Konzentration von 3 mM

zeigte einen sofortigen Anstieg der Histaminkonzentration in der 4. Probe auf 220% der mittleren Basalabgabe. Dieser Effekt war transient und sank in der 6. Probe auf 110%.

Um auch diesen Effekt der eigentlichen Wirksubstanz des Oxytocinantagonisten zuordnen zu können, wurden abermals Versuche mit der Pufferlösung ohne den Antagonisten durchgeführt. Das Resultat zeigte, dass der Mannitolpuffer allein nicht in der Lage war Mastzellen humaner Bronchien zu stimulieren.

Das Gesamtmaß der mit A23187 verursachten Histaminfreisetzung wurde durch keine der drei getesteten Konzentrationen des Oxytocinantagonisten beeinflusst.

Aus den Ergebnissen kann man ersehen, dass FE 200440 ebenfalls in der Lage ist, mukosale Mastzellen zu stimulieren. Die Sensitivität gegenüber Bindegewebsmastzellen war jedoch deutlich höher. Als Begründung dieser Tatsache kann erstens der geringere prozentuale Freisetzungseffekt Histamins an mukosalen Mastzellen und zweitens der rasch vorübergehende Stimulationseffekt an mukosalen Mastzellen, verglichen mit dem anhaltenden Effekt an Bindegewebsmastzellen, genannt werden. Der Effekt von FE 200440 in der Konzentration von 3 mM an mukosalen Mastzellen ist dennoch eher mit einer unspezifischen Peptidreaktion zu erklären, die zur Folge hat, dass vermehrt Histamin freigesetzt wird (Winbery und Lieberman, 2002).

5.3 Muskarinerge Inhibition der Mastzellfunktion humaner Bronchien

Der hemmende Effekt von Acetylcholin und Oxotremorin auf die A23187-induzierte Histaminfreisetzung an humanen Bronchien wurde schon mehrfach beschrieben (Reinheimer et al., 1997; Möhlig, 2000; Zimmermann, 2000). Reinheimer und Mitarbeiter sprachen erstmals von einem inhibitorischen Zusammenhang zwischen muskarinergen Rezeptoren und der Histaminfreisetzung aus humanen Bronchien. Sie verzeichneten Hemmeffekte von 89% durch Acetylcholin in der Konzentration von 10 nM und sogar 100%ige Hemmung durch Oxotremorin in der Konzentration von 1 nM. Regulatorische Mechanismen zwischen dem cholinergen System und der Histaminfreisetzung wurden bereits an gastrointestinalen und glandulären Mastzellen erforscht (Blandina et al., 1980), allerdings kam es hier zu einer vermehrten Histaminausschüttung durch Acetylcholin. Dieser entgegengesetzte Befund wurde von Reinheimer und Mitarbeitern durch die morphologische und biochemische Heterogenität der Mastzellpopulationen begründet. Desweiteren verwendeten Blandina und Mitarbeiter isolierte Zelllinien, bei denen, im Gegensatz zu den von Reinheimer verwendeten intakten Gewebstücken, mögliche Regulationsmechanismen des umliegenden Gewebes fehlten (Reinheimer et al., 2000).

In einer späteren Arbeit gelang es, eine Subtypencharakterisierung des inhibitorischen Rezeptors humaner Bronchien durch Zugabe spezifischer Muskarinrezeptor-Antagonisten durchzuführen (Möhlig, 2000). Es wurde versucht, den Hemmungseffekt von Acetylcholin auf die Histaminfreisetzung mit den subtypspezifischen Rezeptorantagonisten Pirnzepin, AFDX 116, para-Fluorohexahydrosiladifendiol (pFHHSiD) und Clozapin zu antagonisieren. Das Ergebnis deutete auf einen muskarinergen Rezeptor vom Subtyp M1 hin. Weiterhin wurden Speziesunterschiede in der Kontrolle der Mastzellfunktionen an Tracheen von Ratten aufgezeigt, da hier eine inhibitorische Beziehung scheinbar nicht existierte (Reinheimer, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Präparate humaner Bronchien, anlehnend an die Arbeit von Möhlig, mit A23187 in der Konzentration von 10 μ M stimuliert und zusätzlich wurde versucht, diesen Effekt mit Acetylcholin in den Konzentrationen von 10 nM und 100 nM sowie Oxotremorin in den Konzentrationen von 1 nM und 10 nM zu hemmen. Die Ergebnisse entsprachen prinzipiell den Erkenntnissen von Reinheimer (1997) und Möhlig (2000). Sowohl Acetylcholin, ein muskarinerges und nikotinerger Rezeptoragonist als auch Oxotremorin, ein synthetischer, muskarinerges Agonist hemmten die evozierte Histaminfreisetzung mukosaler Mastzellen, wobei der Hemmungseffekt bei Oxotremorin sogar höher lag. Der stärkere Effekt

durch Oxotremorin kann damit erklärt werden, dass es, im Gegensatz zu Acetylcholin, nicht durch körpereigene Esterasen abgebaut wird. Die beiden Testsubstanzen hatten dabei keinerlei Effekt auf die basale Histaminfreisetzung, ihre Wirkung beeinflusste lediglich die Höhe des Stimulationseffektes von A23187.

Die entscheidende Frage dieser Arbeit, die auch Möhlig schon in seiner Diskussion aufgriff, lautete jedoch, ob die muskarinerge Inhibition der Mastzellfunktion bei Patienten mit chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) gestört war. In den Versuchen konnte festgestellt werden, dass sich die Effluxkurven der einzelnen Bronchialgewebe bezüglich der Histaminfreisetzung und des Hemmeffektes durch die Testsubstanzen teilweise erheblich unterschieden. Die in den Kontrollexperimenten gemessene Stimulation durch A23187 lag bei durchschnittlich $261 \pm 29\%$ der basalen Histaminfreisetzung. Oxotremorin in der Konzentration von 1 nM verminderte bei der Patientengruppe ohne COPD die Freisetzung auf durchschnittlich $130 \pm 9\%$, in der Gruppe der Patienten mit schwerer COPD hingegen zeigte sich keine signifikante Verminderung der Stimulation. Oxotremorin in der Konzentration von 10 nM verringerte die Histaminfreisetzung in Gruppe 1 auf $157 \pm 21\%$ und in der Gruppe 2 auf $303 \pm 53\%$. Acetylcholin in der Konzentration von 10 nM zeigte eine mittlere Verringerung der Histaminfreisetzung auf $147 \pm 8\%$ in Gruppe 1 und $257 \pm 86\%$ in Gruppe 2. Die höhere Konzentration von Acetylcholin (100 nM) verursachte eine mittlere Verringerung der stimulierten Histaminfreisetzung auf $142 \pm 11\%$ auf die stimulierte Freisetzung in der Patientengruppe ohne COPD, hingegen auf $212 \pm 47\%$ in der Patientengruppe mit COPD.

