

Klinische Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie  
GSF/TUM

ZAUM – Zentrum Allergie und Umwelt an der  
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie  
der Technischen Universität München

(Leitung: Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt)

***In vitro*-Untersuchungen zu antiinflammatorischen Effekten von Desloratadin  
und Loratadin auf humane Keratinozyten**

Isabella Münster

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. C. I. Traidl-Hoffmann  
2. Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt

Die Dissertation wurde am 20.11.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 24.01.2007 angenommen.

Meiner Großmutter und meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Einige Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden publiziert in:

Traidl-Hoffmann C, **Münster I**, Ring J, Behrendt H.

Impact of desloratadine and loratadine on the crosstalk between human keratinocytes and leukocytes: Implications for anti-inflammatory activity of antihistamines.

International Archives of Allergy and Immunology 2006, 140:315-320

und auf internationalen Kongressen wurde vorgestellt:

**Münster I**, Pleyl-Wisgickl G, Traidl-Hoffmann C, Ring J, Behrendt H.

Desloratadine regulates the expression of MHC-Class molecules and costimulatory signals in cultured human keratinocytes.

XXI. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2002

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b>	<b>11</b>
2.1	Historisches zu allergischen Erkrankungen . . . . .	11
2.2	Epidemiologische Betrachtung allergischer Erkrankungen . . . . .	12
2.3	Allergie, Atopie und ihre Ausdrucksformen . . . . .	15
2.3.1	Grundlegendes zum Begriff Allergie . . . . .	15
2.3.2	Grundlegendes zum Begriff Atopie . . . . .	18
2.3.3	Pathophysiologische Mechanismen der allergischen Reaktionen . . . . .	19
2.3.4	Klinische Manifestation der Typ I-Allergie und ihre Mechanismen auf zellulärer Ebene am Beispiel der Rhinokonjunktivitis allergica . . . . .	21
2.4	Granulozyten, T-Zellen und ihre Funktionen im Immunsystem . . . . .	24
2.4.1	Neutrophile Granulozyten (PMN) . . . . .	25
2.4.2	Eosinophile Granulozyten . . . . .	26
2.4.3	T-Zellen . . . . .	28
2.4.3.1	Th1-Zellen . . . . .	28
2.4.3.2	Th2-Zellen . . . . .	29
2.4.3.3	Regulatorische T-Zellen (T-reg) . . . . .	29

2.4.3.4	Zytotoxische T-Zellen (CTL; CD8+) . . . . .	30
2.5	Das Immunsystem der Haut und die physiologischen Interaktionen der Keratinozyten mit anderen Zellen . . . . .	31
2.6	Keratinozyten: Expression von co-stimulatorischen Molekülen, Zytokinen und Chemokinen . . . . .	34
2.6.1	Co-stimulatorische Moleküle . . . . .	34
2.6.2	Zytokine . . . . .	36
2.6.3	Chemokine . . . . .	36
2.7	Histamin . . . . .	41
2.8	Medikamentöses Behandlungskonzept von Allergien . . . . .	44
2.8.1	Glukokortikoide . . . . .	44
2.8.2	Antihistaminika . . . . .	46
2.8.2.1	Antihistaminerge Effekte von Antihistaminika . . . . .	46
2.8.2.2	Antiinflammatorische Effekte von Antihistaminika . . . . .	47
2.8.3	Loratadin, ein Antihistaminikum der 2. Generation und sein Wirkprofil	49
2.8.4	Desloratadin, Nachfolgesubstanz von Loratadin und sein Wirkprofil .	50
2.8.4.1	<i>In-vitro</i> -Forschungsansätze mit Desloratadin . . . . .	52
2.8.4.2	<i>In-vivo</i> -Forschungsansätze mit Desloratadin . . . . .	54
<b>3</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>59</b>
4.1	Probanden . . . . .	59
4.2	Material . . . . .	60
4.2.1	Antihistaminika . . . . .	60
4.2.2	Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte . . . . .	60

4.3	Methoden . . . . .	64
4.3.1	Kultivierung humaner primärer Keratinozyten (PK) . . . . .	64
4.3.2	Präinkubation von Primärkeratinozyten mit den Antihistaminika / Hydrocortison und Stimulation mit IFN- $\gamma$ . . . . .	65
4.3.3	Zytochemische Färbung der Zelladhäsionsmoleküle . . . . .	67
4.3.4	Toxizitätsmessung mittels Propidiumjodidfärbung . . . . .	68
4.3.5	Durchflusszytometrische Analyse . . . . .	69
4.3.6	RNA-Extraktion . . . . .	70
4.3.7	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (rT-PCR) . . . . .	73
4.3.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	73
4.3.9	Agarosegelelektrophorese von DNA . . . . .	75
4.3.10	Bestimmung von Chemokinen in Überständen von stimulierten Primärkeratinozyten mittels ELISA . . . . .	76
4.3.11	Migration von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten auf Primärkeratinozytenüberstände (Migrationsassay) . . . . .	78
	4.3.11.1 Isolierung der neutrophilen Granulozyten . . . . .	78
	4.3.11.2 Isolierung der eosinophilen Granulozyten . . . . .	79
	4.3.11.3 Migrationsassay . . . . .	80
4.4	Statistische Auswertung . . . . .	80
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>81</b>
5.1	Toxizität von Desloratadin und Loratadin auf humane Keratinozyten . . . . .	81
5.2	Einfluß von Desloratadin und Loratadin auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Hochregulierung von co-stimulatorischen Molekülen auf Keratinozyten . . . . .	83
5.2.1	Einfluss von Desloratadin/Loratadin und Hydrocortison auf die Oberflächenexpression von ICAM-1 auf Keratinozyten . . . . .	84

5.2.2	Regulierung des MHC-Klasse-I-Moleküls (HLA-ABC) auf Keratinozyten durch Desloratadin/Loratadin und Hydrocortison . . . . .	85
5.2.3	Regulierung des MHC-Klasse-II-Moleküls (HLA-DR) auf Keratinozyten durch Desloratadin/Loratadin und Hydrocortison . . . . .	86
5.3	Desloratadin und Loratadin reduzieren die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von Chemokinen aus primären Keratinozyten . . . . .	87
5.3.1	Einfluß von Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von CCL5 . . . . .	87
5.3.2	Einfluß von Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von CXCL8 . . . . .	88
5.3.3	Einfluß von Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von CCL17 . . . . .	90
5.3.4	Einfluß von Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von CXCL10 . . . . .	91
5.4	Nachweis intakter RNA-Banden im Agarosegel nach Extraktion . . . . .	93
5.5	Ergebnisse der PCR . . . . .	93
5.6	Mit Desloratadin oder Loratadin vorbehandelte primäre Keratinozyten zeigen eine verminderte Kapazität, Neutrophile und Eosinophile anzuziehen . . . . .	98
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>101</b>
6.1	Ausgewählte Angriffspunkte in der Bekämpfung entzündlicher Hauterkrankungen . . . . .	101
6.2	Einfluß von Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison auf entzündliche Prozesse in der Haut . . . . .	102
6.2.1	Einfluß der Antihistaminika und des Glukokortikoids auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen . . . . .	102

6.2.2	Einfluß der Antihistaminika und des Glukokortikoids auf die Freisetzung von Chemokinen . . . . .	104
6.2.3	Kongruenz der erzielten Ergebnisse auf molekularer Ebene . . . . .	106
6.2.4	Einfluss von Stimulationszeit und Dosierung der getesteten Substanzen und klinische Relevanz der erzielten Ergebnisse . . . . .	107
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>139</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>142</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>143</b>
	<b>Anhang</b>	<b>I</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

Allergische Erkrankungen haben sich im Laufe des 20. Jahrhunderts zu Volkskrankheiten entwickelt. Nahezu jeder fünfte deutsche Erwachsene leidet an einer Allergie [Ring et al 2000]. Mehr als 10% der deutschen Bevölkerung leiden an Heuschnupfen [Ring 2004].

Allergische Erkrankungen wurden schon im Altertum beschrieben [Ring 2004]. Epidemiologische Studien vieler westlicher Länder zeigen seit dem 2. Weltkrieg einen einheitlichen Anstieg der Prävalenzrate für allergische Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis, der allergischen Rhinitis oder des Asthma bronchiales [Ring 2001/3, Krämer 1999]. Der Grund dieses Anstieges ist bis heute nur in Ansätzen erklärt [Mygind 1998, Ring et al 2000, Ring 2001/3]. Deshalb kommt der Forschung nach den für die allergische Sensibilisierung ursächlichen Faktoren eine wachsende Bedeutung zu, ebenso wie der Entwicklung von Medikamenten, die in der Lage sind, Allergien adäquat zu bekämpfen.

Zur Behandlung allergischer Erkrankungen stehen heutzutage eine Vielzahl von Möglichkeiten offen. Eines der Hauptstandbeine in der antiallergischen Therapie stellen die Antihistaminika dar. Diese sogenannten H1-Antagonisten, deren Hauptwirkung sich an H1-Histaminrezeptoren auf menschlichen Zellen abspielt, wurden im Laufe der Jahre immer weiter entwickelt und existieren heute bis in die 3. Generation.

Eines dieser Antihistaminika der 3. Generation, Desloratadin, ist Grundlage des vorliegenden Forschungsprojektes. Es ist ein hochpotentes, schon aus zahlreichen Blickwinkeln erforschtes

Arzneimittel, welches neben den antihistaminergen Hauptwirkungen auch antiinflammatorische Wirkungen auf zellulärer Ebene aufweist. Zahlreiche Forschungsergebnisse belegen dies und sollen im weiteren Verlauf noch näher dargestellt werden [Simons 1992, Lippert 1995, Vignola 1995, Molet 1997, Walsh 2000, Papi 2001, Schroeder 2001].

Die antiinflammatorischen Wirkungen von Antihistaminika stellen ein immunologisch höchst interessantes Forschungsgebiet dar. Viele der neueren Antihistaminika wurden in dieser Richtung schon untersucht. Mögliche antiinflammatorische Wirkungen des Antihistaminikums Desloratadin auf menschliche Keratinozyten sind jedoch bisher noch nicht näher beleuchtet worden. In der vorliegenden Arbeit soll aus diesem Grunde eine potentielle antiinflammatorische Wirkung von Desloratadin auf Keratinozyten ergründet werden.

Als Vergleichsubstanzen für Desloratadin werden die Vorgängersubstanz Loratadin, sowie das antientzündlich wirkende Glukokortikosteroid Hydrocortison herangezogen.

Sollte sich in den Versuchsreihen ein antientzündlicher Effekt auf zellulärer Ebene darstellen lassen, würde dies den Einsatz von Antihistaminika aus einem weiteren Blickwinkel rechtfertigen, nämlich möglicherweise auch für allergische Hautkrankheiten. Gegebenenfalls könnte in Zukunft an eine mögliche topische Anwendung der Antihistaminika auf der Haut gedacht werden. Interessant ist unter diesem Gesichtspunkt die Konzentration des Antihistaminikums, die in den Experimenten eingesetzt werden muss, um eine suffiziente antiinflammatorische Wirkung auf die stimulierten Keratinozyten auszuüben.

# Kapitel 2

## Theoretische Grundlagen

### 2.1 Historisches zu allergischen Erkrankungen

Allergische bzw. atopische Erkrankungen sind bis ins Altertum zurückzuverfolgen [Simons 1994]. Eine der ältesten dokumentierten „atopischen“ Familienanamnesen führt fast 2000 Jahre zurück in das julisch-claudische Kaiserhaus [Ring 1985]. Hier waren mindestens drei miteinander verwandte Familienmitglieder Atopiker - einer davon war Kaiser Augustus. Wie man den Aufzeichnungen des Suetonius über Kaiser Augustus entnehmen kann, verkörpert er den klassischen Typ eines Atopikers, da er gleichzeitig an allergischer Rhinokonjunktivitis, allergischem Asthma bronchiale und einem atopischen Ekzem, also dem Vollbild der so genannten atopischen Diathese litt. Im Jahr 1819 beschrieb John Bostock in einer Rede vor der Royal Medical Society of London seine eigene „periodisch auftretende Affektion der Augen und der Brust“, die er *Catarrhus aestivus* nannte, bzw. später auch *Hay fever*. Ein halbes Jahrhundert später erbrachte Charles Blackley durch einen Selbstversuch den Beweis, dass Pollen den Heuschnupfen verursachen [Blackley 1959]. Der Neologismus „Allergie“ wurde erst 1906 von dem Wiener Pädiater Clemens von Pirquet aus den griechischen Worten „allos“ (anders) und „ergon“ (Arbeit) gebildet [Pirquet 1906]. Die amerikanischen Forscher Coca und Cooke schlugen 17 Jahre später das Wort „Atopie“ für die familiär auftretende, mit Heuschnupfen und Asthma einhergehende Form der Allergie vor. Dieses Wort wurde von dem griechischen „Atopos“ abgeleitet, was so viel bedeutet wie „am falschen Ort“

oder „außergewöhnlich“ [Coca 1923]. Heute wird Atopie verstanden als eine familiär gehäufte Bereitschaft zur Überempfindlichkeit der Haut und der Schleimhäute mit Neigung zur IgE-Bildung. Dass Allergien durch Serumfaktoren übertragen werden können, wurde 1921 von Prausnitz und Küstner gezeigt. Die Identifizierung des Serumfaktors IgE folgte 1967 zeitgleich durch das Ehepaar Ishizaka in den USA und die schwedischen Forscher Johansson und Bennich [Ishizaka 1966, Ishizaka 1967/1, Ishizaka 1967/2]. In den gleichen Zeitraum fallen die Beobachtungen, die die Langerhans-Zelle als dendritische Antigen-präsentierende Zelle erkannten [Hashimoto 1968].

## **2.2 Epidemiologische Betrachtung allergischer Erkrankungen**

Mittlerweile leidet in Deutschland jeder zehnte Erwachsene [Ring et al 2000] an einer allergischen Erkrankung. Dies ist eine Tatsache, die die Allergiebekämpfung zur Herausforderung mit volkswirtschaftlicher Bedeutung macht. Für Familienangehörige von Atopikern besteht ein erhöhtes Risiko eine Allergie zu entwickeln, wobei die Atopieneigung wahrscheinlich polygen vererbt wird [Ring 2004, Postma 2000]. Ist ein Elternteil oder Geschwisterkind Atopiker, liegt das Risiko für ein Kind, ebenfalls Atopiker zu sein, bei 25%. Sind beide Eltern Atopiker, besteht ein 50%iges Risiko für ihr Kind [Postma 2000]. Leiden beide Eltern darüber hinaus an der gleichen atopischen Manifestation, so ist das Atopierisiko für ihre Kinder am höchsten, nämlich zwischen 60 und 80% im 12. Lebensjahr [Ring 2004].

Die Anzahl atopierelevanter Gene wird auf rund 150 geschätzt. Es existieren mehrere sog. Kandidatengene für die Atopie. Bei der Kandidatengenanalyse werden genetische Marker in der Nähe von Genen untersucht, die allergierelevante Proteine produzieren [Ring 2004]. Beispiele für solche Kandidatengene sind die  $\beta$ -Kette des IgE-Rezeptors auf Chromosom 11, der T-Zell-Rezeptor auf Chromosom 14, zahlreiche Zytokine wie IL-4 oder IL-5 auf Chromosom 5q, oder das IL-4-Rezeptor-Gen auf Chromosom 16 [Postma 2000]. Versuchspersonen, die Variationen auf diesen Chromosomen aufwiesen, zeigten eine erhöhte Atopieneigung.

Gegenstand aktueller Forschung ist das Kandidatengen STAT6 auf Chromosom 12q. Mäuse, die dieses Gen nicht besitzen, können den Immunglobulin-Klassen-*Switch* zum IgE-Molekül nicht vollziehen, zeigen nur eingeschränkte proliferative Fähigkeiten auf die Stimulierung durch IL-4 und können naive T-Zellen nicht in Th2-Zellen umwandeln [Shimoda 1996]. Ergebnisse einer Studie von Weidinger et al deuten an, dass genetische Varianten innerhalb des Kandidatengens STAT6 eine signifikante Rolle bei der Regulierung der IgE-Synthese und der Manifestation atopischer Erkrankungen, wie zum Beispiel dem Asthma, spielen [Weidinger 2004].

Genetische Varianten des auf Chromosom 7p lokalisierten NOD1, einem zytosolischen Rezeptor, welcher mit Bestandteilen gram-negativer Bakterien interagiert, zeigten in einer erst kürzlich durchgeführten Studie wichtige Übereinstimmungen mit der erhöhten Bereitschaft, atopische Erkrankungen, wie die atopische Dermatitis, zu entwickeln [Weidinger 2005].

Das Protein Filaggrin ist ein essentieller Bestandteil der Epidermis und entscheidend für deren Barrierefunktion [Fritsch 2004, Candi 2005]. Eine neuere Studie stellt den Zusammenhang zwischen zwei Mutationen im Filaggrin und der atopischen Dermatitis heraus. Diese beiden Mutationen, die einen Funktionsverlust innerhalb des Filaggringens bedeuten, zeigen insbesondere eine starke Verbindung zum extrinsischen Subtyp der atopischen Dermatitis, welcher durch hohe totale Serumlevels von IgE und begleitende allergische Sensibilisierungen gekennzeichnet ist. Darüber hinaus sind die Mutationen mit der palmaren Hyperlinearität bei Patienten mit atopischer Dermatitis assoziiert. Durch diese neuen Beobachtungen wird einmal mehr die überaus wichtige Rolle, die eine intakte Hautbarriere bei der Vermeidung von allergischen Sensibilisierungen spielt, hervorgehoben [Weidinger 2006].

Es existieren bereits zahlreiche Studien, die die Entwicklung von allergischen Erkrankungen während der vergangenen Jahrzehnte beobachten. So wird gezeigt, daß es starke regionale Unterschiede hinsichtlich der Entwicklung von Allergien gibt. Länder wie Großbritannien, Neuseeland oder Australien liegen an der Spitze der Länder mit den höchsten Allergieraten. Während Deutschland sich ungefähr in der Mitte wiederfindet, zeigen sich die niedrigsten Raten in Albanien oder Indonesien [ISAAC 1998].

Die in Deutschland durchgeführten Studien offenbaren ebenfalls interessante Ergebnisse [Mutius 1999, Ring 2001/3, Ring et al 2000, Schroeder 2001, Wahn 2000]: Bei Kindern im

Alter von 6 Jahren beträgt die Häufigkeit, an Heuschnupfen zu erkranken 1-7 % (bei 9-10-jährigen etwa 10 %). Die Häufigkeit von Asthma bronchiale liegt bei 2-5 % und die des atopischen Ekzems bei 6-9 %. Auch hier steigt die Prävalenz mit zunehmendem Alter der Kinder an [Ring et al 2000].

Es wurde nachgewiesen, daß westdeutsche Kinder unmittelbar nach der Wiedervereinigung stärker von Allergien betroffen waren, als Ostdeutsche. Heuschnupfen und Asthma traten im Osten signifikant seltener auf, als im Westen. Nach der Wiedervereinigung stieg die Prävalenz von Heuschnupfen bei ostdeutschen Kindern jedoch an [Ring et al 2000, Krämer 2002]. Ostdeutsche Erwachsene sind weniger von Allergien betroffen, als Westdeutsche [Ring et al 2000]. Bei Gräserpollen lässt sich ein Süd-Nord-Gefälle belegen, in Bayern gibt es Sensibilisierungsraten von bis zu 40 % [Ring et al 2000].

Interessant ist auch, daß Kinder aus ländlicher Umgebung weniger an Allergien zu leiden haben, als Stadtkinder [Gassner-Bachmann 2000], und Kinder von Eltern höheren Bildungsgrades ein höheres Allergierisiko besitzen [Ring et al 2000].

Obwohl die eigentlichen Ursachen für die Zunahme von Allergien noch nicht vollständig erforscht sind, gibt es bereits zahlreiche Erklärungshypothesen [Ring et al 2000, Ring 2001/3]. Hierzu gehören die Annahme einer genetischen Disposition, das vermehrte Auftreten von neuen Allergenen, sowie veränderter Allergene, ein höheres Alter der Erstgebärenden, eine geringere Kinderzahl in den Familien und die größere soziale Mobilität der heutigen Zeit. Eine wichtige Rolle wird auch der übermäßigen Hygiene unserer Tage zugeschrieben, die das Immunsystem davon abhält, sich ausreichend mit Fremdstoffen auseinander zu setzen (sogenannte Hygienehypothese) [Ring 2004, Diaz-Sanchez 2000]. Die genetische Prädisposition allein kann die Zunahme der Häufigkeit von Allergien nicht erklären, da der Beobachtungszeitraum hierfür zu kurz ist. Umweltfaktoren, wie der größeren Umweltverschmutzung durch verschiedenste Schadstoffe, wird ebenfalls eine allergiefördernde Rolle zugeschrieben [Ring et al 2000, Ring 2001/3]. Hierfür gibt es sowohl epidemiologische, als auch experimentelle Hinweise [Ring et al 2000, Saxon/Diaz-Sanchez 2005]. Besonders Dieselrußpartikel, Ozon und deren Auswirkungen auf Gesundheit und Allergieentwicklung stehen schon seit längerem im Zentrum der experimentellen Aufmerksamkeit [Saxon/Diaz-Sanchez 2005,

Sydbom 2001, Ring 2001/4]. Sicher nicht unbeträchtlich wiegen allerdings auch die vermehrte Beachtung von Allergien durch Ärzte und Öffentlichkeit und die verbesserten diagnostischen Möglichkeiten [Ring 2001/3].

## **2.3 Allergie, Atopie und ihre Ausdrucksformen**

### **2.3.1 Grundlegendes zum Begriff Allergie**

Der Begriff ‚Allergie‘ lässt sich definieren als eine „durch exogene Stoffe ausgelöste spezifische Änderung der Immunitätslage im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeit“ [Ring et al 2000, Przybilla 2000]. Die Allergie beruht auf einer individuellen, erworbenen Überempfindlichkeit durch eine immunologische Sensibilisierung, das heißt einer Verstärkung der Empfindlichkeit nach wiederholtem Kontakt mit dem Allergen [Ring et al 2000].

In diesem Zusammenhang kann von einer „Fehlleitung“ des Immunsystems gesprochen werden, das sich im Laufe des Heranwachsens eines Individuums mit den verschiedensten Allergenen auseinandersetzen muss, wobei es lernt, zwischen gefährlich und ungefährlich zu unterscheiden. Eine immunologische Toleranz sollte gegen „harmlose“ Antigene wie Nahrungsmittelantigene oder auch Pflanzen-Pollen bestehen, wohingegen eine starke und physiologische Abwehr gegen Infektionskrankheiten im Laufe des Lebens erworben werden muß. Diese Reaktionsweisen finden auf zellulärer Ebene bei den T-Lymphozyten statt und können jederzeit aus dem Gleichgewicht gebracht werden. Es wird vermutet, daß die Entstehung von Allergien unter anderem auf einer Störung dieser natürlichen Reifung des Immunsystems beruht [Ring et al 2000].

Die klinischen Manifestationsformen allergischer Reaktionen sind unterschiedlich und lassen sich durch die Einteilung in verschiedene Reaktionstypen durch Coombs und Gell (1969) klassifizieren. Coombs und Gell unterscheiden vier Grundtypen von Überempfindlichkeitsreaktionen, zu denen im Laufe der Zeit noch zwei weitere hinzugefügt wurden. Ihre Unterteilung erfolgt nach den hauptsächlich beteiligten Effektormechanismen [Fritsch 2004, Rassner 2000, Mygind 1998]. Überschneidungen der verschiedenen Pathomechanismen bei

demselben Krankheitsbild sind hierbei häufig.

### Typ I: Anaphylaktische Reaktion

Die häufigste Form der Allergie stellt die IgE-vermittelte Typ I-Reaktion dar [Mygind 1998, Ring 2004]. Hier kommt es zur Bindung des Allergens an IgE-Rezeptoren auf Mastzellen und Basophilen der Haut oder Schleimhaut. Bindet ein entsprechendes Antigen an die Antikörper, werden benachbarte IgE-Moleküle auf den Zellen quervernetzt, wodurch eine Degranulation der Zelle mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie z.B. Histamin oder Bradykinin stattfindet. Eine rasch auftretende Überempfindlichkeitsreaktion ist die Folge, weshalb die Typ I-Reaktion auch Reaktion vom Soforttyp genannt wird. Diese wird im Gewebe von einer Eosinophilie und einer chronischen Entzündungsreaktion gefolgt, die unter anderem auf einer Zytokinsekretion durch T-Zellen beruht. Klinische Beispiele für eine solche Reaktion sind der allergische Schock, bestimmte Formen der Urtikaria und des Angioödems, die allergische Rhino-Konjunktivitis und das allergische Asthma bronchiale. Typ I-Reaktionen treten überdies bei Patienten mit atopischer Dermatitis und Kontakturtikaria auf [Ring et al 2000, Fritsch 2004].

### Typ II: Zytotoxische Reaktion

Die sogenannte zytotoxische Reaktion wird durch zirkulierende IgG- oder IgM-Antikörper vermittelt, die an Antigene auf Zelloberflächen binden. Solche zellgebundenen Antigene können entweder von der Zelle synthetisierte Moleküle, z.B. Blutgruppenantigene sein, oder Fremdmoleküle, die an die Zelle gebunden werden, wie z.B. Medikamente. Es kommt zur Aktivierung des Komplementsystems und in der Folge zur Lyse der Zelle. Zytotoxische Reaktionen sind z.B. bei Transfusionsreaktionen, medikamenteninduzierten hämolytischen Anämien oder Purpura bei Thrombozytopenien und Agranulozytosen anzutreffen [Mygind 1998, Fritsch 2004].



### Typ III: Immunkomplex-medierte Reaktion

Bei diesem Reaktionstyp kommt es zu Komplexbildungen zwischen zirkulierenden Antigenen und spezifischen Antikörpern, insbesondere der Klasse IgG, aber auch IgA und IgM [Ring et al 2000]. Diese lagern sich vor allem an Basalmembranen von Gefäßen ab, was zu Komplementaktivierung und einer lokalen Infiltration von Neutrophilen führt, die gewebeschädigende lysosomale Enzyme freisetzen. Solche sogenannte Immunkomplexvaskulitiden können bei zahlreichen Krankheitsbildern auftreten, so z.B. bei der nekrotisierenden Vasculitis, der Serumkrankheit, bei Autoimmunerkrankungen wie dem SLE oder der rheumatoiden Arthritis, bei Medikamentenunverträglichkeit oder bei Infektionen.

### Typ IV: Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ

Dieser Typ wird auch als sogenannte zellvermittelte Überempfindlichkeit bezeichnet und ist durch lymphozytäre Infiltration, im engeren Sinne Infiltration von T-Zellen gekennzeichnet. Beispiele für diesen Reaktionstyp sind die Tuberkulinreaktion oder das allergische Kontaktekzem. Hierbei werden an Proteine gebundene Haptene von epidermalen Langerhanszellen aufgenommen, prozessiert und zusammen mit MHC-II-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert. Die in die regionären Lymphknoten migrierten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) geraten in Kontakt mit naiven T-Lymphozyten, welche nun als spezifisch sensibilisierte T-Helfer-Zellen (beim allergischen Kontaktekzem Th1) in die Haut zirkulieren und dort nach erneutem Antigenkontakt durch Zytokinfreisetzung und Aufbau des entzündlichen Infiltrats die Gewebsschädigungen hervorrufen. Die Jahresprävalenz an Typ IV-Reaktionen in der Gesamtbevölkerung Deutschlands beläuft sich auf rund 10 %, wobei das allergische Kontaktekzem zu den häufigsten Berufskrankheiten in Deutschland zählt [Ring et al 2000, Fritsch 2004]. Ein Nachweis von Typ IV-Reaktionen kann über den Epikutantest erfolgen.

### Typ V: Granulomatöse Reaktion

Bei der Granulomatösen Überempfindlichkeit bilden sich nach Injektion von Fremdstoffen innerhalb von zwei bis fünf Wochen Epitheloid-Zellgranulome. Diese entzündlichen Veränderungen der Haut erreichen ein Maximum erst nach mehreren Wochen und persistie-

ren über lange Zeit. Das morphologische Korrelat sind lividrötliche Knoten auf der Hautoberfläche [Ring 2004].

### Typ VI: Stimulierende Überempfindlichkeit

Hierbei lösen die Antikörper ähnlich wie Hormone durch Interaktion mit einem spezifischen Rezeptor direkt die pathogene Reaktion aus, d.h. es existieren keine die Reaktion verstärkenden Mediatoren oder Entzündungszellen [Ring 2004]. Typ VI-Reaktionen findet man bei der Autoimmunthyreoiditis oder der Myasthenia gravis [Ring et al 2000].

## **2.3.2 Grundlegendes zum Begriff Atopie**

Der Terminus ‚Atopie‘ lässt sich definieren als eine familiär auftretende Neigung zur Entwicklung von Erkrankungen des allergischen Formenkreises, wie dem atopischen Ekzem, der Rhinitis allergica oder dem allergischen Asthma [Przybilla 2000, Ring et al 2000]. Für die Diagnostik einer allergischen Erkrankung fallen neben klinischer Symptomatik und Familienanamnese der Nachweis der immunologischen Sensibilisierung durch Hauttest oder RAST-Test, d.h. dem Nachweis spezifischer IgE-Antikörper im Serum, sowie einem erhöhten Gesamt-IgE im Serum ins Gewicht [Ring et al 2000, Postma 2000]. Das Immunsystem des Atopikers reagiert auf kleinste Mengen eines Allergens mit der persistierenden Produktion von IgE. Die Ausprägung klinischer Symptome deckt sich jedoch nicht immer mit den gemessenen Laborparametern.

Obwohl immer noch kontrovers diskutiert wird, inwieweit eine genetische Prädisposition oder externe Faktoren, wie z.B. Umwelteinflüsse bei der Entwicklung einer Atopie eine wesentliche Rolle spielen [Przybilla 2000], wird ein genetischer Hintergrund heute mit relativ großer Sicherheit angenommen. Ob eine klinische Ausprägung stattfindet, scheint von Umweltfaktoren abzuhängen [Postma 2000].

### 2.3.3 Pathophysiologische Mechanismen der allergischen Reaktionen

Die Immunantwort lässt sich in eine Sensibilisierungsphase und eine Effektorphase aufteilen. Voraussetzung für eine Sensibilisierung ist ein wiederholter Kontakt mit dem sensibilisierenden Allergen. Bei der Antwort des Immunsystems auf ein Allergen wird dieses von den sog. Antigen-präsentierenden-Zellen internalisiert, prozessiert und an der Zelloberfläche gebunden an MHC-Klasse II-Moleküle den Lymphozyten präsentiert. Diese befinden sich als sog. „Wächter“ unter anderem in der Haut oder in Schleimhäuten und können spezifisch auf Allergene reagieren. Während die B-Zell-Reihe der Lymphozyten auf die Produktion von Antikörpern, bestehend aus fünf verschiedenen Klassen (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD), spezialisiert ist, läuft die T-Zell-Reaktion über zelluläre, entzündliche Reaktionen ab. Die T-Zellen können wiederum in verschiedene Subklassen unterschieden werden, die zytotoxischen T-Zellen, die T-Suppressor-Zellen bzw. T-regulatorische Zellen und die T-Helfer-Zellen, wobei letztere sich in Th1- und Th2-Zellen differenzieren können. Während die Th1-Zellen Zytokine wie IL-2 und IFN- $\gamma$  produzieren, sezernieren die Th2-Zellen u.a. IL-4 und IL-5. Dies sind Botenstoffe, die unterschiedliche Folgereaktionen bewirken, wie z.B. die Bildung verschiedener Arten von Antikörperklassen im Verlauf der darauf folgenden Immunantwort. So provoziert die Ausschüttung von IL-4 durch Th2-Zellen die vermehrte Bildung von IgE [Ring et al 2000].

Bei IgE-vermittelten Erkrankungen zeigt sich ein Ungleichgewicht innerhalb der T-Helferzellen mit Überwiegen der Th2- und abgeschwächten Th1-Reaktionen. In der Folge werden vermehrt Immunglobuline der Klasse E (IgE) gebildet, die wiederum weitere Entzündungszellen wie z.B. eosinophile Granulozyten anlocken.

Die Effektorphase der allergischen Entzündungsreaktion lässt sich in zwei Phasen aufteilen: die Reaktion vom Soforttyp und die verzögerte, dafür anhaltende Infiltration des Entzündungsortes durch Leukozyten, in der Mehrzahl eosinophiler Granulozyten.

Bei der Reaktion vom Soforttyp setzen IgE-beladene Mastzellen und Basophile nach Kon-

takt mit dem spezifischen Allergen hochaktive Botenstoffe, wie Histamin, Prostaglandine oder Leukotriene frei. Diese Botenstoffe bewirken eine lokale Entzündungsreaktion, die mit den Symptomen der jeweiligen allergischen Erkrankung wie Gefäßerweiterung, Sekretionssteigerung in Nase und Bronchien, bronchialer Obstruktion, Juckreiz oder im Extremfall Schock einhergeht. Über das Histamin als wichtigsten Botenstoff der allergischen Reaktion hinaus, hat sich die Aufmerksamkeit der Forschung auf weitere Gruppen potenter Mediatoren ausgeweitet, u.a. die Zytokine, Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle [Bachert 1998/1].