Wie bereits beschrieben, wurden die Versuche blind, das heißt ohne vorheriges Wissen über die Patientendaten, durchgeführt. Später wurden dann, anlehnend an die klinischen Daten der Patienten, zwei Gruppen gebildet, die sich nach der gemessenen Stärke des Hemmungseffektes der von A23187 verursachten Histaminfreisetzung richteten. Die eine Gruppe wies einen nur geringen oder sogar keinen Effekt auf, die andere zeigte eine deutliche, teilweise 100%ige Hemmung. Anhand weiterfolgender Vergleiche mit den Patientendaten mit besonderem Bezug zu Diagnosen, vorherige Erkrankungen und Medikationen sowie Nikotinabusus und Lungenfunktion, bestätigte sich der Verdacht, dass sich die vorher eingeteilten Gruppen anhand ihrer Krankengeschichte unterschieden. Die Zuordnung ergab, dass die Patienten der Gruppe mit der deutlichen Hemmung der provozierten Histaminfreisetzung keine oder nur leichte vorherige Erkrankungen der

Atemwegsorgane besaßen. Zwei Patienten litten an einer Belastungsdyspnoe, ein anderer hatte leichte Bronchiektasien mit Hämoptysen. Zwei weitere Patienten litten an einer geringgradigen COPD. Der durchschnittliche Zigarettenkonsum dieser Gruppe lag bei 22 Packyears, wobei 20% der Patienten Nichtraucher waren. Bei Betrachtung der Lungenfunktionswerte stellte sich ein Durchschnittswert heraus, der deutlich über 60% Tiffeneau (siehe unten) lag (im Mittel 68%). Der mittlere FEV1-Wert (Forciertes Expiratorisches Volumen) lag bei 81%. Die Hälfte der Patienten besaß eine gering- bis mittelgradige Obstruktion der Atemwege.

Die Lungenerkrankungen der Personen der zweiten Gruppe, bei der es zu einer weitaus geringeren Hemmung der evozierten Histaminfreisetzung kam, waren deutlich stärker. Alle Patienten litten an einer mittel- bis hochgradigen COPD, drei davon einhergehend mit einem Lungenemphysem. Der Zigarettenkonsum war ebenfalls deutlich höher in dieser Gruppe und lag durchschnittlich bei 50 Packyears. Die Lungenfunktionsprüfung ergab bei diesen Personen einen mittleren Messwert von 56% Tiffeneau sowie 57% FEV1 und war somit signifikant schlechter, verglichen mit der anderen Gruppe.

Der FEV1-Wert ist das nach maximaler Inspiration, innerhalb der ersten Sekunde, ausgeatmete Volumen (Forciertes Expiratorisches Volumen). Es werden nach den Fachgesellschaften (American Thoracic Society, European Respiratory Society und British Thoracic Society) drei verschiedene Schweregradeinteilungen von COPD eingeteilt (siehe Tabelle 5a). Der FEV1-Wert war geeignet, um die untersuchten Patienten in Gruppen einzuteilen.

Tabelle 5a:

Schweregradeinteilung der COPD nach Fachgesellschaften [FEV1 % des Sollwertes]			
	<u>leicht</u>	<u>mittel</u>	<u>schwer</u>
American Thoracic Society:	>50	35-49	<35
European Respiratory Society:	>70	50-69	<50
British Thoracic Society:	60-79	40-59	<40

Der Tiffeneau-Test wurde gewählt, um eine zusätzliche Aussage über den Grad der COPD der untersuchten Patienten machen zu können und um diese anschließend in Gruppen einteilen zu können. Er gibt Aufschluss über die bei maximaler Atemanstrengung erzielbare Atemstromstärke (Ferlinz, 1986). Ausgehend von maximaler Inspirationslage wird so schnell und tief wie möglich ausgeatmet. Das dabei in der ersten Sekunde ausgeatmete Volumen

(FEV1) wird in Prozent der Vitalkapazität berechnet. Dieser Test erlaubt daher eine gute Diagnose über das Vorliegen von restriktiven und / oder obstruktiven Ventilationsstörungen (Matthys und Nolte, 1981). Ursachen für Restriktionen sind Erkrankungen der Brustwand (Muskulatur oder Knochenapparat), der Pleura, Pneumonien, Atelektasen oder Fibrosen. Obstruktive Ventilationsstörungen werden vor allem von Glottisödemen, Stimmbandpareesen, Stimmband- oder Trachealtumoren, Tracheomalazie, chronischer Bronchitis, Asthma bronchiale, Mukoviszidose oder Emphysemen verursacht (Classen, 1991). Teilweise treten Obstruktionen und Restriktionen kombiniert auf, zum Beispiel bei Silikose oder Tuberkulose (Gross, 1987).

Die morphologischen Veränderungen bei chronischer Bronchitis sind besonders Hypertrophie und Hyperplasie des Bronchialepithels, Infiltration der Bronchialwände mit Entzündungszellen, Vermehrung der Becherzellen der Bronchialschleimhaut und Verlust der mukoziliären Clearance. Dies führt letztendlich, zusammen mit entzündlichem Exsudat und dem produzierten Schleim, zur Obstruktion der Atemwege (Riede, 1993).

Ursächlich am Entstehen einer COPD können verschiedenste exogene und endogene Faktoren sein. Inhalatives Rauchen, allgemeine Umweltverschmutzung sowie die berufliche Exposition mit Schadgasen, Staub und Dämpfen sind die Hauptgründe. Laut statistischen Erhebungen leidet jeder zweite Raucher im Alter von 40 Jahren an einer chronischen Bronchitis (Thom, 1989). Bei der Einteilung der untersuchten Patienten wurde aus diesem Grund auch besonders auf den jährlichen Nikotinkonsum geachtet. Das durchschnittliche Alter der Personen lag bei 64.9 Jahren und das Verhältnis von Männern zu Frauen war 1 : 4.8. Dies entspricht ungefähr den epidemiologischen Untersuchungen für das Entstehen einer COPD in Deutschland (Stang, 2000) und kann damit als Einflussfaktor auf die gestörte Inhibition des muskarinergen Rezeptors vernachlässigt werden.