Bei der Allergie als systemischer inflammatorischer Erkrankung, spielen zahlreiche Entzündungsmediatoren ineinander. So zum Beispiel die Zytokine wie Interleukine (IL-3, -4, -5, -9 und -13), die die Produktion von IgE, eine Hyperreagibilität der Atemwege, die Überproduktion von Schleim und die Produktion von Eosinophilen und Mastzellen fördern, die bei der chronischen allergischen Entzündung eine wichtige Rolle spielen. Andere Entzündungsmediatoren stellen die Chemokine dar, wie die Eotaxine, CCL 5 (RANTES), die MCPs (Monocyte Chemoattractant Proteins) und CCL 17 (TARC). Diese Chemokine locken Entzündungszellen an und aktivieren sie [Masuyama 1994].

Die Einwanderung von Entzündungszellen, bestehend aus T-Zellen, Monozyten, Eosinophilen, Basophilen und Thrombozyten erfolgt über komplexe Vorgänge, die die selektive Adhäsion an das Endothel postkapillärer Venolen, Transmigration ins Gewebe und Interaktion mit den residenten Zellen, wie Mastzellen, Antigen-Präsentierenden-Zellen, Epithelzellen und Endothelzellen beinhalten [Walsh 2000]. Auf die Aufgaben der einzelnen Zellarten im Entzündungsprozess soll im späteren Text noch näher eingegangen werden.

### **2.3.4 Klinische Manifestation der Typ I-Allergie und ihre Mechanismen auf zellulärer Ebene am Beispiel der Rhinokonjunktivitis allergica**

Allergische Symptome treten in einer Vielzahl von Erscheinungsformen auf, wie der Urtikaria, dem Ekzem, dem Heuschnupfen, der Konjunktivitis, dem Asthma oder der Anaphylaxie. Sie können akut oder chronisch auftreten, führen zum Teil nur zu einer geringfügigen Beeinträchtigung der Lebensqualität, können aber auch lebensbedrohlich verlaufen. Die Vielzahl der Allergien reicht von der Nahrungsmittelallergie, Arzneimittel- oder Tierhaarallergie zur Unverträglichkeit natürlicher und künstlicher Stoffe, die vom Menschen im täglichen Leben nur schwer vermeidbar sind [Ring et al 2000]. Allergische Erkrankungen können sich an verschiedenen Organsystemen manifestieren. Am häufigsten betroffen sind die sogenannten Grenzflächen eines Individuums zu seiner Umwelt, die Haut und Schleimhäute. Im Falle der Rhinokonjunktivitis allergica (RA), die die häufigste allergische Erkrankung darstellt, sind dies die Nasenschleimhaut und die Bindehäute der Augen.

Die allergische Rhinitis ist eine weltweit verbreitete Erkrankung mit steigender Prävalenz. Mindestens 10-25% der Bevölkerung sind von dieser Erkrankung betroffen, die aufgrund verminderter Lebensqualität und hoher Behandlungskosten ein globales - auch volkswirtschaftliches - Problem darstellt [Bachert 2002/2, Van Cauwenberge 2002].

Während die allergische Rhinitis und die sie häufig begleitende allergische Konjunktivitis für sich gesehen oft nur lästige Krankheiten darstellt, sind ihre Folgen, wie das, durch den sog. Etagenwechsel hervorgerufene, allergische Asthma oft lebensbedrohlich [Bachert 2002/2].

Typische Symptome der allergischen Rhinokonjunktivitis sind Niesreiz, Naselaufen oder verstopfte Nase, Augenjucken und -rötung. In der Regel ist dies bedingt durch Aeroallergene wie Baum-, Gras- oder Kräuterpollen, die saisonal auftreten. Es findet sich aber auch eine perenniale Erscheinungsform, die auf einer Allergie gegen Hausstaubmilben, Haustiere oder berufliche Allergene beruht. Auch Luftschadstoffe sowohl in Innenräumen, als auch verursacht durch den vermehrten Autoverkehr, tragen erheblich zur Verschlimmerung der

Allergiesymptome bei [Bachert 2002/2].

Zusätzlich zu diesen Symptomen zeigt sich eine Zunahme der Mehrfach-Sensibilisierungen mit Verlängerung der Erkrankungszeit, sowie eine hohe Anzahl von Kreuzallergien zu Nahrungsmitteln. Mit der Erkrankung an Heuschnupfen geht die Gefahr der Entwicklung eines hyperreagiblen Bronchialsystems mit Ausbildung eines allergischen Asthma bronchiales, sowie Folgeerkrankungen im HNO-Bereich einher [Mygind 1998, Bachert 2002/2].

Die allergische Entzündung beim Heuschnupfen ist durch eine Ansammlung von Zellen charakterisiert, die über den CCR3-Chemokin-Rezeptor verfügen. Dazu gehören die Th2-Zellen, die Mastzellen und Eosinophile. Das Allergen reagiert mit an Mastzellen gebundenem IgE, wobei die Anzahl der epithelialen Mastzellen bei der allergischen Rhinitis erhöht ist. Das aus den Mastzellen konsekutiv freigesetzte Histamin verursacht typische Symptome wie Ödembildung durch direkte Wirkung auf vaskuläre Histaminrezeptoren, stimuliert sensorische Nerven und induziert reflexbedingtes Niesen und Hypersekretion der Schleimhaut.

Die allergische Reaktion in der Nase läßt sich in eine Früh- und eine Spätphase unterteilen. Die Frühphase besteht aus der akuten Soforttypreaktion und ist charakterisiert durch Juck- und Niesreiz. Gefolgt wird diese einige Minuten später durch Rhinorrhoe, das heißt eine verstärkte nasale Sekretion, die zumeist in nasaler Kongestion mündet. Die Spätphase der allergischen Reaktion ist gekennzeichnet durch nasale Obstruktion, die über mehrere Stunden anhält und die nasale Schleimhaut empfänglich macht für weitere allergene Stimuli. Die verschiedenen Phasen der allergischen Reaktion unterscheiden sich hinsichtlich der involvierten entzündlichen Mediatoren und Zelltypen. Während der Frühphase der allergischen Reaktion spielen Mastzellen die bedeutendste Rolle. Die initiale Konfrontation mit dem Allergen verursacht eine Quervernetzung von zwei IgE-Molekülen auf der Oberfläche der Mastzellen, die als Triggermechanismus für Degranulation der Zelle und Freisetzung von Histamin, und anderer entzündlicher Mediatoren wie Prostaglandinen und Leukotrienen aus den Zellgranula fungiert. Histamin übt dabei während der Frühphase der allergischen Reaktion direkte und indirekte Effekte auf sensorische Nerven, Gefäße und Drüsen der nasalen Mukosa aus. Solche Reaktionen beinhalten Juck- und Niesreiz (Nerven), Vasodilatation, Plasmaexsudation und Ödembildung (Gefäße). Diese Auswirkungen während der frühen Phase der allergischen Reaktion kann durch rechtzeitige Vorbehandlung mit Histaminantagonisten abgeschwächt,

bzw. verhindert werden.

Die sich anschließende Spätphase der allergischen Reaktion zeichnet sich aus durch einen Anstieg des nasalen Widerstandes und eine Zunahme der Histaminkonzentrationen in der Schleimhaut beider Nasenlöcher. In der Spätphase sind es basophile Granulozyten, die für die erhöhte Histaminproduktion verantwortlich sind [Wagenmann 1997]. Histamin spielt folglich in Früh- und Spätphase der allergischen Reaktion eine herausragende Rolle.

Während der Spätphasereaktion laufen darüber hinaus Adhäsionskaskaden und die Migration verschiedener Entzündungszellen mit vielzähligen Entzündungsmediatoren am Ort der Entzündung ab. Eosinophile, Mastzellen, Langerhanszellen und Makrophagen sowie aktivierte T-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle [Bachert 1990]. Die Ausschüttung von Zytokinen ist bei dieser zellulären Migration wesentlich. Neben Histamin sezernieren die Mastzellen Zytokine wie  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-4, -5 und -6 [Metcalf 1997]. Das proinflammatorische  $\text{TNF-}\alpha$  verursacht die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und eine Th2-Stimulation, stimuliert Endothel- und Epithelzellen, die wiederum selbst zur Zytokin- und Chemokinproduktion beitragen und somit die allergische Reaktion im Fluß halten. IL-4 und -5 aktivieren Eosinophile und Basophile, die zur Persistenz der Entzündung und der Hyperreaktivität bei allergischer Rhinitis und Asthma beitragen. Diese Mediatoren persistieren bei Allergikern am Ort der Entzündung, werden während der verschiedenen Phasen der Immunantwort modifiziert und unterscheiden sich von denjenigen, die bei Nichtallergikern anzutreffen sind [Bachert 1998/1]. Während der allergischen Adhäsionskaskade werden zirkulierende Leukozyten, v.a. Eosinophile und Basophile von verschiedenen Adhäsionsmolekülen (z.B. Selektinen oder Integrinen) zum Verlassen der Blutbahn mittels Diapedese in Richtung der nasalen Schleimhaut veranlasst. Chemokine und Adhäsionsmoleküle auf Epithelzellen lenken die Zellen zur Schleimhautoberfläche, wo sie ihre Mediatoren freisetzen. Eine erhöhte nasale Sekretion ist die Folge. Mediatoren dieser Reaktion sind u.a.  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1,  $\text{IFN-}\gamma$  und Histamin. Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) veranlassen die migrierenden Zellen zur Adhäsion ans Epithel. Sie regen die Expression anderer Adhäsionsmoleküle an, der Integrine, die eine feste Bindung der Eosinophilen an das Epithel, sowie deren Diapedese ins Schleimhautgewebe ermöglichen. Allergiker weisen eine erhöhte Expression dieser wichtigen Adhäsionsmoleküle, des E-Selektin, des Interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) und des Lymphozyten-

Funktions-Assoziierten-Antigens-1 (LFA-1) auf [Bachert 1995, Bachert 1998/1].

Neben der Histaminausschüttung spielen bei der allergischen Rhinitis auch Prostaglandine, Leukotriene und Bradykinine eine Rolle [Mygind 1998, Ring 2004]. Ein weiteres wichtiges Merkmal der allergischen Rhinitis ist die nicht-spezifische nasale Hyperreagibilität. Eine minimale nasale Entzündungsreaktion bleibt unabhängig von der derzeitigen Allergenexposition bei der persistierenden allergischen Rhinitis bestehen [Bachert 2002/2].

Antihistaminika sind besonders gut wirksam bei Niesreiz und Hypersekretion der Nasenschleimhaut, die durch das von Mastzellen und Basophilen freigesetzte Histamin bewirkt wurden. Die nasale Obstruktion, die entzündliche Spätreaktion oder die erhöhte Bereitschaft zur Schleimhaut-Reaktivität lassen sich allerdings weniger gut handhaben [Bachert 1998/2, Bachert 2002/2, Mygind 1998].

## **2.4 Granulozyten, T-Zellen und ihre Funktionen im Immunsystem**

Leukozyten werden gewöhnlich in Granulozyten und mononukleäre Zellen unterschieden. Nach der Kernmorphologie kann man sie in polymorphkernige und mononukleäre Leukozyten differenzieren, bzw. nach ihrer Herkunft in myeloische und lymphatische Zellen. Die Granulozyten haben unregelmäßig geformte Kerne und weisen in ihrem Zytoplasma charakteristische Granula auf. Aufgrund lichtmikroskopisch-färberischer Eigenschaften der Granula unterscheidet man neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. All jene haben die Fähigkeit zur Phagozytose und gehen nach unterschiedlich langer Lebenszeit zugrunde. Im Gegensatz zu den Granulozyten haben die mononukleären Zellen regelmäßiger geformte Kerne. Sie werden unterschieden in Lymphozyten und Monozyten. Alle genannten Zellarten spielen wichtige, wenn auch unterschiedliche Rollen bei der Immunabwehr. Leukozyten sind an der zellulären und humoralen Abwehr des Körpers gegen Fremdstoffe beteiligt. Sie haben die Fähigkeit zur Phagozytose, können die Blutbahn verlassen und zum Teil auch wieder dorthin zurückkehren [Abbas 1996, Junqueira 1996]



### 2.4.1 Neutrophile Granulozyten (PMN)

Die neutrophilen Granulozyten stellen rund 60% der Leukozyten. Sie stehen in vorderster Linie der unspezifischen Abwehr gegen Mikroorganismen und sind in der Lage, sich nach einem chemotaktischen Reiz auf Mikroorganismen zuzubewegen (Leukotaxis), diese aufzunehmen und abzubauen. Den Namen polymorphkernige mononukleäre Neutrophile (PMN) verdanken sie ihren gelappten, vielgestaltigen Kernen [Abbas 1996, Junqueira 1996].

Zirkulierende Leukozyten können aus den Blutgefäßen ins umliegende Gewebe transmigrieren. Dieser Migrationsprozess erfolgt in mehreren Schritten und beinhaltet die Zellaktivierung, eine Expression von Zelladhäsionsmolekülen und molekulare Zell-Zell-Interaktion zwischen Rezeptoren auf beiden Zellarten. Die Migration beginnt mit dem „Einfangen“ (Capture) der PMN durch die Gefäßwand und ist gefolgt durch ein Fortbewegen (Rolling) derselben an der Wand entlang. Zwei Adhäsionsmoleküle auf den PMN spielen eine wichtige Rolle im Adhäsionsprozess. Die Selektine (im speziellen L-Selektin auf den Leukozyten), die sowohl auf den PMN, als auch auf den Endothelzellen exprimiert werden, vermitteln eine lockere Adhärenz der PMN am Gefäßendothel, die die Wanderungsbewegung der Neutrophilen entlang der Endothelzellen nicht behindert [Crockett-Torabi 1998]. Durch die Integrine wird diese Wanderungsbewegung jedoch aufgehalten. Verursacht wird diese starke Adhäsion durch Wechselwirkungen zwischen den Integrinen auf der Oberfläche der PMN mit ICAM-1 auf der Endothelzelloberfläche [Diamond 1990]. Die wichtigsten Integrine auf den PMN sind hierbei Mac-1 (macrophage antigen-1; CD11b/CD18) und LFA-1 (lymphocyte-associated function antigen-1; CD11a/CD18) [Detmers 1990]. LFA-1 ist das vorherrschende Integrin bei der Leukozyten-Transmigration, wird konstitutiv exprimiert und durch Stimuli kaum beeinflusst. Mac-1 hingegen wird bei inflammatorischen Prozessen vermehrt auf der Leukozytenmembran exprimiert [Wagner 2000]. Der zu Mac-1 komplementäre Ligand auf den Endothelzellen ist ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD45), der auf der Endothelzellmembran nur in geringen Mengen konstitutiv exprimiert wird, dessen Expression jedoch bei Einwirken inflammatorischer Zytokine auf die Endothelzelle deutlich induziert wird [Klein 1995]. LFA-1 bindet ebenfalls an ICAM-1, allerdings mit geringerer Affinität [Wagner 2000]. Diese starke Adhäsion initiiert die Transmigration der Zellen aus dem Blut-

kreislauf ins Gewebe [Lawrence 1991].

Auch nicht chemotaktisch wirksame Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1 und IFN- $\gamma$ , die u.a. von T-Zellen, Makrophagen und Monozyten sezerniert werden, beeinflussen den Adhäsionsprozess an das Endothel. Folge dieser Zytokinausschüttung ist u.a. die Induktion von ICAM-1 und IL-8 durch Endothelzellen und eine Expression von CD18 auf den PMN [Wagner 2000]. Dieser Adhäsionskaskade geht eine Aktivierung der Leukozyten voraus. Dies geschieht in erster Linie durch Chemokine, die an heparinisierte Sulfidoproteoglykane auf der Oberfläche von Endothelzellen binden. Das wichtigste Chemokin ist hierbei CXCL8 (IL-8), das seine Wirkung entweder über den CXCR1- oder den CXCR2-Rezeptor entfaltet. Bei der Transmigration der Leukozyten durch das Endothel wirken die Chemokine als chemotaktische Stoffe, d.h. die Leukozyten wandern entlang eines Konzentrationsgradienten eines Chemokins auf seine Quelle zu (Chemotaxis). Auf den Leukozyten findet man Chemokinrezeptoren, die zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehörenden. Durch zahlreiche intrazelluläre Signaltransduktionen kommt es daraufhin zu einer Aktivierung der Integrine auf der Oberfläche der PMN. Durch den Reiz der Chemokine werden diese sonst inaktiven Integrine in den aktivierten Zustand überführt, der eine Bindung an der Endothelzelle und den darauf folgenden Transmigrationsprozess ermöglicht. Während des Entzündungsprozesses agieren die PMN als Effektorzellen der humoralen Immunität am Entzündungsort und sezernieren zellschädigende Enzyme, produzieren Sauerstoffradikale, phagozytieren Bakterien und kleine Partikel [Abbas 1996, Wagner 2000].

## 2.4.2 Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten sind mit 1-4%igem Anteil an den weißen Blutkörperchen wesentlich seltener. Zahlreiche Eigenschaften haben Eosinophile und Neutrophile gemeinsam, wie z.B. die Migration. Ihre Wanderrichtung in das umliegende Gewebe wird durch Konzentrationsgradienten von chemotaktischen Faktoren bestimmt wie z.B. verschiedener Chemokine oder Protein- und Lipidmediatoren (insbesondere Eotaxin = CCL11 und das Mastzellprodukt ECF-A (eosinophilic chemotactic factor of anaphylaxis)) [Fritsch 2004]. Das Chemokin Eotaxin (CCL11), ein CC-Chemokin, das an den CCR3-Rezeptor bindet, induziert eine De-

granulation und Chemotaxis in den Eosinophilen [Oliveira 2003].

Darüber hinaus synthetisieren die Eosinophilen Mediatoren wie die Leukotriene. Mit diesen Mediatoren können sie zu entzündlichen Gewebeeränderungen beitragen. Insbesondere nach Stimulierung durch bakterielles Antigen produzieren die Eosinophilen Sauerstoffradikale. Dabei entstehen Sauerstoffmetaboliten (z.B. Sauerstoffperoxyd), deren oxidative Wirkung organische Moleküle, Mikroorganismen und Gewebe zerstört.

An der Oberfläche der Eosinophilen werden IgE- und IgG-Rezeptoren unterschiedlicher Affinität exprimiert. Bei einer Quervernetzung von Antigen-bindenden IgE-Molekülen an der Zelloberfläche erfolgt eine Freisetzung der eosinophilen Granula. Sie ist wesentlich für die Abwehr von Parasiten und für die Mitwirkung der Eosinophilen bei allergischen Reaktionen vom Soforttyp. Somit trägt der eosinophile Granulozyt zur antikörpervermittelten zellulären Zytotoxizität wesentlich bei.

Wachstum und Differenzierung der Eosinophilen wird durch von T-Zellen stammende Zytokine wie z.B. IL-5 stimuliert. Durch T-Zell-Aktivierung akkumulieren Eosinophile am Ort der Parasiteninfektion bzw. der allergischen Reaktion [Abbas 1996]. Bei der Phagozytose sind die Eosinophilen langsamer und selektiver als die Neutrophilen. Aufgenommen werden Partikel, Mikroorganismen und auch Antigen-Antikörper-Komplexe. Während gesunde Haut und gesundes Lungengewebe nur wenige Eosinophile enthalten, ist ihre Zahl bei Patienten mit chronischen Allergien oft stark gesteigert. So ist z.B. die Entzündung der Atemwege bei allergischem Asthma durch eine grosse Anzahl von proinflammatorischen Zellen, die die bronchiale Schleimhaut infiltrieren, gekennzeichnet, unter denen die Eosinophilen den Hauptanteil ausmachen [Walsh 1997, Junqueira 1996].

Die von Eosinophilen produzierten Entzündungsmediatoren sind v.a. das MBP (major basic protein) und das ECP (eosinophiles kationisches Protein), welche in ihren Granula gespeichert werden, die Lipidmediatoren PAF und Leukotrien C4 [Weller 1993], Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Zytokine wie IL-2, IL-4, IL-5, GM-CSF (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor), sowie die Chemokine Eotaxin, CCL 1 (MIP-1a; macrophage colony-stimulating factor) und CCL 5 [Moqbel 1994, Oliveira 2003]. Auch Chemokinrezeptoren finden sich auf ihrer Zelloberfläche. Hierzu zählen zum Beispiel die Rezeptoren CCR3 für die Chemokine Eotaxin oder CCL5, CCR8 unter anderem für CCL17 oder auch CCR1 für

das Chemokin CCL5 [Nickel 1999, Oliveira 2003]. Diese Chemokine werden von unterschiedlichen Zellarten, wie zum Beispiel Epithelzellen oder dendritischen Zellen ausgeschüttet und bewirken eine Aktivierung und Chemotaxis des Eosinophilen.

### **2.4.3 T-Zellen**

Die T-Zellen gehören zur Sub-Population der Lymphozyten und somit zu den mononukleären Zellen. Rund 20-40% der Leukozyten des Blutes sind Lymphozyten. Im Wesentlichen können nach Herkunft und immunologischer Funktion drei Arten von Lymphozyten unterschieden werden, die B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen. Die T-Lymphozyten werden wiederum unterteilt in die CD4+ T-Helferzellen und die CD8+ zytotoxischen T-Zellen, eine Subklassifikation erfahren die regulatorischen T-Zellen und die Memoryzellen [Abbas 1996].

#### **2.4.3.1 Th1-Zellen**

Die Th1-Zellen stellen eine Unterklasse der T-Helfer-Zellen dar. Eine Th1 Immunantwort findet bei Kontakt mit intrazellulären Pathogenen wie Bakterien, Viren oder auch Kontaktallergenen statt. Das regulierende Zytokin ist hierbei IL-12. Wird im Lymphknoten eine naive T-Zelle antigenspezifisch über ihren T-Zell-Rezeptor und kostimulatorische Moleküle aktiviert, folgt eine Hochregulation von CD 40 auf ihrer Oberfläche, die wiederum eine IL-12 Produktion durch die Dendritische Zelle (DC) begünstigt. Eine Polarisierung der DC muss allerdings schon am Ort der Entzündung, z.B. durch bakterielle Antigene, stattgefunden haben, um die Th1-Bildung anzuregen. Die von den Th1-Zellen in der Mehrzahl produzierten Zytokine sind IL-2 und IFN- $\gamma$ , die mit der Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp assoziiert sind [Mosmann 1989, Fritsch 2004].

Ein Beispiel für eine Th1-Antwort ist die Kontaktallergie. Werden Kontaktallergen-spezifische T-Zellen in der Haut durch wiederholte Applikation des Kontaktallergens stimuliert, erfolgt eine Proliferation und Zytokinproduktion. Die Zytokine mediieren die Entzündung der aku-

ten Kontaktdermatitis.

### **2.4.3.2 Th2-Zellen**

Produzieren die DC bei der Aktivierung der naiven T-Zellen im Lymphknoten kein IL-12, erfolgt eine Differenzierung zu Th2-Zellen. Das Auftreten von Histamin oder TSLP am Entzündungsort kann einen solchen Prozess initiieren [Fritsch 2004, Soumelis 2002].

Die Th2-Zellen spielen vor allem bei allergischen Reaktionen und parasitären Erkrankungen eine wichtige Rolle. Eosinophile binden an die vermehrt gebildeten IgE-Antikörper und töten die Parasiten ab. Minimale Mengen von Allergenen können die Th2-Zellen aktivieren. Neben anderen Zytokinen produzieren sie in der Hauptsache IL-4 und IL-5 [Mosmann 1989]. IL-4 wirkt hierbei als Wachstumsfaktor für Mastzellen und veranlasst die B-Zellen zur IgE-Produktion. IL-5 leitet eine Differenzierung und Aktivierung von Eosinophilen ein [Fritsch 2004, Soumelis 2002, Maggi 1998].

Bei Atopikern werden vermehrt T-Zellen vom Th2 Phänotyp angetroffen. Bei allergischen Entzündungsreaktionen spielen Th2 Zellen eine wichtige Rolle, und werden vermehrt im Entzündungsgebiet, sei es in der Haut bei der atopischen Dermatitis, oder in der Mukosa des Respirationstraktes bei allergischem Asthma oder allergischer Rhinitis angetroffen [Ricci 1994, Sing 1999].

Die Th1- und Th2- Zellen unterliegen einer wechselseitigen Regulation, der sog. Th1/Th2 Balance. So hemmt das von den Th1-Zellen produzierte IFN- $\gamma$  die durch IL-4 initiierte IgE-Produktion. Umgekehrt hemmen die von den Th2-Zellen produzierten Zytokine IL-2, -6 und -10 die durch IFN- $\gamma$  hervorgerufene Aktivierung von Makrophagen, sowie deren IL-12-Produktion [Fritsch 2004, Lafaille 1998].

### **2.4.3.3 Regulatorische T-Zellen (T-reg)**

Von dieser Zellart existieren zahlreiche Untergruppen, wobei zwei Sorten als maßgeblich angesehen werden können. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-reg, welche CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen über Zellkontakt hemmen, und solche, die durch Sekretion suppressiver Zytokine wie IL-10 (T-

reg-1) und TGF-beta (T-reg-3) einen hemmenden Einfluss ausüben [McGuirk 2002].

Die sogenannten „natürlich vorkommenden“ (*naturally occurring*) CD4+CD25+ T-regulatorischen Zellen reifen im Thymus heran und sind von großer Wichtigkeit für die immunologische Toleranz, insbesondere bei der Vermeidung von autoimmunen Reaktionen [Itoh 1999, Walsh 2004, Fontenot 2003]. Sie unterscheiden sich von den übrigen CD4+ T-Zell-Untergruppen durch die Expression des intrazellulären Transkriptionsfaktors Foxp3 (=forkhead family transcription factor) [Walsh 2004]. Foxp3 wird heute als der Faktor angesehen, welcher die Differenzierung von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen kontrolliert [Hori 2003, Fontenot 2003, Yagi 2004]. Gegenstand aktueller Forschung sind derzeit die therapeutischen Optionen, die CD4+CD25+, Foxp3-exprimierende T-reg für die Behandlung von Autoimmunkrankheiten oder in Fragen der Transplantationsmedizin bieten könnten [Fontenot 2003, Hori 2003, Walsh 2004].

Von den *naturally occurring* regulatorischen T-Zellen unterscheidet man heute die sogenannten „induzierbaren“ CD4+ T-reg, deren supprimierende Fähigkeiten in der Peripherie, im Laufe einer normalen Immunantwort, angeregt werden [Walsh 2004]. Hierzu gehören die Th3- und T-reg-1-Zellen. Beide üben ihre regulierenden Fähigkeiten über die Sekretion von Zytokinen aus. T-reg-1-Zellen und andere T-reg Untergruppen regulieren wahrscheinlich Th1-vermittelte Entzündungsreaktionen [Groux 1997]. Die Th3-Untergruppe der T-regulatorischen Zellen hat Einfluss auf verschiedenste Zellarten und scheint an mehreren Punkten der Immunreaktion eine Rolle zu spielen [Gorelik 2002]. Werden die T-reg durch Antigen aktiviert, bewirken sie über eine Freisetzung von u.a. IL-10 eine Umwandlung von aktivierten T-Zellen am Entzündungsort in suppressive T-Zellen vom T-reg-1-Typ und dämpfen somit Entzündungsprozesse ein [Fritsch 2004].

#### **2.4.3.4 Zytotoxische T-Zellen (CTL; CD8+)**

Die CTL sind Teil einer T-Zell-Subpopulation, die Zielzellen abtöten, welche ein spezifisches Antigen präsentieren. Sie erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor und das CD8 Molekül auf ihrer Oberfläche Zellen, die den MHC-Klasse-I Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Durch diesen auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimierten Rezeptor werden den T-Zellen

internalisierte, prozessierte Antigenpeptide von Zielzellen präsentiert. Wichtig ist dies vor allem bei Zellen, die selbst keine Phagozytoseaktivität aufweisen. Von CD4+ T-Zellen gebildete Zytokine wie IL-2 und IFN- $\gamma$  sind für die Differenzierung der CTL vonnöten. Die auf das jeweilige Antigen spezialisierte CTL löst nach dessen Erkennung eine Lyse der von Viren oder anderen intrazellulären Mikroorganismen befallenen Zelle aus. Die Lyse wird hierbei durch Exozytose lytischer Granula aus der CTL, sowie durch Induktion eines programmierten Zelltodes (Apoptose) der befallenen Zelle bewirkt [Abbas 1996]. Das CD8-Molekül dient dabei der Adhäsion der T-Zelle an der Zielzelle und der Signalübermittlung. Eine weitere Funktion der CTL liegt in der Aktivierung von Makrophagen. Die CTL bilden IFN- $\gamma$ , das die mikrobiziden Fähigkeiten der Makrophagen fördert. Bei der allergischen Kontaktdermatitis lysieren hapten-spezifische CD8+ CTL, vor allem mittels Perforin, Keratinozyten die auf ihren MHC-Klasse-I Molekülen Kontaktallergenfragmente präsentieren [Traidl 2000].

## **2.5 Das Immunsystem der Haut und die physiologischen Interaktionen der Keratinozyten mit anderen Zellen**

Die Haut ist mit 2 m<sup>2</sup> Oberfläche das größte Organ des Menschen und nimmt als Grenzorgan des Organismus zu seiner Umwelt eine Schlüsselrolle bei der Immunabwehr ein. Sie ist Stimuli von beiden Seiten ausgesetzt, der Außenwelt wie dem Körperinneren. Die Haut besteht, von aussen nach innen, aus drei Schichten: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis. Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel. Die Keratinozyten repräsentieren neben den in wesentlich geringerer Zahl vorhandenen Merkel-Zellen, Melanozyten, epidermalen Langerhans-Zellen und den in die Haut einwandernden Lymphozyten die Haupt-Zellpopulation der Epidermis (90%)[Gröne 2002].

Von den vielfältigen Schutzfunktionen der Haut gegen die Außenwelt soll hier nur die immunologische Schutzfunktion herausgegriffen und detaillierter beleuchtet werden.

Man spricht heute vom sogenannten „SALT“, dem „skin associated lymphoid tissue“ als grund-

legendem Bestandteil des körpereigenen Immunsystems [Enk 2002]. Dieser Begriff steht für das aus epidermalen Langerhans-Zellen, Keratinozyten und epidermotropen, rezirkulierenden T-Zellen bestehende „Immunorgan Haut“ und illustriert die Verbindung des lymphozytären Systems in Blut und Lymphe mit dem immunologischen „Vorposten“ Haut.

Die Haut besitzt mit den Langerhans-Zellen, die hautspezifische dendritische Zellen darstellen, eigene antigenpräsentierende Zellen. Sie exprimieren konstitutiv auf ihrer Oberfläche MHC-Klasse-II-Moleküle, sowie co-stimulatorische Moleküle wie die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und MAC-1. Sekretorisches IgA wird laufend durch Drüsen in den Oberflächenfilm der Haut abgegeben [Fritsch 2004].

Die Keratinozyten gehen mit den anderen Zellen des Immunsystems wichtige Wechselwirkungen ein, indem sie bedeutsame Produzenten von Zytokinen, Chemokinen und anderen Mediatoren darstellen und somit an Entzündungsprozessen beteiligt sind [Albanesi 1998/1, Albanesi 1999, Albanesi 2000, Klunker 2003]. So wurde festgestellt, dass Keratinozyten durch den inflammatorisch wirkenden Stimulus IFN- $\gamma$  Zelladhäsionsmoleküle exprimieren, sowie Zytokine ausschütten und somit Zellen des Immunsystems aktivieren können [Albanesi 1998/1, Albanesi 1998/2]. Diese setzen wiederum auf diesen Stimulus hin eine Immunantwort in Gang, die sich in den atopischen Erkrankungen wie allergischer Rhinitis oder atopischer Dermatis niederschlagen kann.

Weiterhin ist bekannt, dass Keratinozyten als so genannte „nicht-professionelle“-Antigenpräsentierende Zellen auftreten können. Durch die Fähigkeit, im Rahmen eines entzündlichen Prozesses MHC-Klasse-II-Moleküle an ihrer Zelloberfläche zu exprimieren, können sie mit zirkulierenden T-Zellen in Wechselwirkung treten [de Bueger 1993, Nickoloff 1994].

Keratinozyten produzieren eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen, was ihnen sogar den Beinamen „cytokinocyte“ eingetragen hat [Gröne 2002]. Unter anderem werden von ihnen die proinflammatorischen Zytokine IL-1, -6, -8, und TNF- $\alpha$  und darüber hinaus die Interleukine IL-7, -10, -12, -15, -18, -20, und -24, sowie IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , und - $\gamma$  freigesetzt [Gröne 2002]. Diese Zytokine werden von den Keratinozyten entweder konstitutiv oder aufgrund einer Induktion durch verschiedene Stimuli produziert. Darüber hinaus exprimieren Keratinozyten eine Reihe Zytokinrezeptoren, wie die für IL-4, -13, und -17 und in geringerer Menge auch für IL-2 [Albanesi 1999, Albanesi 2000, Gröne 2002].



Die Zytokinproduktion der Keratinozyten hat unterschiedliche, auch systemische Konsequenzen auf das Immunsystem, und bewirkt unter anderem die Migration inflammatorischer Zellen, beeinflusst die Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten selbst und moduliert nicht zuletzt auch die Produktion anderer Zytokine durch die Hautzellen [Gröne 2002, Ricci 1994].