Die verordnete Medikation der Patienten vor der Tumoroperation ergab, dass in den beiden eingeteilten Gruppen sowohl mit oralen und inhalativen Kortikoiden, Theophyllin und β 2-Agonisten therapiert wurde. In der Patientengruppe ohne COPD (14 Patienten) wurden 3 Personen mit Kortikoiden, 3 andere mit β 2-Agonisten und 1 Patient mit Theophyllin behandelt. 5 Personen dieser Gruppe erhielten keine antiobstruktive oder antiinflammatorische Therapie. In der Gruppe der Patienten mit schwerer COPD (12 Patienten) wurden bei 5 Personen Kortikoide verabreicht. Theophyllin wurde bei 2 Patienten und β 2-Agonisten bei weiteren 5 Patienten eingesetzt. Patienten mit schwerer COPD wurden selbstverständlich öfter und in höheren Dosierungen medikamentös behandelt, was als

Ursache für eine Beeinflussung der Funktion der inhibitorischen M1 Rezeptors diskutiert werden muss. Die Therapie mit Muskarin-Rezeptor-Antagonisten wurde hauptsächlich in der Gruppe mit schweren Lungenerkrankungen (bei 6 Patienten) durchgeführt, wobei 3 dieser Patienten das Kombipräparat mit einem β 2-Agonisten erhielten. Es wurden ebenfalls drei Patienten der Gruppe mit geringgradiger COPD mit dem Anticholinergikum Tiotropium behandelt. Der Vergleich der Histaminfreisetzung dieser Personen mit denen, die keine antimuskarine Lungenmedikation erhielten, zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied. Eine Beeinflussung der inhibitorischen M1 Rezeptoren durch die Muskarin-Rezeptor-Antagonisten Tiotropium beziehungsweise Ipratropium in der Gruppe ohne COPD scheint daher nicht gegeben zu sein. Die Histaminfreisetzung der Patienten der Gruppe mit schweren Lungenerkrankungen, die nicht mit Muskarin-Rezeptor-Antagonisten therapiert wurden, verglichen mit den Patienten dieser Gruppe, die Anticholinergika erhielten, zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Aufgrund dieser Tatsache kann die Verwendung der Rezeptorantagonisten nicht als Ursache für die Rezeptorfehlfunktion angesehen werden. Dennoch kommt es durch die Blockade der inhibitorischen M1 muskarinergen Rezeptoren zu einer erhöhten exocytotischen Aktivität der mukosalen Mastzellen und damit zu einer Steigerung der Histaminfreisetzung.

Anhand der beschriebenen Erkenntnisse kann letztendlich bestätigt werden, dass die muskarinerge Inhibition der Mastzellfunktion humaner Bronchien bei Patienten mit fortgeschrittener COPD gestört ist. Die genauen Mechanismen der Inhibition sind bisher nicht geklärt. Eine Interaktion der muskarinergen Rezeptoren mit membranständigen GTP-bindenden Proteinen, die an der Vesikelfusion beteiligt sind, könnte vermutet werden. Bei Patienten mit einer ausgeprägten COPD wäre dieser Mechanismus gegebenenfalls durch die verstärkte Infiltration des Lungengewebes mit Entzündungszellen gestört. Dafür würde ebenfalls die vergleichsweise insgesamt höhere Histaminfreisetzung bei den Patienten mit schwerer COPD sprechen. Reinheimer und Mitarbeiter vermuteten eine Interaktion zwischen den Epithelzellen der Atemwege und den mukosalen Mastzellen, die durch endogenes Acetylcholin vermittelt wird. Dieser Mechanismus würde eine entscheidende Aufgabe in der Funktion der Mastzellhomöostase bedeuten (Reinheimer, 2000). Die Zellhyperplasie, die bei COPD-Erkrankung auftritt, könnte die Interaktionen zwischen den Epithelzellen und den Mastzellen durch eine Beeinflussung der muskarinergen Inhibition vermindern.

Minette und Mitarbeiter untersuchten bereits 1989 einen muskarinergen Autorezeptor des M2 Subtyps, der die Freisetzung von Acetylcholin aus cholinergen Nerven inhibierte. Sie vermuteten schon damals, dass eine Fehlfunktion dieses Rezeptors bei Asthmatikern vorlag und daraus die verstärkte Bronchokonstriktion resultierte (Minette et al., 1989).

Coulson und Freyr beschrieben eine Fehlfunktion des inhibitorischen muskarinergen M2-Rezeptors an parasympathischen Nerven bei Asthma und chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (Coulson und Fryer, 2003). Parasympathische cholinerge Innervation bestimmt die autonome Kontrolle der Kontraktion von Bronchialmuskulatur, der Sekretion submukosaler Drüsen und der Gefäßerweiterung. Bei Asthma und COPD ist erwiesenermaßen die Aktivität dieser parasympathischen Nerven erhöht, was zu Bronchokonstriktion, vermehrter Schleimproduktion und Vasodilatation führt (Minette et al., 1989). Ursache dieser erhöhten parasympathischen Aktivität ist die fehlende Inhibition der neuronalen muskarinergen M2-Rezeptoren.

Die M2 Rezeptoren wurden mit Hilfe von Autoradiographie (Mak und Barnes, 1990) und *Northern Blot Analysis* (Mak et al., 1992) im humanen Lungengewebe lokalisiert. Pharmakologische Studien erwiesen, dass M2 Rezeptoren mit inhibitorischer Funktion der Acetylcholinfreisetzung präsynaptisch an postganglionären, cholinergen Nerven vorkommen (Ten Berge et al., 1996).

Die von Coulson und Fryer genannten Ursachen für die Rezeptorfehlfunktion sind antigen- oder ozon-aktivierte Eosinophile, die sich um Ganglien und Nervenfasern der Lunge lagern und die inhibitorische Funktion durch ein major basic protein (MBP) beeinflussen oder virale Infektionen, die über virale Neuramidasen die Rezeptorempfindlichkeit deutlich herabsetzen und aufgrund immunologischer, zellabhängiger Mechanismen (zum Beispiel durch Makrophagen) die Rezeptoren schädigen (Coulson und Fryer, 2003). Desweiteren wird Vitamin A Mangel als mögliche Ursache einer Rezeptorfehlfunktion diskutiert. Der Mechanismus bei Asthmaerkrankung ist bisher nicht geklärt, es werden aber ähnliche Abläufe vermutet.

Diese Faktoren könnten ebenfalls als mögliche Ursache für die Fehlfunktion des inhibitorischen M1 muskarinergen Rezeptors der Mastzellen in Frage kommen.