## 2.6 Keratinozyten: Expression von co-stimulatorischen Molekülen, Zytokinen und Chemokinen

### 2.6.1 Co-stimulatorische Moleküle

→ ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1, CD54)

Dieses zur Immunglobulin-Superfamilie gehörende Membranglykoprotein wird als sogenanntes co-stimulatorisches Molekül auf verschiedenen Zellarten, wie Leukozyten oder Endothelzellen exprimiert, und dient als Ligand für das auf Lymphozyten zu findende lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1; CD11a), Mac-1 (CD11b) sowie für den Komplement-Rezeptor 3 (CR3) [Miller 1995, Diamond 1990]. Die Expression dieses Adhäsionsmoleküls erfolgt bei Endothelzellen permanent, wird jedoch durch Entzündungsmediatoren wie IFN- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$  und - $\beta$  (TNF- $\alpha/\beta$ ) oder Interleukin-1 (IL-1) zusätzlich reguliert [Fritsch 2004]. Keratinozyten, die konstitutiv ICAM-1-negativ sind, werden rasch positiv, wenn sie durch proinflammatorische Mediatoren stimuliert werden. Die Expression von ICAM-1 erfolgt bei Keratinozyten parallel zu der von MHC-Klasse-II-Molekülen [Albanesi 1998/1, Albanesi 1998/2, Albanesi 1999, Bennion 1995, Fritsch 2004, Griffiths 1989]. Bei Bindung des LFA-1 an ICAM-1 werden eine Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen Immunzellen vermittelt, z. B. die Hilfe bei der Bindung zytotoxischer T-Lymphozyten und natürlicher Killerzellen (NK) an die zu zerstörenden Zielzellen, die Induktion einer Lymphozytenproliferation durch Antigen-präsentierende Zellen, die Entwicklung einer T-Zell-abhängigen humoralen Immunantwort oder auch die Zell-Zell-Kooperation im Rahmen entzündlicher Prozesse. Eine Hochregulation von ICAM-1 auf Keratinozyten nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  würde einer Initialisierung dieser immunologischen Prozesse entsprechen [Flier 1999, Dustin 1988, Kalish 1989].

Die Oberflächenmoleküle mediierten Zell-Zell-Adhäsionen und Diapedese und fördern somit die Ansammlung von Entzündungszellen am Ort der chronischen allergischen Manifestation [Van Cauwenberge 2002].

→ HLA-DR- $\alpha$  (humanes Leukozyten-Antigen; = MHC-II)

Die MHC-Klasse-II-Moleküle werden von den Genen im HLA-D (DP, DQ, DR) des menschlichen Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) kodiert. Diese Glykoproteine werden in der Plasmamembran von Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen, B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Endothelzellen exprimiert. Die Fähigkeit, den T-Helferzellen Antigen zu präsentieren, ist abhängig von der Menge der exprimierten Klasse-II-MHC Moleküle [Abbas 1996]. Die beiden extrazellulären  $\alpha$ 1 und  $\beta$ 1-Domänen sind zu einer gemeinsamen „Bindungstasche“ gefaltet, die das antigene Peptid aufnimmt und es daraufhin den CD4+-T-Lymphozyten präsentiert. Zuvor wurden endozytierte antigene Proteine intrazellulär in Peptide gespalten, jene wurden eingefangen und an das MHC-Klasse-II-Molekül gebunden in die Plasmamembran transportiert [Abbas 1996].

Die Hauptaufgabe der CD4+-T-Zellen ist, andere Effektorzellen des Immunsystems zu aktivieren. So werden B-Zellen, die auf ihren MHC-Klasse-II-Molekülen antigene Peptide präsentieren durch den Kontakt mit den T-Zellen zur Immunglobulinproduktion angeregt [Janeway 1999]. Makrophagen töten die Pathogene in ihren Vesikeln nach Zusammentreffen mit den T-Zellen. IFN- $\gamma$  erhöht die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und kann deren Expression auf Zellen induzieren, die diese normalerweise nicht exprimieren [Janeway 1999, Albanesi 1998/2, Bennion 1995, Griffiths 1989].

Die Tatsache, dass Keratinozyten auf Stimulation mit IFN- $\gamma$  hin von CD4+ Th1-Zellen in Apoptose getrieben werden [Traidl 2000], lässt den Rückschluss zu, dass sie in der Lage sind, bei der allergischen Kontaktdermatitis den T-Zellen Nickel-Antigen über eine ausreichende Anzahl von MHC-Klasse-II Molekülen zu präsentieren.

→ HLA-ABC (humanes Leukozyten-Antigen; = MHC-I)

MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Durch sie werden prozessierte endogene, d.h. innerhalb der Zelle synthetisierte Antigene oder virale Proteine auf der Zelloberfläche präsentiert. CD8+ zytotoxische T-Zellen, die mit den MHC-Klasse-I/Peptidkomplexen reagieren, werden dadurch aktiviert und lysieren durch Sekretion von lytischen Enzymen derartige Peptid-exprimierende Zellen [Burmester 1998]. Dies ist vor al-

lem wichtig bei der Bekämpfung von Viren, die nahezu jede Zelle befallen können, durch das Immunsystem [Janeway 1999]. Interferone können die Fähigkeit, Peptide auf MHC-Klasse-I-Moleküle zu laden, im Zellinneren induzieren und somit die Antigen-präsentierende Funktion von MHC-Klasse-I-Molekülen verstärken [Janeway 1999].

### **2.6.2 Zytokine**

Zytokine sind körpereigene Peptide, die von aktivierten T-Zellen und anderen Zellen, wie den Mastzellen, während der natürlichen und spezifischen Immunantwort freigesetzt werden [Zhao 2004]. Sie haben vielzählige, u.a. proinflammatorische und immunregulatorische Aufgaben. Darüber hinaus steuern Zytokine die Hämatopoese von Entzündungszellen. Die spezifische Wirkung der einzelnen Zytokine ist abhängig von der konzentrationsabhängigen Bindung an spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen und der darauf folgenden Aktivierung von zellulären Prozessen, sei es auf Zellmembran- oder auch genetischer Ebene [Moser 2000]. Zytokine können einen wichtigen Einfluss auf die Fähigkeit des Körpers, angemessen auf seine Umgebung zu reagieren und systemische Erkrankungen zu überwinden, ausüben. Mit Bekanntwerden der verschiedenen, von den Keratinozyten produzierten Zytokine, wird dem Menschen die Möglichkeit gegeben, mit ädquaten Therapiemöglichkeiten auf Krankheiten zu reagieren [Gröne 2002]. Zu den Zytokinen gehören u.a. die Interleukine (ILs), Interferone (IFNs), Monokine, chemotaktische Peptide, Wachstumsfaktoren (CSFs) und Tumornekrose-Faktoren (TNFs) [Roche Lexikon 1998, Mygind 1998].

### **2.6.3 Chemokine**

Als Chemokine werden kleine, proinflammatorische Mediatoren bezeichnet, die primär chemotaktisch wirken und verschiedene Subtypen von Leukozyten, wie die basophilen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, spezifisch aktivieren können [Van Cauwenberge 2002, Luster 1998]. Sie werden in vier Klassen unterschieden: CXC, CC, C und CX3C [Zlotnik 2000].

Die Chemokine sind eine Gruppe von rund 40 kleinen Proteinen (6 bis 15 kD) mit ähnlichen, Cysteinylenhaltenden Strukturen. Alle Chemokine besitzen an ihrem Amino-terminalen Ende vier Cysteinreste, die Disulfidbrücken bilden. Sie werden durch die Sequenz der zwei dem NH<sub>2</sub>-Ende am nächsten gelegenen Cysteine klassifiziert. Bei den CXC-Chemokinen werden die Cysteine durch eine Aminosäure (X) getrennt. Bei den CC-Chemokinen liegen die Cysteine nebeneinander. Diese Strukturdifferenz spiegelt sich in ihrer Fähigkeit wieder, eine Leukozytenmigration hervorzurufen. Die Chemokine der CXC-Unterfamilie werden vor allem von aktivierten mononukleären Phagozyten und von Endothelzellen produziert. CXCL8 (IL-8) ist der bekannteste Vertreter dieser Familie. Die CC-Unterfamilie wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen produziert. Sie wirken fast nur auf bestimmte mononukleäre Entzündungszellen. So wirkt CCL5 (RANTES) z.B. auf CD4+ Gedächtnis-T-Zellen und Monozyten. Die Chemokine beider Unterfamilien binden an heparinisierte Sulfidoproteoglykane auf den Endothelzellen und dienen wahrscheinlich hauptsächlich der Steuerung der Chemokinese.

Nach Bindung an die Chemokinrezeptoren auf zahlreichen Zellen (darunter Neutrophile, Eosinophile und Basophile) können Chemokine eine Degranulation und Superoxidfreisetzung bewirken, sowie die Genexpression, Proliferation, Homöostase oder auch Apoptose von Zellen beeinflussen [Rollins 1997]. Th1- und Th2-Zellen exprimieren unterschiedliche Chemokinrezeptoren. Chemokine sind bei der Initiation und Verstärkung von Typ-1 und Typ-2 Antworten maßgeblich beteiligt [Soumelis 2002].

Es folgt eine Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Moleküle und deren spezifischer Eigenschaften im Immunsystem.

→ IFN- $\gamma$  (Interferon-gamma)

Das Glykoprotein IFN- $\gamma$  wird vor allem von Antigen-aktivierten CD4+ T-Zellen vom Th1-Typ, CD8+ T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK), in geringem Maß auch von B-Lymphozyten sezerniert. IFN- $\gamma$  ist der potenteste Aktivierungsfaktor für mononukleäre Phagozyten, es verstärkt ihre Phagozytosefähigkeiten, die Bildung von antimikrobiell wirkendem NO und Sauerstoffradikalen, und bewirkt eine verstärkte Expression von Fc-

Rezeptoren [Fritsch 2004]. Es steigert darüber hinaus die Zytokinsynthese, die Expression von MHC-Klasse-I- und II-Molekülen, und fördert somit die Erkennungsphase der Immunantwort. Neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen und Endothelzellen werden durch das Zytokin aktiviert. Für B- und T-Lymphozyten stellt es einen sehr effektiven Wachstums- und Differenzierungsfaktor dar. Als Schlüsselzytokin wirkt es bei Th1-medierten Typ-IV-Reaktionen wie der allergischen Kontaktdermatitis. Das Wachstum von Th2-Zellen wird hingegen unterdrückt. Th1- und Makrophagenreiche Entzündungsreaktionen werden also gefördert, Th2- und Eosinophilenreiche Reaktionen, sowie der Ig-Klassenwechsel in Richtung einer IgE-Produktion gehemmt [Abbas 1996, Farrar 1993].

Keratinocyten der Haut werden unter *in-vitro*-Bedingungen durch IFN- $\gamma$  zur Synthese und Freisetzung von Chemokinen, wie z.B. CCL5 oder CXCL8 angeregt [Li 1996, Albanesi 1998/1]. Auch die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (CD54) und MHC-Klasse-II wird unter *in-vitro* und *in-vivo*-Bedingungen stimuliert [Griffiths 1989, Bennion 1995].

Durch IFN- $\gamma$  wurde eine dosisabhängige Produktion von löslichem ICAM-1 (sICAM-1) in Überständen von Keratinocytenkulturen bewirkt [Budnik 1992].

Mit IFN- $\gamma$  stimulierte Keratinocyten werden darüber hinaus empfänglich für Th1 CD4+-T-Zell-Toxizität, was z.B. eine Erklärung für die Gewebsverletzung bei der allergischen Kontaktdermatitis liefert [Traidl 2000].

→ CCL 5/RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted)

Dieses zur CC-Subfamilie gehörende Chemokin wirkt vor allem auf basophile und eosinophile Granulozyten, aber auch auf Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und dendritische Zellen chemoattraktiv [John 1997].

Produziert u.a. von T-Zellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen der Atemwege und Thrombozyten, spielt es eine bedeutende Rolle bei chronischen entzündlichen Prozessen, degranuliert Basophile, und aktiviert T-Zellen, die daraufhin ihre Adhäsionsmoleküle verstärkt exprimieren [Janeway 1999, John 1997].

Es bindet u.a. an die Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5, die auf Eosinophilen, T-Lymphozyten, Monozyten und zahlreichen anderen Zellen angetroffen werden [Fritsch 2004, Oliveira 2003,

Nickel 1999, Rollins 1997].

Keratinozyten exprimieren konstitutiv kaum CCL5, werden aber durch Stimulation mit IFN- $\gamma$  zur CCL5-Produktion angeregt [Albanesi 1998/1, Wakugawa 2001]. Diese Produktion lässt sich experimentell durch Dexamethason ( $c=10^{-8}$  M) [Wakugawa 2001] oder Cetirizin ( $c=10^{-9}$ - $10^{-3}$ M) [Albanesi 1998/1] hemmen.

→ CXCL 8/IL-8 (Interleukin-8)

Das proinflammatorische Chemokin CXCL 8/IL-8, ist ein Mitglied der CXC-Chemokin-Familie [Lippert 1995]. Es bindet sowohl an den CXCR1-, als auch den CXCR2-Rezeptor [Nickel 1999]. Nach seiner Entdeckung wurde es, noch ohne genaue Kenntnis seiner Funktion, den Interleukinen zugeordnet, erst später wurde seine chemotaktische Wirkung näher erforscht. Es stimuliert selektiv die Fähigkeit von Neutrophilen und T-Zellen, in verletztes oder entzündetes Gewebe einzuwandern [Hebert 1991], und ist der Hauptstimulus für die Migration von PMN bei zahlreichen inflammatorischen Reaktionen [Nickel 1999]. Exogene Stimuli wie LPS oder IL-1 und TNF- $\alpha$  induzieren die CXCL8-Produktion in einer Vielzahl von Zellen. Mit Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, Endothel- und Epithelzellen, Keratinozyten, Neutrophilen und T-Zellen seien nur ein paar genannt [Moeller 1993, Detmers 1990, Nickel 1999]. Neben dieser chemotaktischen Komponente stimuliert CXCL8 auch die Sekretion von lysosomalen Enzymen in Neutrophilen, sowie die LFA-1-Produktion auf denselben, was diese befähigt, an vaskuläre Endothelzellen, die ICAM-1 exprimieren, zu adhären. Basophile werden durch CXCL8 zur Histaminfreisetzung angeregt [Krieger 1992]. Eine Beteiligung von CXCL8 lässt sich bei allergischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale oder der Kontaktdermatitis nachweisen, darüber hinaus in Hautläsionen bei an Psoriasis erkrankten Patienten [Baggiolini 1989]. Die CXCL8-Produktion durch Keratinozyten wird durch externe Stimuli wie Arsen, kontaktsensibilisierenden und irritierenden Substanzen angeregt [IL-8 ELISA, Burmester 1998, Janeway 1999, Gröne 2002].

→ CCL 17/TARC (thymus and activation-regulated chemokine)

CCL17 ist ein Chemokin, das CC Chemokin-Rezeptor 4 - positive (CCR4+) oder CCR8+ Zellen, wie mononukleäre Zellen und Lymphozyten, anzieht. Auf diesen bindet es an den CCR-4 und CCR-8 Rezeptor. Es wird u.a. von dendritischen Zellen, Endothelzellen und epidermalen Keratinozyten produziert. Bei der Genese der atopischen Dermatitis spielt es als Chemoattraktans von Th2-Zellen eine wichtige Rolle [Kakinuma 2001, Fritsch 2004].

→ CXCL 10/IP-10 (IFN- $\gamma$ -inducible protein 10)

Das Chemokin CXCL10 (IP-10) wirkt immunstimulatorisch, anti-angiogenetisch und fördert im Gegensatz zu CCL 17 die Th1-Immunantwort [Janeway 1999]. Sein Rezeptor ist CXCR3 [Nickel 1999]. Es wird von aktivierten Keratinozyten vermehrt bei Psoriasis, dem fixen Arzneimitteloxanthem und dem allergischen Kontaktekzem produziert [Fritsch 2004, Flier 1999]. Weitere Produzenten sind Monozyten, T-Zellen, Fibroblasten und Endothelzellen. Durch CXCL10 werden ruhende T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten angezogen [Nickel 1999].

→ CXCL 9/MIG (Monokine induced by IFN- $\gamma$ )

Dieses Chemokin, das Mitglied der CXC-Superfamilie ist, wird von verschiedenen Zelltypen, vor allem von PMN, nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  sezerniert. Es bindet an den Rezeptor CXCR3 und wirkt chemotaktisch auf NK und Th1-Lymphozyten [Nickel 1999]. Vermehrt exprimiert wird es z.B. bei der allergischen Kontaktdermatitis [Flier 1999].

Eine Inhibierung der Ausschüttung bzw. Expression dieser Mediatoren würde einen wichtigen Schritt in Richtung auf die Entwicklung einer effizienteren Behandlung allergischer Erkrankungen bedeuten.



## 2.7 Histamin

Histamin ist ein vor allem in den Granula von Mastzellen und basophilen Granulozyten als Histamin-Heparin-Proteinkomplex gespeichertes biogenes Amin. Es gilt als einer der wichtigsten Entzündungsmediatoren bei der allergischen Typ-I-Reaktion und spielt eine wichtige Rolle bei anaphylaktischen Reaktionen [Fritsch 2004]. IgE-Antikörper binden mit ihren Fc-Anteilen an hoch- und niedrigaffine IgE-Rezeptoren (Fcε-R1) auf Mastzellen und Basophilen. Bindet ein entsprechendes Antigen folgt eine Quervernetzung benachbarter IgE-Moleküle, die mittels Degranulation der Zelle eine Freisetzung von Histamin und Entzündungsmediatoren auslöst [Fritsch 2004].

Zahlreiche exogene und endogene immunologische Stimuli induzieren die Histaminfreisetzung, so zum Beispiel die bereits erwähnten Allergene im Verbund mit IgE, aber auch Zytokine wie IL-1, IL-3 oder GM-CSF, Substanz P, Komplement C3a und C5a, der Platelet-activating Faktor (PAF), Hyperosmolarität und physikalische Stimuli wie Hitze, Kälte oder Vibration [Bachert 2002/3].

Die biologischen Wirkungen des Histamins im Gewebe werden durch vier verschiedene Oberflächenrezeptoren gewährleistet, die H1-, H2-, H3- und H4-Rezeptoren. Diese Histaminrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die sich auf zahlreichen Histamin-sensiblen Zielgeweben und -zellen befinden.

Hierbei werden die zur anaphylaktischen Reaktion beitragenden entzündungsfördernden Effekte von Histamin vor allem via H1-Rezeptoren vermittelt, seine entzündungshemmenden Effekte via H2-Rezeptoren [Bachert 2002/3]. Eine Bindung des Histamins an H1-Rezeptoren bewirkt eine Aktivierung der Phospholipase C und in der Folge erhöhte Konzentrationen des Second-messengers Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und des intrazellulären Kalziums. Diese führen wiederum zu Signaltransduktion und der Potenzierung spezifischer biologischer Effekte [Bachert 2002/3].

Hierdurch wird eine Kontraktion glatter Muskulatur vor allem im Bronchialsystem und im Darm, eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, eine Erweiterung der terminalen Arteriolen, eine Kontraktion postkapillärer Venolen, sowie eine gesteigerte Aktivität nasaler und bronchialer Schleimdrüsen induziert. Zusätzlich wird die Neutrophilen- und Eosinophilenchemo-

taxis angeregt [Fritsch 2004].

All dies sind Reaktionen, die zum typischen Bild der allergischen Erkrankungen beitragen, welche sich in Urtikaria, Asthma bronchiale, Rhinokonjunktivitis allergica oder atopischem Ekzem äußern.

Über H<sub>2</sub>-Rezeptoren wird vor allem die Magensäuresekretion mediiert. H<sub>2</sub>-Rezeptorenblocker werden für die Vorbeugung und Therapie gastraler Ulcera eingesetzt [Soll 1979].

H<sub>3</sub>-Rezeptoren befinden sich im ZNS und besitzen neuroregulatorische Funktionen [Bachert 2002/3, Fritsch 2004]. Die erst kürzlich näher erforschten H<sub>4</sub>-Rezeptoren sind auf hämatopoetischen Zellarten exprimiert, die an der Entwicklung und Symptomausprägung von Allergien und Asthma teilhaben. Man findet sie auch auf eosinophilen Granulozyten, wo sie für die durch Histamin induzierte Chemotaxis der Eosinophilen verantwortlich sind. Eine Antwort auf die Frage, ob eine Entwicklung von H<sub>4</sub>-Antagonisten eine Rolle in der Behandlung dieser Erkrankungen spielen könnte, wieder derzeit erforscht [Fung-Leung 2004, Ling 2004].

Histamin-Rezeptoren wurden neben der bereits bekannten Expression auf Mastzellen und Basophilen auch auf Neutrophilen, Eosinophilen, Lymphozyten, Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen gefunden, und scheinen die immunologische Funktion dieser Zellen zu beeinflussen. So verstärkt Histamin die Sekretion von Th<sub>2</sub>-Zytokinen und inhibiert die Produktion von Th<sub>1</sub>-Zytokinen [Packard 2003]. In der Haut finden sich H<sub>1</sub>- und H<sub>2</sub>-Rezeptoren unter anderem auf Mastzellen, dermalen dendritischen Zellen, Endothelzellen und Keratinozyten [Koizumi 1999, Ohtani 2003, Fritsch 2004]. Für dermatologische Indikationen sind vor allem H<sub>1</sub>-Rezeptorenblocker wie die Antihistaminika von Bedeutung [Fritsch 2004].

In neueren Studien wurden zunehmend pro-inflammatorische Effekte des Histamins diskutiert [Bachert 2002/3]. Dabei scheint Histamin bei allergischen Erkrankungen als entzündungsfördernder Mediator eine bedeutende Rolle zu spielen.

Bronchiale und nasale Epithelzellen sind in der Lage, eine Vielzahl von biologisch aktiven Mediatoren, wie Zelladhäsionsmoleküle, Zytokine, und MHC-Klasse-II-Antigene zu synthetisieren, welche die Migration und Aktivierung von inflammatorischen Zellen beim Asthma oder der allergischen Rhinitis beeinflussen können [Devalia 2000]. Diese Mediatoren können durch Histamin via H<sub>1</sub>-Rezeptor vermehrt exprimiert werden, was in einer Studie, in der

erhöhte Expressionen des MHC-Klasse-II-Antigens (HLA-DR), sowie des *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) auf bronchialen Epithelzellen nach Stimulation mit Histamin gemessen wurden, gezeigt werden konnte [Vignola 1993].

Endothelzellen spielen aufgrund ihrer strategisch günstigen Lage an der Blut-Gewebe-Grenze eine wichtige Rolle in entzündlichen Prozessen. So exprimieren sie Adhäsionsmoleküle, produzieren Chemokine, ändern die Permeabilität von Blutgefäßen und produzieren vasoaktive Mediatoren [Burke-Gaffney 2000].

Eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin, E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1 oder PECAM-1 auf den Endothelzellen, sowie Chemokine wie CCL5, CXCL8 oder Eotaxin lösen die transendotheliale Migration der Leukozyten zum Entzündungsgebiet aus. Histamin ist über den H1-Rezeptor ein Auslöser dieser Migration [Burke-Gaffney 2000]. Auf einer Vielzahl menschlicher Endothelzellen wird der H1-Rezeptor exprimiert, so auch in den Schleimhäuten der Atemwege, des Auges oder der Haut [Koizumi 1999].

Histamin in niedrigen Konzentrationen scheint also über H1-Rezeptoren stimulatorische Effekte auf Entzündungszellen auszuüben, während es in höheren Konzentrationen über den H2-Rezeptor entzündungshemmend wirkt [Bachert 2002/3]. Es wirkt anregend auf Eosinophile, Th2-Lymphozyten, Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen, die alle eine Rolle bei allergischen Entzündungsreaktionen spielen. Im Gegensatz dazu hemmt es Basophile und Neutrophile und vermindert die Freisetzung von IFN- $\gamma$  und IL-2 aus Th1 Zellklonen, jedoch nicht aus Th2 Klonen [Bury 1992, Bachert 2002/3]. Betrachtet man die wichtige Funktion von Eosinophilen und Th2 Lymphozyten bei allergischen Erkrankungen, erhärtet sich der Verdacht, daß Histamin eine wichtigere proinflammatorische Rolle innehat, als bisher angenommen wurde.

Die bedeutende Rolle von Antihistaminika bei der Bekämpfung allergischer Erkrankungen scheint sich also neben antiinflammatorischen Effekten, die mit einer verminderten Bildung zahlreicher inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  oder CXCL8 einhergehen, vor allem auf ihre antagonisierenden Effekte am H1-Rezeptor zu begründen [Church 1999].

Die Histamin-Rezeptor-unabhängigen Effekte scheinen jedoch im allgemeinen höhere Dosierungen der Antihistaminika zu benötigen, was eine klinische Relevanz in Frage stellt

[Bachert 2002/3].

## 2.8 Medikamentöses Behandlungskonzept von Allergien

Allergien können auf unterschiedliche Weisen bekämpft werden. Neben der oft nicht realisierbaren Allergen-Karenz, stehen die spezifische Hyposensibilisierung und die Pharmakotherapie im Vordergrund [Ring et al 2000, Bachert 2002/2]. Von den vielzähligen Möglichkeiten der Pharmakotherapie von Allergien sollen hier zwei für die durchgeführten Versuche relevante herausgegriffen und näher erläutert werden.

### 2.8.1 Glukokortikoide

Glukokortikoide kommen bei verschiedenen Indikationen zum Einsatz und können topisch oder auch systemisch bei schwerwiegenderer Problematik angewendet werden [Bachert 2002/2]. Im Gegensatz zu den Antihistaminika sind die spezifischen molekularen Mechanismen, durch die Glukokortikoide die Zytokinproduktion beeinflussen, schon näher erforscht [Lippert 1995, Masuyama 1994].

Die antiinflammatorische Wirkung der Glukokortikoide lässt sich durch eine Hemmung von Zytokin-Expression und proinflammatorischen Molekülen, wie Prostaglandinen oder Leukotrienen veranschaulichen. Glukokortikoide binden hierbei an einen zytoplasmatischen Glukokortikoidrezeptor. Dieser Ligand-Rezeptor-Komplex interagiert mit einem spezifischen Glukokortikoid-Respons-Element (GRE) auf dem Zielgen. Das Ergebnis ist eine Stimulation oder Inhibition der mRNA-Expression. Viele Zytokine, z.B. auch CXCL8, haben solche negativen GREs auf ihren Genen [Ray 1990, Mukaida 1989]. Als weitere Möglichkeiten für die Hemmung der Zytokinfreisetzung durch Glukokortikoide sind eine Destabilisierung von Zytokin-mRNA oder posttranskriptionelle Regulationsmechanismen zu nennen [Tobler 1992]. Darüber hinaus hemmen Glukokortikoide die Eosinophilenbildung und begünstigen deren Abbau, sie hemmen den Einstrom von Entzündungsmediatoren ins Gewebe und fördern eine Ödemrückbildung [Ring et al 2000, Zhao 2004, Ricci 1994, Lippert 1995].

Glukokortikoide können die Produktion von Zytokinen und Zell-Adhäsionsmolekülen von Makrophagen und Monozyten, Mastzellen, Endothelzellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten inhibieren [Tobler 1992, Paolieri 1997, John 1997, Wheller 1997, Zhao 2004]. Sie reduzieren darüber hinaus die Zahl von inflammatorischen Zellen wie Mastzellen und Eosinophilen am Ort der Entzündung [Paolieri 1997]. Mit der Reduktion von Zell-Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 auf stimulierten Zellen geht eine potente Suppression der trans-endothelialen Passage von Neutrophilen einher, und somit eine wichtige anti-migratorische Wirkung des Steroids [Wheller 1997].

#### Übersicht über einige relevante Forschungsergebnisse zum antiinflammatorischen Effekt von Glukokortikoiden

Im Jahre 2004 wurde ein starker hemmender Effekt von Budesonid und Dexamethason auf die Freisetzung von CXCL8 aus einer mit PMA und Ionomycin stimulierten humanen Mastzelllinie (HMC-1) beschrieben. Desloratadin ( $10^{-6}$ - $10^{-10}$ M) als Vergleichssubstanz wies nur eine mäßige Hemmung der untersuchten Zytokinfreisetzung auf [Zhao 2004].

Eine hemmende Wirkung auf die CXCL8-Ausschüttung wurde auch bei humanen Fibroblasten [Tobler 1992] und bei einer Basophilen-, sowie einer Mastzellenlinie [Lippert 1995, Lippert 1996] beschrieben.

Budesonid hemmte weiterhin die Expression von ICAM-1 auf humanen Epithelzellen [Paolieri 1997, Papi 2001]. Eine reduzierte Expression von ICAM-1 durch Glukokortikoide wurde weiterhin in mehreren Studien für Endothelzellen beschrieben [Cronstein 1992, Wheller 1997].

Die CXCL8 - und CCL5-Ausschüttung im Nasensekret nach Allergenreiz wurde durch Glukokortikoide ebenfalls deutlich erniedrigt [Simons 1995].

Albanesi et al. beschrieben 1998 zwar eine Herunterregulierung von HLA-DR und CXCL8 durch IFN- $\gamma$ -stimulierte und mit Hydrocortison inkubierte Keratinozyten, allerdings wurde in dieser Studie eine verstärkte Expression von ICAM-1 auf den Zellen, sowie eine verstärkte Sekretion des löslichen ICAM-1 (s-ICAM-1) durch Hydrocortison festgestellt [Albanesi 1998/1].

Tabelle VI (Seite VII) im Anhang legt ausgewählte Forschungsergebnisse über die antiinflammatorische Wirkung von Glukokortikoiden dar.

## **2.8.2 Antihistaminika**

### **2.8.2.1 Antihistaminerge Effekte von Antihistaminika**

Histamin ist einer der wichtigsten endogenen Mediatoren der allergischen Soforttypreaktion [Ring et al 2000]. Antihistaminika unterdrücken die Wirkung des Histamins durch in der Regel reversible Rezeptorenhemmung. Die Spezifität für den H1-Rezeptor ist jedoch bei den verschiedenen Klassen der Medikamente unterschiedlich [Simons 1992]. Antihistaminika gehören neben den Glukokortikosteroiden zu den wichtigsten entzündungshemmenden Medikamenten in der Dermatologie und werden angewendet bei Erkrankungen der Haut und Schleimhäute wie chronisch idiopathischer Urtikaria (CIU), saisonaler allergischer Rhinitis (SAR), atopischer Dermatitis oder Pruritus [Fritsch 2004].

Histaminantagonisten der 1. Generation stellten sich als nur mäßig effektiv dar, zeigten schlechte Rezeptor-Selektivität und bewirkten neben anderen Nebenwirkungen (z.B. Verstopfung, Schwierigkeiten beim Wasserlassen, Husten, Übelkeit und Erbrechen, Interaktion mit Alkohol und anderen Medikamenten [Bachert 1998/2]) eine Sedierung aufgrund Penetration der Blut-Hirn-Schranke, sowie anticholinerge und lokalanästhesierende Aktivitäten. Die sedierende Wirkung dieser auch i.v. applizierbaren Antihistaminika wird heute beim atopischen Ekzem ausgenützt, um den unvermeidlichen Juckreiz erträglicher zu gestalten [Ring et al 2000, Bachert 1998/2]. Solche Medikamente der 1. Generation sind unter anderem Clemastin (Tavegil<sup>®</sup>), Dimetinden (Fenistil<sup>®</sup>) oder Ketotifen (Zaditen<sup>®</sup>).

Antihistaminika der 2. Generation zeigten eine größere Selektivität für Histamin-Rezeptoren und damit bessere Wirksamkeit, sowie verbesserte Verträglichkeit, unter anderem durch fehlende Penetration der Blut-Hirn-Schranke und damit fehlende Sedierung [Simons 1992].

Als Medikamente der 2. Generation sollen hier Cetirizin (z.B. Zyrtec<sup>®</sup>) und Loratadin (z.B. Lisino<sup>®</sup>) herausgegriffen werden. Desloratadin (z.B. Aeries<sup>®</sup>) und Levocetirizin (z.B. Xusal<sup>®</sup>) sind Metabolite ihrer Vorgängersubstanzen und werden von vielen Autoren bereits

als Antihistaminika der 3. Generation gehandelt. Allerdings werden an die diesen Namen verdienenden Therapeutika deutlich höhere Anforderungen hinsichtlich Wirksamkeit und Nebenwirkungsprofil gestellt [Bachert 2001/2].

Bachert legt in einem Editorial der Zeitschrift „Allergologie“ einige mögliche Kriterien für die 3. Generation von Antihistaminika dar. So soll nur für solche Vertreter der Histaminantagonisten diese Bezeichnung verwendet werden, die einen optimalen Nutzen für Arzt und Patient in der Anwendung versprechen. Nebenwirkungen, Interaktionen mit anderen Arzneimitteln oder Nahrungsmitteln sollen auszuschließen sein, ein erweitertes Wirkspektrum sowie anti-entzündliche Effekte werden vorausgesetzt. Als wichtigster Punkt wird die erfolgreiche Vermeidung von Folgeerkrankungen wie dem allergischen Asthma herausgestellt [Bachert 2001/2].