Die Funktion von postsynaptischen M1 und M3 muskarinischen Rezeptoren der Bronchialmuskulatur, submukosaler Drüsen und Blutgefäßen ist bei Asthma und COPD hingegen nicht gestört (Coulson und Fryer, 2003).

Die Erforschung der regulatorischen Mechanismen und deren Fehlfunktionen bei Erkrankungen wie Asthma bronchiale und chronischer Bronchitis sind von besonders großem

wissenschaftlichen und therapeutischen Interesse. Die chronische Bronchitis gehört zu den häufigsten Erkrankungen überhaupt. Sie ist eine der führenden Ursachen von Morbidität und Mortalität in den Industrieländern. Neben kardiovaskulären Erkrankungen, Tumoren und cerebrovaskulären Krankheiten steht COPD in den USA an vierter Stelle der Todesrate. Im Zeitraum zwischen 1966 und 1995 stieg die Sterblichkeitsrate bei COPD-Erkrankung um 71% (Hurd, 2000). In England sterben jährlich etwa 30.000 Menschen an den Folgen einer chronisch obstruktiven Bronchitis (Lee, 1990). Das Verhältnis von Männern zu Frauen betrug 1972 noch 3:1, während 1998 das Verhältnis bereits bei 1:1 lag. Der Grund dafür könnte die steigende Zahl berufstätiger Frauen sein.

Es existieren verschiedene Definitionen für COPD. Die "European Respiratory Society" bezeichnet COPD als "verringertes maximales Expirationsvolumen mit einer erzwungenen Entleerung der Lungen, die langsam fortschreitet und meistens irreversibel ist" (Siafakas, 1995).

Die Risikofaktoren für eine COPD sind bekannt. Wie schon anfangs erwähnt sind Rauchen, berufliche Exposition mit Schadstoffen, allgemeine Luftverschmutzung, Hyperreagibilität der Luftwege und Asthma die Hauptfaktoren (Classen, 1991). Genetische Disposition wird ebenfalls diskutiert. Dennoch bleiben viele Fragen offen, wie zum Beispiel der Grund, warum bei ca. 80% der Raucher keine schwereren Lungenobstruktionen auftreten (Mannino, 2002).

Die enorm hohe, ökonomische Belastung für den einzelnen ebenso wie für die Gesellschaft darf ebenfalls nicht unberücksichtigt bleiben. Eine Studie besagt, dass >70% aller jährlich anfallenden Behandlungskosten für die Therapie von COPD-Erkrankungen veranschlagt werden. Die Gesamtkosten der Behandlung allein für COPD betragen beispielsweise 1993 in den USA 14.7 Billionen Dollar. Geschätzt werden weitere Geldeinbußen in Höhe von 9.2 Billionen Dollar als Folge des Verlustes von Arbeitsplatz und Produktivität (Druss, 2002). Die Höhe der Gesamtkosten wird, bezogen auf den derzeitigen Trend, wahrscheinlich bis 2010 noch einmal um 60% steigen (Sullivan, 2000).

Die derzeitige Therapie der COPD besteht aus Nikotinkarenz, beziehungsweise weitmöglichster Meidung von schädlichen Noxen (zum Beispiel am Arbeitsplatz). Zusätzlich werden inhalative und / oder orale Glukokortikoiden, β 2-Sympathomimetika oder Anticholinergika verabreicht. Anhand der Erkenntnisse, dass endogenes Acetylcholin eine bedeutende Rolle in der Kontrolle der Mastzellfunktion darstellt, sollte eine Therapie mit Muskarinrezeptorantagonisten zur Verringerung der Bronchialmuskelkontraktion bei chronischer Bronchitis und Asthma jedoch überdacht werden, da es zu einer gleichzeitigen Blockade der inhibitorischen Funktionen führt. Vermehrte Aufmerksamkeit sollte daher der

Entwicklung neuer spezifischer M3 muskarinerner Rezeptorantagonisten zukommen, die selektiver die Bronchialmuskelkontraktion zu hemmen vermögen. Eine Sauerstofftherapie kann vor allem die Entwicklung eines Cor pulmonale bei bereits bestehender pulmonaler Hypertonie verhindern. Dennoch ist derzeit die einzige kosteneffektive Therapie der Krankheit das Einstellen des Rauchens.

Die eingehende Aufklärung der Bevölkerung über COPD, eine frühzeitige Diagnose und eine bessere Therapie sind wohl die wichtigsten Ziele für die Zukunft.

6. Zusammenfassung

1. Aus den Mastzellen isolierter Haut von Mastschweinen lässt sich eine über 60 Minuten konstante Histaminfreisetzung von durchschnittlich 175 ± 11 pmol/g pro 5 Minuten messen. Diese Freisetzung ist in der verwendeten Versuchsanordnung weder durch Compound 48/80 in den Konzentrationen 0.055, 0.164 sowie 0.3 mM oder A23187 in der Konzentration 10 μ M noch durch FE 200440 in den Konzentrationen 0.03, 0.3 sowie 3 mM beeinflussbar.
2. Humane Mastzellen vom Bindegewebstyp können durch FE 200440 konzentrationsabhängig stimuliert werden. 0.03 mM FE 200440 hat keinen Effekt auf die Histaminfreisetzung. Die Konzentration von 0.3 mM bewirkt einen marginalen aber nicht signifikanten Anstieg, 3 mM FE 200440 verursacht eine deutliche und anhaltende Steigerung der Histaminmenge auf 224% der basalen Freisetzung.
3. FE 200440 ist ebenfalls in der Lage, mukosale Mastzellen humaner Bronchien konzentrationsabhängig zu stimulieren. Die Konzentrationen 0.03 und 0.3 mM haben keinen Einfluss auf die Histaminfreisetzung. 3 mM FE 200440 führt zu einem unmittelbaren, aber transienten Anstieg der Histaminmenge auf 162% der basalen Freisetzung.
4. Es bestehen deutliche Unterschiede in der Histaminfreisetzung aus mukosalen Mastzellen humaner Bronchien bei Patienten mit oder ohne COPD. Oxotremorin und Acetylcholin vermögen die stimulierte Histaminfreisetzung mit A23187 der Konzentration 10 μ M aus gesunden Bronchien zu hemmen. Dieser inhibitorische Effekt ist bei Bronchien von COPD-Patienten deutlich abgeschwächt. Die hemmende Wirkung von Oxotremorin in der Konzentration von 1 nM ist bei Patienten mit schwerer COPD, verglichen mit gesunden Patienten, um den 5-fachen Wert erniedrigt. Die muskarinerge Inhibition der Mastzellfunktion ist bei COPD-Erkrankung gestört.
5. Mastzellen humaner Bronchien von Patienten mit schwerer COPD setzen, verglichen mit gesunden Patienten, eine erhöhte Menge an Histamin bei Stimulation mit A23187 in der Konzentration von 10 μ M frei.

7. Literaturverzeichnis

- Abbott NJ. 2000. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol* 20: 131-147
- Aelony Y. 1998. First-generation vs second-generation antihistamines. *Arch Intern Med.* 158: 1949-1950
- Ahmed T, Eyre P, Januszkiewicz AJ, Wanner A. 1980. Role of H1- and H2-receptors in airway reactions to histamine in conscious sheep. *J Appl Physiol.* 49:826-833
- Albegger K. 1990. [The symptomatic therapy of allergic rhinitis]. *Laryngorhinootologie* 69: 613-620
- Amon U, Dieckmann D, Nitschke M, von Stebut E, Gibbs BF, Wolff HH. 1996. Heterogeneity of human skin mast cells and human basophils. Pharmacological experiments with activators and inhibitors of protein kinase C. *Skin Pharmacol.* 9: 211-220.
- Barnes PJ. 2003. Therapy of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Ther.* 97: 87-94
- Barrett KE, Metcalfe DD. 1984. The mucosal mast cell and its role in gastrointestinal allergic diseases. *Clin Rev Allergy* 2: 39-53
- Barrett KE, Szucs EF, Metcalfe DD. 1986. Mast cell heterogeneity in higher animals: a comparison of the properties of autologous lung and intestinal mast cells from nonhuman primates. *J Immunol* 137: 2001-2008
- Baumgärtner, D. (1998). Hemmung der Histaminfreisetzung aus humanen Bronchien durch Stimulation von Muskarinrezeptoren. Inauguraldissertation. Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

- Bayly WM, Duvivier DH, Votion D, Vandenput S, Art T, Lekeux P. 2002. Effects of inhaled ipratropium bromide on breathing mechanics and gas exchange in exercising horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Equine Vet J.* 34: 36-43
- Beeh KM, Welte T, Buhl R. 2000. [Anticholinergic drugs in therapy of chronic obstructive lung disease (COPD)]. *Med Klin.* 95: 552-558
- Benyon RC, Church MK, Clegg LS, Holgate ST. 1986. Dispersion and characterisation of mast cells from human skin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 79: 332-334
- Best CH, Dale HH, Dudley HW, Thorpe WV. 1927. The nature of the vasodilator constituents of certain tissue extracts. *J Physiol.* 65: 397-417
- Beyak M, Vanner S. 1995. Histamine H1 and H3 vasodilator mechanisms in the guinea pig ileum. *Gastroenterology.* 108: 712-718
- Bielory L. 2002. Update on ocular allergy treatment. *Expert Opin Pharmacother.* 3: 541-553
- Black JW, Duncan WA, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM. 1972. Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature* 236: 385-390
- Blandina P, Fantozzi R, Mannaioni PF, Masini E. 1980. Characteristics of histamine release evoked by acetylcholine in isolated rat mast cells. *J Physiol* 301: 281-293
- Boudikova-Girard B, Scott MC, Weinshilboum R. 1993. Histamine N-methyltransferase: inhibition by monoamine oxidase inhibitors. *Agents Actions* 40: 1-10
- Broide DH. 2001. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 108: 65-71
- Brown RE, Stevens DR, Haas HL. 2001. The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol* 63: 637-672

- Brunet C, Bedard PM, Hebert J. 1988. Analysis of compound 48/80-induced skin histamine release and leukotriene production in chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol.* 82: 398-402
- Bugajski AJ, Chlap Z, Bugajski J, Borycz J. 1995. Effect of compound 48/80 on mast cells and biogenic amine levels in brain structures and on corticosterone secretion. *J Physiol Pharmacol.* 46: 513-522
- Campbell SC. 2000. Clinical aspects of inhaled anticholinergic therapy. *Respir Care.* 45: 864-867.
- Catto-Smith AG, Ripper JL. 1995. Mucosal mast cells and developmental changes in gastric absorption. *Am J Physiol.* 268: 121-127
- Church MK, Okayama Y, el-Lati S. 1991. Mediator secretion from human skin mast cells provoked by immunological and non-immunological stimulation. *Skin Pharmacol* 4: 15-24
- Church MK, el-Lati S, Okayama Y. 1991. Biological properties of human skin mast cells. *Clin Exp Allergy* 3: 1-9
- Church MK, Levi-Schaffer F. 1997. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol* 99: 155-160
- Church MK, Clough GF. 1999. Human skin mast cells: in vitro and in vivo studies. *Ann Allergy Asthma Immunol* 83: 471-475
- Classen M, Diehl V, Kochsiek K. 1991. *Innere Medizin.* München: Urban und Schwarzenberg. 1097-1112
- Clough G. 1999. Experimental models of skin inflammation. *Clin Exp Allergy.* 29: 105-108
- Coulson FR, Fryer AD. 2003. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacol Ther* 98: 59-69

- Dale HH, Laidlaw PP. 1910. The physiological action of β -imidazolylethylamine. *J Physiol London* 3: 318-344
- Darmon N, Heyman M, Candalh C, Blaton MA, Desjeux JF. 1996. Anaphylactic intestinal response to milk proteins during malnutrition in guinea pigs. *Am J Physiol* 270: G442-448
- Delire M. 1988. Immune disorders after severe injury. *Ann Biol Clin* 46: 272-275
- deShazo RD, Kemp SF. 1997. Allergic reactions to drugs and biologic agents. *JAMA*. 278: 1895-1906
- Disse B. 2001. Antimuscarinic treatment for lung diseases from research to clinical practice. *Life Sci*. 68: 2557-2564
- Druss BG, Marcus SC, Olfson M, Pincus HA. 2002. The most expensive medical conditions in America. *Health Aff*. 21: 105-111
- Duvivier DH, Bayly WM, Votion D, Vandenput S, Art T, Farnir F, Lekeux P. 1999. Effects of inhaled dry powder ipratropium bromide on recovery from exercise of horses with COPD. *Equine Vet J*. 31: 20-24
- Duvivier DH, Votion D, Vandenput S, Art T, Lekeux P. 1997. Airway response of horses with COPD to dry powder inhalation of ipratropium bromide. *Vet J*. 154: 149-53
- Dvorak AM. 1998. Histamine content and secretion in basophils and mast cells. *Prog Histochem Cytochem*. 33: 169-320
- Dvorak AM. 2002. Ultrastructure of human mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 127: 100-105
- Ennis M, Schneider C, Nehring E, Lorenz W. 1991. Histamine release induced by opioid analgesics: a comparative study using porcine mast cells. *Agents Actions* 33: 20-22