Da die Forschung im Verständnis des Ablaufes allergischer und entzündlicher Reaktionen immer weiter voranschreitet, liegt derzeit besonderes Augenmerk auf der Entwicklung und Erforschung von Antihistaminika, die neben der Wirkung am Histaminrezeptor noch zusätzliche antiallergische Eigenschaften aufweisen. Im Zuge dessen wäre es in der Therapie allergischer Erkrankungen denkbar, sehr breitflächig wirkenden Pharmaka wie z.B. den Glukokortikoiden spezifische Medikamente entgegenzusetzen, die weniger Nebenwirkungen aufweisen und keine Interaktionen mit den übrigen Medikamenten ausüben, die ein Allergiker oft noch anwenden muss [Ring et al 2000].

Topische H1-Antihistaminika können intranasal oder intraokulär angewendet werden. Beispiele hierfür sind Azelastin und Levocabastin. Beide weisen nur geringfügige lokale Nebenwirkungen auf und zeigen nach weniger als 30 Minuten Wirkung gegen allergische Nasen- oder Augensymptome [Bachert 2002/2]. Als einziges Lokalthapeutikum für die Haut wird bisher Dimetindenmaleat (Fenistil<sup>®</sup>) angewendet.

### **2.8.2.2 Antiinflammatorische Effekte von Antihistaminika**

Dass die Antihistaminika neben ihrer blockierenden Wirkung am Histaminrezeptor noch weitere antiallergische Eigenschaften besitzen, wurde bereits vor einigen Jahren erkannt und mit zahlreichen *in-vivo* und *in-vitro*-Studien erwiesen [Simons 1992, Lippert 1995].

H1-Rezeptor-Antagonisten penetrieren schnell in die verschiedenen Körpergewebe. Die in den Zielorganen, wie der Haut, erreichten Konzentrationen sind höher, als die im Serum [Simons 1992]. Während die Wirkstoffkonzentration bei oraler Einnahme der Antihistaminika auf Daten über Blockade des Histamin-Rezeptors beruhen, werden für das Erzielen der antiinflammatorischen Effekte der Antihistaminika oft höhere Konzentrationen benötigt [Simons 1992].

Zahlreiche Studien bekräftigen, dass neuere Antihistaminika anti-inflammatorische *in-vitro* Effekte besitzen [Redier 1992, Ciprandi 1997/2, Bagnasco 1995, Fasce 1996, Gupta 1996, Lippert 2000].

So schwächen neuere Antihistaminika, wie Cetirizin oder Azelastin, die Anziehung von Eosinophilen an den Ort der Entzündung ab [Redier 1992, Ciprandi 1997/2, Fadel 1990] oder reduzieren die Expression von ICAM-1 auf Epithelzellen am Ort der Entzündung [Bagnasco 1995, Fasce 1996, Gupta 1996]. Neuere Antihistaminika können auch die Mediatorfreisetzung abschwächen. So inhibieren sie die Histaminfreisetzung aus mit IgE-stimulierten Basophilen [Nabe 1989, Castillo 1986], oder die Synthese und Freisetzung von Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels, wie z.B. LTC<sub>4</sub> aus Mastzellen und Basophilen [Nabe 1989, Nabe 1991].

Auch die Zytokinsekretion wird durch die neueren Antihistaminika beeinflusst. So wird die Produktion von IL-2, -3, -4 und -5 durch Lymphozyten blockiert [Konno 1994], ein Hinweis auf die mögliche Fähigkeit der Antihistaminika, die Produktion von Th2-Typ-Zytokinen zu behindern. Cetirizin blockiert die MCP-1 und RANTES-Produktion durch IFN- $\gamma$  stimulierte Keratinozyten [Albanesi 1998/1].

Zusammengefasst lassen sich die antiinflammatorischen Effekte der Typ-2-Antihistaminika wie folgt darstellen: Sie bewirken eine Herunterregulierung der Mediatorenfreisetzung, der ICAM-1-Expression auf Eosinophilen und Epithelzellen [Redier 1992, Miki 1996, Ciprandi 1996], der Superoxid-Generation, der Chemotaxis und der Zytokin-Expression [Hayashi 1999].

Tabelle I im Anhang (Seite II) gibt eine Übersicht über ausgewählte antiinflammatorische Effekte von Antihistaminika der 2. Generation.



### 2.8.3 Loratadin, ein Antihistaminikum der 2. Generation und sein Wirkprofil

#### Pharmakologische Daten im Vergleich zu Desloratadin

Loratadin (z.B. Claritin<sup>®</sup>, Lisino<sup>®</sup>) wird den Antihistaminika der 2. Generation zugerechnet. Es ist ein lang wirkendes Antihistaminikum, das eine selektive, am peripheren H<sub>1</sub>-Rezeptor antagonisierende Wirkung aufweist. Es zeigt nur geringe sedative und anticholinerge Nebenwirkungen, da die Blut-Hirn-Schranke nicht überschritten wird. Die Dosierung beträgt im Gegensatz zu Desloratadin (hier 5 mg/Tag) 10 mg/Tag. Nach oraler Gabe in Tablettenform wird die Substanz schnell absorbiert und erreicht seine maximale Konzentration im Blut innerhalb von 1,3 Stunden (Desloratadin: 2,5 Stunden). Durch gleichzeitige Nahrungsaufnahme wird die systemische Bioverfügbarkeit des Arzneimittels um 40% (Desloratadin: 15%) gesteigert. Hierbei wurde die maximale Plasmakonzentration des Medikaments erst eine Stunde später erreicht. Loratadin wird in der Leber mittels verschiedener Cytochrome P450 zum wasserlöslichen Descarboethoxyloratadin metabolisiert. Gleichzeitige Gabe von Ketoconazol, Erythromycin oder Cimetidin (alle Antagonisten an den verstoffwechselnden Enzymen) erhöht die Plasmakonzentration von Loratadin. Die mittlere Eliminations-Halbwertszeit beträgt für Loratadin 8,4 Stunden (Desloratadin 28 Stunden). Während sich bei Kindern kaum ein Unterschied in der systemischen Bioverfügbarkeit und der maximalen Plasmakonzentration verglichen mit Erwachsenen zeigt, ist bei alten Patienten beides um rund 50% erhöht. Bei Desloratadin zeigten sich kaum Unterschiede zwischen jüngeren und älteren Probanden hinsichtlich der Pharmakokinetik, weshalb keine Dosisanpassung nötig ist [Affrime 2002/2, Clarinex Product Information]. Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz stiegen systemische Bioverfügbarkeit (AUC) und maximale Plasmakonzentration (C<sub>max</sub>) bei Loratadin um etwa 73% an (Desloratadin: 120%). Die mittlere Eliminationshalbwertszeit ( $t_{E1/2}$ ) zeigte keine Unterschiede im Vergleich zu gesunden Personen. Bei Patienten mit chronischer alkoholischer Lebererkrankung verdoppelten sich AUC und C<sub>max</sub> bei Loratadin (Desloratadin: kein Unterschied zu gesunden Kontrollpersonen). Die  $t_{E1/2}$  war verlängert und stieg mit Schwere der Erkrankung an. In klinischen Studien zeigte sich Loratadin dem Placebo überlegen und gleichwertig den Kontrollantihistaminika,

dies vor allem bezogen auf Symptome der saisonalen allergischen Rhinitis (SAR) und der chronischen idiopathischen Urtikaria (CIU). Die QT-Zeit im EKG wurde durch Loratadin nicht signifikant verlängert - bei anderen Antihistaminika der 2. Generation (z.B. Terfenadin oder Astemizol) waren lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen aufgetreten [Karow 2000, Claritin Product Information, Kemp 1987, Skassa-Brociek 1988, Paul 1988, Bernstein 1988]

Die antihistaminergen und antiinflammatorischen Wirkungen von Loratadin sind bereits gut erforscht. Wie Desloratadin inhibiert Loratadin die immunologische Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren [Kreutner 1987, Letari 1994, Temple 1988, Bousquet 1988]. So bewirkt es eine Mastzell-Stabilisierung, indem es die Freisetzung von Leukotrienen und Histamin aus der menschlichen Lunge [Temple 1988] und aus MC9-Zellen, einer murinen Mastzelllinie blockiert [Kreutner 1987]. Zusätzlich zu seiner Fähigkeit der H1-Rezeptor-Blockade, blockiert Loratadin die Freisetzung von Histamin aus humanen Basophilen [Miadonna 1994]. Es schwächt die PAF-induzierte Eosinophilen-Chemotaxis und deren  $O_2$ -Generation ab [Eda 1993]. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass Loratadin anti-anaphylaktische Eigenschaften aufweist. Hierbei blockierte es die allergische bronchiale Anaphylaxie bei Meerschweinchen und Ratten [Kreutner 1987]. *In-vivo* Studien bestätigen, dass Loratadin die Histamin- und Prostaglandin  $D_2$ -Freisetzung in der Nasensekretion bei der allergischen Rhinitis abschwächte [Bousquet 1988, Andersson 1991]. Eine einwöchige Einnahme ging der Stimulation hierbei voraus. Loratadin inhibiert ebenso die histaminerge Aktivierung von nasalen Epithelzellen [Vignola 1995].

Die Tabellen IV und V im Anhang (Seite V/VI) geben eine Übersicht über bereits erforschte antiinflammatorische Wirkungen von Loratadin.

#### **2.8.4 Desloratadin, Nachfolgesubstanz von Loratadin und sein Wirkprofil**

Bei Desloratadin (DCL = Descarboethoxyloratadin) (z.B. Aerius<sup>®</sup>, Clarinex<sup>®</sup>) handelt es sich um einen neuen, selektiven H1-Rezeptor-Antagonisten, den ersten wirksamen Metaboliten des Antihistaminikums Loratadin. Etliche neue Errungenschaften dieses Medika-

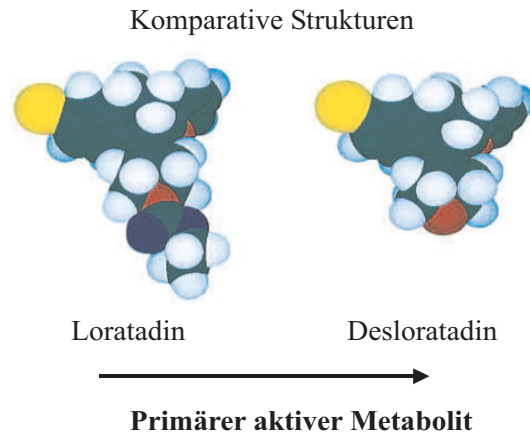


Abbildung 2.1: Loratadin und sein aktiver Metabolit Desloratadin

mentes lassen die Bezeichnung Antihistaminikum der 3. Generation zu [Bachert 2001/2, Bachert 2002/1]. Vor allem seine verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften erlauben diese Zuordnung.

Wie Loratadin ist Desloratadin ein potenter H<sub>1</sub>-Histamin-Antagonist, von dem eine 10 bis 20 mal höhere Affinität zum H<sub>1</sub>-Rezeptor ( $IC_{50}=721$  nM versus  $IC_{50}=51$  nM) [Handley 1997], sowie eine bedeutend längere Halbwertszeit nachgewiesen ist, als bei seinem Vorgänger Loratadin [Raif 2001]. Desloratadin zeigt eine ausgeprägte Rezeptorspezifität und eine günstig lange Verweildauer am H<sub>1</sub>-Rezeptor. Seine antihistaminerge Wirkung ist stärker als die anderer Antihistaminika, hervorzuheben ist hierbei insbesondere die gute Wirksamkeit auch gegen nasale Obstruktion, die in dieser Form bei keinem anderem Antihistaminikum zu erreichen ist. Darüber hinaus reduziert DCL die nasale Sekretion und Exsudation von bioaktiven Molekülen aus dem Plasma [Greiff 2002]. Auch die asthmatischen Begleiterscheinungen der saisonalen allergischen Rhinitis werden gelindert, ebenso der Juckreiz und die Häufigkeit der Eruptionen bei chronisch idiopathischer Urtikaria [McClellan 2001, Ring 2001/1]. Das Profil der Nebenwirkungen des Medikaments ist stark reduziert. So treten unter der Behandlung mit Desloratadin keine sedierenden oder anticholinergen Nebenwirkungen auf, es findet keine Hemmung der Cytochrom P450-Isoenzyme statt, und es werden auch keine statistisch signifikanten Änderungen von EKG-Parametern oder klinisch relevante kardiale Nebenwirkungen beschrieben. Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, Nahrungsmitteln oder Alkohol werden nicht beobachtet, die Verträglichkeit des Arzneimittels wird als gut

beschrieben. Da das Medikament nahezu ausgeglichen über Niere und Faeces ausgeschieden wird, ist keine Dosisanpassung bei Leber- oder Niereninsuffizienz vonnöten [Bachert 2002/1]. Auch anti-inflammatorische Fähigkeiten von Desloratadin werden zunehmend erforscht.

#### **2.8.4.1 *In-vitro*-Forschungsansätze mit Desloratadin**

##### Untersuchungen an basophilen Granulozyten und Mastzellen

Von Desloratadin (DCL) ist bisher bekannt, daß es sowohl die IgE- als auch nicht-IgE-medierte Histaminfreisetzung durch humane basophile Granulozyten dosisabhängig zu Inhibieren im Stande ist. Interessanterweise verursachten höhere Konzentrationen von DCL ( $10^{-4}$ M/l) bei allen Testpersonen eine Histaminfreisetzung, was die inhibitorischen Effekte des Medikaments zunichte machte [Kleine-Tebbe 1994].

In einer Studie aus dem Jahre 1995 wurden humane Mastzellen und Basophile mit PMA und Ca-Ionophore A23187 stimuliert und hinsichtlich der konsekutiven Freisetzung der Zytokine IL-6 und IL-8 getestet. DCL ( $10^{-5}$ - $10^{-14}$ M) und Dexamethason ( $10^{-6}$ - $10^{-11}$ M) wurden entweder eine Stunde zuvor, oder gleichzeitig mit den Stimulantien dazugegeben. Bei Präinkubation zeigte sich eine dosisabhängige Herunterregulierung der Freisetzung von IL-6 um bis zu 40%, und von IL-8 um bis zu 50% durch DCL. Dexamethason inhibierte beide Zytokine bei Präinkubation um bis zu 80%, bei gleichzeitiger Zugabe nur um bis zu 60% [Lippert 1995].

In einer weiteren Studie aus dem Jahr 1997 wurden humane FcεRI<sup>+</sup> Zellen (hier Basophile) aus peripherem Blut, der Haut und Lungengewebe mittels Der p1 Antigen oder anti-FcεRI<sup>+</sup> stimuliert, und hinsichtlich der Freisetzung von Histamin und Tryptase, sowie LTC<sub>4</sub> und PGD<sub>2</sub> getestet. Nach Präinkubation von 15 Minuten verminderten Loratadin (LOR) und DCL ( $3 \times 10^{-6}$ - $10^{-4}$ ) die Freisetzung von Histamin und LTC<sub>4</sub> aus den Blut-Basophilen dosisabhängig um 5-40%. Auch in Lungengewebe und Haut konnte die Mediatorenkonzentration durch DCL und LOR gesenkt werden [Genovese 1997].

In einer Studie aus dem Jahr 2000 wurde der Effekt verschiedener Antihistaminika auf humane leukämische Mastzellen und Basophile untersucht. Die hierbei untersuchten Zytokine waren TNF-α, IL-3, IL-6, IL-8 und GM-CSF. Die Zellen wurden 24 Stunden lang mit Phor-

bol Myristat Acetat (25 ng/ml), sowie Calcium Ionophor A 23187 ( $2.5 \times 10^{-7}$ M) alleine, bzw. zusammen mit den Antihistaminika ( $10^{-4}$ - $10^{-15}$ ) stimuliert. Die inhibitorische Wirkung der H1-Blocker auf Mastzellen erwies sich am stärksten bei TNF- $\alpha$ , gefolgt von IL-8, IL-6 und IL-3. Es zeigten sich keine signifikanten Effekte auf GM-CSF. Durch DCL zeigte sich eine dosisabhängige Inhibition von TNF- $\alpha$  mit einem Maximum bei  $10^{-9}$ M. Bei den Basophilen ließ sich die IL-6-Produktion stärker hemmen, als die IL-8-Produktion. Interessanterweise ließ sich die Hemmung der Zytokinproduktion auf mRNA-Ebene bei den Basophilen nur bei IL-8, bei den Mastzellen überhaupt nicht bestätigen [Lippert 2000].