- Ferlinz R. 1986. *Diagnostik in der Pneumologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 200-263
- Forth W, Henschler D, Rummel W. 1987. *Pharmakologie und Toxikologie*. B.I. Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich: 85-86
- Fullerton DA, Agrafojo J, McIntyre RC Jr. 1996. Pulmonary vascular smooth muscle relaxation by cAMP-mediated pathways. *J Surg Res*. 61: 444-448
- Garbarg M, Barbin G, Bischoff S, Pollard H, Schwartz JC. 1976. Dual localization of histamine in an ascending neuronal pathway and in non-neuronal cells evidenced by lesions in the lateral hypothalamic area. *Brain Res*. 106: 333-348.
- Gibbs BF, Wierecky J, Welker P, Henz BM, Wolff HH, Grabbe J. 2001. Human skin mast cells rapidly release preformed and newly generated TNF- alpha and IL-8 following stimulation with anti-IgE and other secretagogues. *Exp Dermatol* 10: 312-320
- Gigl G. 1985. [Mediator liberation from mast cells]. *Pharm Unserer Zeit* 14: 97-108
- Golbert TM, Patterson R, Pruzansky JJ. 1969. Systemic allergic reactions to ingested antigens. *J Allergy* 44: 96-107
- Goth A, Johnson AR. 1975. Current concepts on the secretory function of mast cells. *Life Sci* 16: 1201-1213
- Graziano FM, Cook EB, Stahl JL. 2000. Antihistamines and epithelial cells. *Allergy Asthma Proc*. 21: 129-133
- Greaves MW, Sabroe RA. 1996. Histamine: the quintessential mediator. *J Dermatol* 23: 735-740
- Gross R, Schölmerich P, Gerok W. 1987. *Lehrbuch der Inneren Medizin*. Stuttgart-New York: Schattauer Verlagsgesellschaft. 486-527
- Gurish MF, Austen KF. 2001. The diverse roles of mast cells. *J Exp Med* 194: F1-5

- Hallgren J, Estrada S, Karlson U, Alving K, Pejler G. 2001. Heparin antagonists are potent inhibitors of mast cell tryptase. *Biochemistry* 40: 7342-7349
- Harkins JD, Robinson NE, Woods WE, Lehner AF, Smith MD, Gates RS, Fisher M, Tobin T. 2000. Intratracheal clenbuterol in the horse: its pharmacological efficacy and analytical detection. *J Vet Pharmacol Ther.* 23: 251-260
- Hartmann H, Meyer H. 1993. Klinische Pathologie der Haustiere. *Gustav Fischer Verlag*, Jena-Stuttgart.
- Hasskarl H, Kleinsorge H. 1974. *Arzneimittelprüfung, Arzneimittelrecht*. Stuttgart: Gustav-Fischer Verlag
- Heller A, Koch T, Schmeck J, van Ackern K. 1998. Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs*. 55: 487-496
- 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
- Herman LE, Bernhard JD. 1991. Antihistamine update. *Dermatol Clin.* 9: 603-610
- Holgate ST. 2000. The role of mast cells and basophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 30 Suppl 1: 28-32
- Holmdahl L, Ivarsson ML. 1999. The role of cytokines, coagulation, and fibrinolysis in peritoneal tissue repair. *Eur J Surg.* 165: 1012-1019
- Hultner L, Kolsch S, Stassen M, Kaspers U, Kremer JP, et al. 2000. In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. *J Immunol* 164: 5556-5563
- Huntley JF. 1992. Mast cells and basophils: a review of their heterogeneity and function. *J Comp Pathol.* 107: 349-372

- Hurd S. 2000. The impact of COPD on lung health worldwide: epidemiology and incidence. *Chest* 117: 1S-4S
- Igarashi Y, Kurosawa M, Ishikawa O, Miyachi Y, Saito H, et al. 1996. Characteristics of histamine release from cultured human mast cells. *Clin Exp Allergy* 26: 597-602
- Irani AM, Bradford TR, Kepley CL, Schechter NM, Schwartz LB. 1989. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem* 37: 1509-1515
- Irani AM, Schwartz LB. 1989. Mast cell heterogeneity. *Clin Exp Allergy* 19: 143-155
- Irani AM, Sampson HA, Schwartz LB. 1989. Mast cells in atopic dermatitis. *Allergy* 44: 31-34
- Ishizaka T, White JR, Saito H. 1987. Activation of basophils and mast cells for mediator release. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 82: 327-332
- Ishizaka T, Furitsu T, Inagaki N. 1991. In vitro development and functions of human mast cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 94: 116-121
- Ishizaka T, Mitsui H, Yanagida M, Miura T, Dvorak AM. 1993. Development of human mast cells from their progenitors. *Curr Opin Immunol*. 5: 937-943
- Iwamura T, Shimizu K, Tanaka S. 2002. Morphological and histochemical characteristics of mast cells and the content of in-tissue histamine in various pathological parathyroids: do mast cells participate in hormone secretion in human parathyroids? *J Nippon Med Sch*. 69: 347-354
- Joad J, Casale TB. 1988. Histamine and airway caliber. *Ann Allergy*. 61: 1-7
- Karimi K, Redegeld FA, Blom R, Nijkamp FP. 2000. Stem cell factor and interleukin-4 increase responsiveness of mast cells to substance P. *Exp Hematol* 28: 626-634

- Kazimierczak W. 1974. [Mast cells. Uptake, production, storage and release of histamine]. *Postepy Hig Med Dosw* 28: 169-192
- Kilzer P, Chang K, Marvel J, Kilo C, Williamson JR. 1985. Tissue differences in vascular permeability changes induced by histamine. *Microvasc Res.* 30: 270-285
- Knight DA, Stewart GA, Thompson PJ. 1997. Histamine-induced contraction of human isolated bronchus is enhanced by endogenous prostaglandin F2 alpha and activation of TP receptors. *Eur J Pharmacol* 319: 261-267
- Knudsen T, Johansen T. 1990. [The mast cell]. *Ugeskr Laeger* 152: 3516-3520
- Kopec P, Korczynska I, Olakowska E. 2001. Role of histamine in cardiac muscle function--an attempt at demonstrating the presence of intracellular histaminergic H2-type receptors. *Med Sci Monit* 7: 357-362
- Krishnaswamy G, Kelley J, Johnson D, Youngberg G, Stone W, et al. 2001. The human mast cell: functions in physiology and disease. *Front Biosci* 6: D1109-1127
- Kumar P, Yachha SK, Misra S, Mehta S. 1992. Histamine-2 receptor antagonists. *Indian Pediatr* 29: 1019-1023
- Kutter E. 1978. *Arzneimittelentwicklung Grundlagen-Strategien-Perspektiven*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
- Lagunoff D. 1972. The mechanism of histamine release from mast cells. *Biochem Pharmacol.* 21: 1889-1896
- Lee PN, Fry JS, Forey BA. 1990. Trends in lung cancer, chronic obstructive lung disease, and emphysema death rates for England and Wales 1941-85 and their relation to trends in cigarette smoking. *Thorax* 45: 657-665
- Lee TD, Swieter M, Bienenstock J, Befus AD. 1985. Heterogeneity in mast cell populations. *Clin Immunol Rev.* 4: 143-199

- Levy JH, Roizen MF, Morris JM. 1986. Anaphylactic and anaphylactoid reactions. A review. *Spine* 11: 282-291
- Lewis T. 1927. *The blood vessels of the human skin and their response*. London: Schaw and Sons Ltd
- Lorenz W, Matejka E, Schmal A, Seidel W, Reimann HJ, et al. 1973. A phylogenetic study on the occurrence and distribution of histamine in the gastro-intestinal tract and other tissues of man and various animals. *Comp Gen Pharmacol* 4: 229-250
- Löscher W, Ungemach FR, Kroter R. 1994. *Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. Paul Parey Verlag, Berlin Hamburg. 189-193
- Mak JC, Barnes PJ. 1990. Autoradiographic visualization of muscarinic receptor subtypes in human and guinea pig lung. *Am Rev Respir Dis* 141: 1559-1568
- Mak JC, Baraniuk JN, Barnes PJ. 1992. Localization of muscarinic receptor subtype mRNAs in human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7: 344-348
- Mannino DM. 2002. COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity. *Chest* 121: 121S-126S
- Marone G, Spadaro G, De Marino V, Aliperta M, Triggiani M. 1998. Immunopharmacology of human mast cells and basophils. *Int J Clin Lab Res*. 28:12-22.
- Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, et al. 2000. Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science* 287: 2013-2017
- Matthys H, Nolte D. 1981. *Pneumologische Diagnostik*. München-Deisenhofen: Düstri
- McLeod RL, Gertner SB, Hey JA. 1994. Species differences in the cardiovascular responses to histamine H3 receptor activation. *Eur J Pharmacol*. 259: 211-214

- McQuaid KR, Isenberg JI. 1992. Medical therapy of peptic ulcer disease. *Surg Clin North Am* 72: 285-316
- Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. 1997. Mast cells. *Physiol Rev* 77: 1033-1079
- Minette PA, Lammers JW, Dixon CM, McCusker MT, Barnes PJ. 1989. A muscarinic agonist inhibits reflex bronchoconstriction in normal but not in asthmatic subjects. *J Appl Physiol* 67: 2461-2465
- Möhlig, T. 2000. Die muskarinerge Inhibition der Aktivierbarkeit von mukosalen Mastzellen in humanen Bronchien wird durch Muskarinrezeptoren vom M1-Typ vermittelt. Inauguraldissertation. Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Mokhort NA, Radchenko IV. 1989. [Histamine metabolism and its role in central nervous system function]. *Ukr Biokhim Zh* 61: 3-13
- Naukkarinen A, Harvima IT, Aalto ML, Horsmanheimo M. 1994. Mast cell tryptase and chymase are potential regulators of neurogenic inflammation in psoriatic skin. *Int J Dermatol* 33: 361-366
- Nielsen HJ, Edvardsen L, Vangsgaard K, Dybkjaer E, Skov PS. 1996. Time-dependent histamine release from stored human blood products. *Br J Surg*. 83: 259-262
- Nilsson L, Reinheimer T, Steinwall M, Akerlund M. 2003. FE 200 440: a selective oxytocin antagonist on the term-pregnant human uterus. *BJOG*. 110: 1025-1028
- Noble EP, Bommer M, Sincini E, Costa T, Herz A. 1986. H1-histaminergic activation stimulates inositol-1-phosphate accumulation in chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 135: 566-573
- Nolte D, Galgoczy G, Lode H, Mandi A, Matthys H, Stresemann E. 1977. [A multi-centre study of reproterol, a bronchodilator (author's transl)]. *Dtsch Med Wochenschr* 102: 619-623

- Parsons GH, Villablanca AC, Brock JM, Howard RS, Colbert SR, Nichol GM, Chung KF. 1992. Bronchial vasodilation by histamine in sheep: characterization of receptor subtype. *J Appl Physiol*. 72: 2090-2098
- Paterson NA, Burka JF, Craig ID. 1981. Release of slow-reacting substance of anaphylaxis from dispersed pig lung cells: effect of cyclo-oxygenase and lipoxygenase inhibitors. *J Allergy Clin Immunol* 67: 426-434
- Pearce FL, Ali H, Barrett KE, Befus AD, Bienenstock J, Brostoff J, Ennis M, Flint KC, Hudspith B, Johnson NM. 1985. Functional characteristics of mucosal and connective tissue mast cells of man, the rat and other animals. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 77: 274-276
- Pearce FL. 1989. Mast cells: function, differentiation and activation. *Curr Opin Immunol* 1: 630-636
- Pearce FL. 1989. Non-IgE-mediated mast cell stimulation. *Ciba Found Symp* 147: 74-87
- Pearlman DS. 1999. Pathophysiology of the inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol* 104: S132-137
- Pendleton RG, Cook PG, Shepherd-Rose A, Mangel AW. 1985. Effects of H₂-receptor antagonists upon physiological acid secretory states in animals. *J Pharmacol Exp Ther* 233: 64-69
- Reedy LM, Miller WH. 1989. Allergic skin diseases of dogs and cats. *W.B. Saunders Co.*, Philadelphia, London, Toronto
- Reinheimer T, Bernedo P, Klapproth H, Oelert H, Zeiske B. 1996. Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and human: species differences in role of airway mucosa. *Am J Physiol* 270: L722-728

- Reinheimer T, Baumgartner D, Hohle KD, Racke K, Wessler I. 1997. Acetylcholine via muscarinic receptors inhibits histamine release from human isolated bronchi. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 389-395
- Reinheimer T, Mohlig T, Zimmermann S, Hohle KD, Wessler I. 2000. Muscarinic control of histamine release from airways. Inhibitory M1- receptors in human bronchi but absence in rat trachea. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 534-538
- Repka-Ramirez MS. 2003. New concepts of histamine receptors and actions. *Curr Allergy Asthma Rep.* 3: 227-231
- Riede UN, Schäfer HE. 1993. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart-New York
- Riley JF, West DB. 1953. Histamine and tissue mast cells. *J Physiol* 120: 528-537
- Risdahl JM, Huether MJ, Gustafson KV, Molitor TW. 1995. Morphine alteration of histamine release in vivo. *Adv Exp Med Biol* 373: 161-168
- Rosengard BR, Mahalik C, Cochrane DE. 1986. Mast cell secretion: differences between immunologic and non-immunologic stimulation. *Agents Actions.* 19: 133-140
- Sabbah A, Sainte-Laudy J, Drouet M, Lauret MG, Loiry ML, et al. 1997. [Immuno-biological diagnosis of food allergy]. *Allerg Immunol (Paris)* 29 Spec No: 6-10
- Salvi S, Semper A, Blomberg A, Holloway J, Jaffar Z, et al. 1999. Interleukin-5 production by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 984-991
- Sander K, Deegen E, Ohnesorge B. 2002. [Influencing respiratory gas analytical lung function parameters by intravenous injection of clenbuterol in horses with chronic lung diseases] *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 109: 295-299
- Scheler W. 1980. *Grundlagen der Pharmakologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena

- Schild HO, Hawkins DF, Mongar JL, Herxheimer H. 1951. *Reactions of isolated human asthmatic lung and bronchial tissue to a specific antigen*: Lancet. 376-382
- Secrest RJ, Chapnick BM. 1988. Endothelial-dependent relaxation induced by leukotrienes C4, D4, and E4 in isolated canine arteries. *Circ Res.* 62: 983-991
- Sekizawa K, Nakazawa H, Ohnishi T, Yamauchi K, Ohkawara Y, et al. 1993. Histamine N-methyltransferase modulates histamine- and antigen-induced bronchoconstriction in guinea pigs in vivo. *Am Rev Respir Dis* 147: 92-96
- Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, et al. 1995. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force. *Eur Respir J* 8: 1398-1420
- Simons FE. 1992. The antiallergic effects of antihistamines (H1-receptor antagonists). *J Allergy Clin Immunol* 90: 705-715
- Stang P, Lydick E, Silberman C, Kempel A, Keating ET. 2000. The prevalence of COPD: using smoking rates to estimate disease frequency in the general population. *Chest* 117: 354S-359S
- Stanimirovic DB, Bertrand N, Merkel N, Bembry J, Spatz M. 1994. Interaction between histamine and adenosine in human cerebrovascular endothelial cells: modulation of second messengers. *Metab Brain Dis.* 9: 275-289
- Sugimoto Y, Ohishi H, Toyota T, Kamei C. 1998. Strain differences in histamine release from peritoneal mast cells in rats. *Gen Pharmacol.* 31: 613-616
- Sullivan SD, Ramsey SD, Lee TA. 2000. The economic burden of COPD. *Chest* 117: 5S-9S
- Ten Berge RE, Krikke M, Teisman AC, Roffel AF, Zaagsma J. 1996. Dysfunctional muscarinic M2 autoreceptors in vagally induced bronchoconstriction of conscious guinea pigs after the early allergic reaction. *Eur J Pharmacol* 318: 131-139

- Thom TJ. 1989. International comparisons in COPD mortality. *Am Rev Respir Dis* 140: S27-34
- Togias A. 2003. H1-receptors: localization and role in airway physiology and in immune functions. *J Allergy Clin Immunol.* 112: 60-68
- Uvnas B, Aborg CH, Bergendorff A. 1970. Storage of histamine in mast cells. Evidence for an ionic binding of histamine to protein carboxyls in the granule heparin-protein complex. *Acta Physiol Scand.* 336: 1-26
- Uvnas B. 1992. Recent observations on mechanisms of storage and release of mast cell histamine. Applicability to other biogenic amines. *Agents Actions* 36: 23-33
- Vugman I, Rocha e Silva M. 1966. *Biological determination of histamine in living tissue and body fluids.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer. 80-115
- Wahlgren CF. 1991. Itch and atopic dermatitis: clinical and experimental studies. *Acta Derm Venereol* 165: 1-53
- Wang Z, Walter M, Selwood T, Rubin H, Schechter NM. 1998. Recombinant expression of human mast cell proteases chymase and tryptase. *Biol Chem.* 379: 167-174
- Weltman JK. 2000. Update on histamine as a mediator of inflammation. *Allergy Asthma Proc.* 21: 125-128
- White JP, Mills J, Eiser NM. 1987. Comparison of the effects of histamine H1- and H2-receptor agonists on large and small airways in normal and asthmatic subjects. *Br J Dis Chest* 81: 155-169
- White MV, Slater JE, Kaliner MA. 1987. Histamine and asthma. *Am Rev Respir Dis* 135: 1165-1176
- Witek TJ Jr. 1999. Anticholinergic bronchodilators. *Respir Care Clin.* 5: 521-536

Wu CY, Chen CF, Chiang CF. 1993. Stimulation of inositol phosphate production and GTPase activity by compound 48/80 in rat peritoneal mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 204-213

Zingg HH, Laporte SA. 2003. The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab.* 14: 222-227

Zimmermann, S. 2000. Nikotinrezeptoren vermitteln eine Hemmung der stimulierten Histaminfreisetzung aus humaner Haut. Inauguraldissertation. Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

9. Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mir bei der Durchführung meiner Arbeit behilflich waren, insbesondere Herrn Professor Dr. Ignaz Wessler für die Bereitstellung des Themas und für die sehr gute Betreuung und Unterstützung während der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Rüdiger Gerstberger möchte ich besonders für die Unterstützung und Bereitschaft, die extern durchgeführte Arbeit vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zu vertreten, danken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Kortsik, Frau Weissleder und den OP-Teams des St. Hildegardis Krankenhauses, Mainz, Herrn Dr. B. Keller-Lux und den Mitarbeitern der Fontana Klinik, Mainz, der Klinik für Geburtshilfe und Frauenkrankheiten sowie der Pathologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz und den Mitarbeitern der Metzgerei Weil, Finten, möchte ich für die Unterstützung bei der Bereitstellung des Versuchsmaterials danken.

Für die Hilfsbereitschaft und angenehme Zusammenarbeit bedanke ich mich bei Herrn Dr. Christian Mang und Frau Erbeling.

Den Mitarbeitern der Werkstatt des Pharmakologischen Institutes danke ich für die technische Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Eva für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-443-8



9 7 8 3 8 9 6 8 7 4 4 3 6