2000 wurde eine Studie veröffentlicht, die zeigte, daß DCL 6-7mal stärker in der Lage war, die Sekretion von IL-4 und IL-13 aus humanen Basophilen zu inhibieren, als die Freisetzung von Histamin und LTC<sub>4</sub>. Hierbei fand eine Präinkubation mit DCL über 15 Minuten statt, danach wurden die Zellen mit anti-IgE Antikörper, Calcium Ionophor, IL-3 oder Phorbol-lester stimuliert. Die Histamin-, LTC<sub>4</sub>- und IL-4-Freisetzung wurde jeweils nach 4 Stunden gemessen, die Freisetzung von IL-13 nach 20 Stunden. Hier konnte eine Inhibierung der IL-4 mRNA Bildung um bis zu 80% erzielt werden [Schroeder 2001]. Damit greift Desloratadin an zahlreichen Stellen in die allergische Entzündungsreaktion, sowohl in der Frühphase (Wirkung auf Mediatoren und Zytokine), als auch in der durch Zellinfiltration charakterisierten Spätphase (Inhibierung von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, Chemotaxis) ein [Van Cauwenberge 2002].

### Untersuchungen an Epithelzellen

1995 wurde erstmals der Effekt von DCL und LOR auf nasale Epithelzellen untersucht. Es zeigte sich, daß beide Antihistaminika ( $10^{-6}\text{M}$ ) in der Lage waren, die durch Histamin induzierte Hochregulierung von ICAM-1 und HLA-DR signifikant zu blockieren [Vignola 1995]. 2001 wurde der Effekt von DCL und LOR auf die durch Rhinoviren induzierte Hochregulierung von ICAM-1 auf Epithelzellen des Respirationstraktes untersucht. Nach einer Vorinkubation mit den Antihistaminika über 16 Stunden wurden die Epithelzellen mit dem Rhinovirus Typ 16 über 8 Stunden infiziert. Es zeigte sich, daß DCL und LOR ( $10^{-5}$ - $10^{-7}\text{M/l}$ ) die Hochregulierung von ICAM-1 dosisabhängig verhinderten. Zwischen den beiden Antihistaminika zeigten sich dabei keine Unterschiede. Auch die ICAM-1 mRNA Induktion ließ sich dosisabhängig inhibieren [Papi 2001].

### Untersuchungen an Endothelzellen

Studien aus dem Jahr 1997 belegen einen inhibitorischen Effekt von LOR und DCL auf Endothelzellen humaner Umbilikalvenen, die mit Histamin stimuliert wurden [Molet 1997]. Hierbei zeigte sich, daß LOR und DCL in gleicher Weise die Expression von P-Selektin auf der Endotheloberfläche inhibierten. Durch DCL ( $2,6 \times 10^{-12}\text{M}$ ) wurde eine 50%ige Inhibierung von IL-6 erreicht, LOR gelang dies nur in höherer Konzentration ( $0,3 \times 10^{-6}\text{M}$ ). Auch für die Inhibierung der IL-8 Freisetzung wurden höhere Konzentrationen von LOR als von DCL benötigt.

#### **2.8.4.2 *In-vivo*-Forschungsansätze mit Desloratadin**

### Untersuchungen zur chronischen idiopathischen Urtikaria

Den Juckreiz und weitere Symptome der chronischen idiopathischen Urtikaria betreffend, stellte sich DCL (5 mg/Tag) in einer im Jahr 2001 durchgeführten Studie dem Placebo als deutlich überlegen dar [Ring 2001/1]. Diese Ergebnisse wurden in einer weiteren Studie im Jahre 2003 bestätigt [Monroe 2003].

### Untersuchungen zur saisonalen allergischen Rhinitis (SAR)

In einer Studie aus dem Jahr 2002 wurde gezeigt, daß DCL verglichen mit einem Placebo bei Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis (SAR) signifikant die nasale Obstruktion, sowie andere Symptome der SAR reduzierte [Horak 2002].

Eine weitere Studie aus demselben Jahr untersuchte den Einfluß von DCL und Pseudoephedrin, sowohl als Kombinationstherapie als auch alleine, auf Auswirkungen auf die nasale Obstruktion. Hierbei zeigte sich, daß die Kombinationstherapie DCL/Pseudoephedrin, verglichen mit der Monotherapie, eine spürbare Reduktion der nasalen Symptomatik verzeichnen konnte. Zwischen DCL und Pseudoephedrin ergaben sich hinsichtlich ihrer jeweiligen antiobstruktiven Wirkung keine Unterschiede. Der Autor postulierte einen zusätzlichen Gewinn an Lebensqualität durch die Kombinationstherapie [Schenkel 2002].

Auch wurde eine signifikante Wirkung von DCL über eine Dauer von 24 Stunden bei der Therapie der SAR nachgewiesen, wobei 5 mg/Tag die Tagesdosierung mit dem besten therapeutischen Profil zu sein scheint [Salmun 2002].

### Untersuchungen zum allergischen Asthma bronchiale

2003 wurde herausgefunden, daß DCL Th2-Antworten inhibiert, ebenso die Induktion von allergischer pulmonaler Entzündung und bronchialer Hyperreagibilität. Eine Gabe des Antihistaminikums in Zeiten erhöhter Allergenexposition könnte somit ein Fortschreiten der Erkrankung bei Patienten mit allergischen Atemwegserkrankungen aufhalten [Bryce 2003].

Als unerwünschte Nebenwirkung wurde ein anticholinerges Effekt von Desloratadin auf glatte Muskelzellen im Tierexperiment berichtet, der bei topischer Anwendung bei allergischer Rhinitis zu unerwünschter, langandauernder Mydriasis und Mundtrockenheit führen kann [Cardelus 1999].

Ausführliche Tabellen über bereits durchgeführte *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen mit Desloratadin finden sich im Anhang (Tabellen II/III auf Seite III/IV).

# Kapitel 3

## Problemstellung

Es gibt bereits zahlreiche Hinweise auf antiinflammatorische Effekte des Antihistaminikums Desloratadin *in-vitro* [Kleine-Tebbe 1994, Berthon 1994, Vignola 1995, Lippert 1995, Molet 1997, Genovese 1997, Lippert 2000, Papi 2001, Schroeder 2001, Greiff 2002, Bryce 2003, Zhao 2004, Kowalski 2005].

So wurde die *in-vitro* Wirkung von Desloratadin auf Zellen der Nasenschleimhaut, die bei der allergischen Rhinitis betroffen sind, bereits erforscht [Vignola 1995, Papi 2001, Greiff 2002, Kowalski 2005]. Für diese Erkrankung wird das Antihistaminikum heute als systemische Therapie eingesetzt.

Auch zahlreiche *in-vivo* Forschungsergebnisse wurden bereits veröffentlicht. Bei Patienten mit saisonaler oder intermittierender allergischer Rhinitis wurde zum Beispiel ein Rückgang der Symptome, wie der nasalen Obstruktion oder auch der Rhinorrhoe beschrieben [Bachert 2001/1, Baena-Cagnani 2001, Nayak 2001, Wilson 2002, Horak 2002, Greiff 2002, Salmun 2002, Schenkel 2002].

Auch Asthmasymptomatik konnte gemindert werden [Baena-Cagnani 2001, Lee 2003].

Bei der akuten Urtikaria als Beispiel für eine allergische Hauterkrankung wird Desloratadin heute ebenfalls verschrieben [Ring 2001/1, Ring 2001/2, Denham 2003, Monroe 2003].

Der antiinflammatorische Einfluss von Desloratadin auf humane Keratinozyten hingegen



wurde bisher noch nicht untersucht.

Keratinozyten spielen sowohl als Effektor- als auch als Zielzellen eine wichtige Rolle. Als Effektorzellen produzieren sie Zytokine und Chemokine. Darüber hinaus stellen sie ein wichtiges Ziel von zytotoxischen T-Zellen dar. Die Erforschung der Wirkung von Antihistaminika auf Keratinozyten ist ein wichtiger Aspekt, um im Verständnis der molekularbiologischen Wirkungsweisen von Allergien einen Schritt weiter auf adäquate Therapiemöglichkeiten zuzugehen.

Es liegen bereits zahlreiche Daten über die Zytokinexpression und -sekretion von Keratinozyten während eines entzündlichen Prozesses vor [Nickel 1999, Albanesi 1999, Albanesi 2000, Wakugawa 2001, Kohda 2002, Klunker 2003], und auch einige wenige über die Rolle, die Antihistaminika bei der Suppression dieser Zytokine spielen [Albanesi 1998/1].

Es existieren jedoch noch keine Daten über den Einfluss von Loratadin und Desloratadin auf die Chemokinsekretion stimulierter Keratinozyten. Auch die Wirkung der Antihistaminika auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen durch die Epidermalzellen liegt noch im Dunkeln.

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der antiallergischen Wirkungen der Antihistaminika Desloratadin und Loratadin auf durch einen inflammatorischen Reiz stimulierte Keratinozyten. Hierbei soll nicht die antihistaminerge Wirkung der Antiallergika berücksichtigt werden, sondern vielmehr die antiinflammatorische. Dies wird in einem *in-vitro*-Modell der kutanen Inflammation gezeigt.

Diese Informationen sind wichtig für ein detaillierteres Verständnis des Stellenwerts von Keratinozyten während pathologischer Vorgänge, sowie für einen spezifischeren Einsatz der vorhandenen Therapeutika.

In diesem Zusammenhang inkubierten wir primäre humane Keratinozyten über vier Stunden mit Desloratadin, Loratadin oder Hydrocortison und stimulierten daraufhin mit dem proinflammatorisch wirkenden IFN- $\gamma$ . Nach unterschiedlichen Stimulationszeiten wurden die Zellen auf eventuelle antiinflammatorische Effekte von Desloratadin und Loratadin untersucht. Dies geschah anhand der Parameter Oberflächenexpression von Zelladhäsionsmolekülen (ICAM-1, HLA-ABC, HLA-DR), sowie Freisetzung von Mediatoren (CCL5, CXCL8, CXCL10, CCL17). Zell-Zell-Interaktionen, das heißt die chemotaktische Wanderung

neutrophiler und eosinophiler Granulozyten auf Keratinozyten-Überstände wurden ebenfalls untersucht. Eventuelle Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene sollten durch Analyse der Keratinozyten-RNA mittels PCR-Analyse näher beleuchtet werden.

Sollten sich in den Versuchsreihen antientzündliche Effekte auf zellulärer Ebene nachweisen lassen, so könnte dies für eine mögliche Bedeutung dieser Substanzen in der Behandlung allergischer Hautkrankheiten sprechen. Als neuer Therapieansatz könnte zum Beispiel an eine topische Anwendung der Antihistaminika auf der Haut gedacht werden.

# Kapitel 4

## Material und Methoden

### 4.1 Probanden

Die im Migrationsassay eingesetzten neutrophilen und eosinophilen Granulozyten wurden von gesunden, das heißt nicht atopisch erkrankten freiwilligen Probanden (n=11) beiderlei Geschlechts und unterschiedlicher Altersstufen gewonnen. Diese wiesen anamnestisch keinerlei Hinweise auf eine Allergie auf. RAST- und Prick-Tests der Haut auf 15 allgemein vorkommende Allergene, unter anderem Birken- und Gräserpollen, waren negativ und das totale IgE betrug weniger als 20 IU/ml. Bei keinem der Probanden fanden sich Hinweise auf das Vorliegen einer atopischen Diathese. Hierfür wurde die Definition des Begriffs Atopie nach Ring [Ring 2004] herangezogen. Darüber hinaus galten für alle Probanden die Ausschlußkriterien Nikotinabusus, das Vorliegen eines akuten Infektes oder auch die Einnahme von antiallergischen Medikamenten, wie Antihistaminika, im Zeitraum von einer Woche vor der Blutabnahme [Traidl-Hoffmann 2002]. Die Keratinozyten entstammten menschlichen Vorhäuten. Alle Studienmethoden wurden durch die Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer München genehmigt. Von allen Teilnehmern lag vor Beginn der Untersuchung eine schriftliche und umfassende Einverständniserklärung vor.

## 4.2 Material

### 4.2.1 Antihistaminika

Desloratadin	Schering-Plough, Schering Corporation, Kenilworth, USA
Loratadin	Schering-Plough, Schering Corporation, Kenilworth, USA
Hydrocortison	Biowhittaker, Walkersville, USA

### 4.2.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte

#### Chemikalien:

KGM-Medium(+/-Hydrocortison)	Clonetics, Walkersville, USA
Penicillin/Streptomycin(100ml)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Dulbecco´s PBS (+/-Ca/Mg)	Invitrogen, Gibco, Paisley, Scotland, UK
IFN- $\gamma$ , humanes rekombinantes	Genzyme, Cambridge, MA, USA
Trypanblau	Sigma Diagnostics, St.Louis, USA
Trypsin-EDTA(1x)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland (D)
FITC mouse IgG2a	BD Biosciences, PharMingen, San Diego, USA
FITC mouse anti-h-ICAM	R&D Systems, Minneapolis, USA
FITC labeled anti-human HLA-DR	BD Biosciences, PharMingen, San Diego, USA
FITC anti-human HLA-A,B,C	BD Biosciences, PharMingen, San Diego, USA
FACS-Puffer	500 ml D-PBS w/o Ca/Mg + 0,02%NaZitrat + 5%FCS
Natriumzitrat	Merck, Darmstadt, D
FCS(Fetales Kälberserum)	Perbio, Bonn, D
OptEIA Set Human IL-8	BD Biosciences, PharMingen, San Diego, USA
OptEIA Set Human IP-10	BD Biosciences, PharMingen, San Diego, USA
DuoSet humanTARC	R&D Systems, Minneapolis, USA
DuoSet human RANTES	R&D Systems, Minneapolis, USA
Tween 20	Calbiochem, EMD biosciences, Inc.,

Histopaque-1077	Merck KG, Darmstadt, D
Histopaque-1119	Sigma Diagnostics, Deisenhofen, D
RPMI 1640	Sigma Diagnostics, Deisenhofen, D
Anti-CD16 mAb microbeads	Life Technologies, Chagrin Falls, USA
MACS-Puffer	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
peqGOLD RNAPure-Puffer	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
Ethidiumbromid	peqlab, Erlangen, D
Ethanol absolut	Sigma Diagnostics, St.Louis, USA
Aqua ad iniectabilia	Merck, Darmstadt, D
DEPC Treated Water(RNase frei)	Delta Select GmbH, Pfullingen, D
Chloroform	Invitrogen, Carlsbad, USA
Isopropanol	Sigma, St.Louis, USA
RNase ZAP	Merck, Darmstadt, D
First strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Sigma-Aldrich Co., St.Louis, USA
RNase Inhibitor 2000 U	Roche, Alameda, California, USA
Reverse Transkriptase, AMV 500 U	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Taq Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Agarose	Finnzymes OY, Espoo, Finnland
TBE-Puffer (10x)(Tris-Borat-EDTA-Puffer)	Sigma Chemical Co., St.Louis, USA
	108 g Trizma Base + 55 g Borsäure 99%, Sigma, St.Louis, USA
	+ 4 ml 0,5 M EDTA (pH=0,5), Merck, Darmstadt, D
	(100 ml 10x Stock + 400 ml aqua dest = 1,0xTBE)
Nucleic Acid Sample Loading Buffer (5x)	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Hyper Ladder Bioline (Nr.IV)	Bioline GmbH, Luckenwalde, D
Synthetische Oligonukleotide	Invitrogen, Paisley, Scotland, UK

Verbrauchsmaterial:

Multiwell 6 well	Becton Dickinson, St.Louis, USA
Cellstar Pipetten (1ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Pasteur-Pipetten	Brand, Wertheim, D
Eppendorf-Pipettenspitzen	eppendorf research, Hamburg, D
Gilson-Pipettenspitzen	Gilson, Inc., Middleton, USA
Safeskin, Satin Plus Gloves	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Falcon Polypropylen-Tubes (15ml/50ml)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Sarstedt- Mikro-Schraubröhre 2ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Nunc Cryo-Tubes	Nunc GmbH + Co KG, Wiesbaden, D
Eppendorf-Tubes	eppendorf research, Hamburg, D
Cell Scraper, 2 cm	Nunc GmbH + Co KG, Wiesbaden, D
96 well Plates	Nunc GmbH + Co KG, Wiesbaden, D
Polystyrene Round Bottom Tube 5ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Cluster Tubes 1,2 ml	Abgene, Ebson, Surrey, UK
Parafilm MLaboratory Film	American National Can, Chicago, USA
Mikrotiterplatten für ELISA (flachbödig)	MaxiSorp, Nunc, Roskilde, Dänemark
Transwell-Plates	Costar, NY, USA
Einschweißfolien	stericlin, VP GmbH, Feuchtwangen, D
ART Self-Sealing Barrier Tips	Molecular Bio Products, San Diego, California, USA
PCR-Tubes (0,2 $\mu$ l)	eppendorf research, Hamburg, D
Gel-Kämme	Bio Rad, Hercules, USA
Transwell-Chambers	Corning Costar, Cambridge, USA
EDTA-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht, D

Geräte:

FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Sicherheitswerkbank (Typ HSP 18)	Hera Safe, Kendro, Hanau, D
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, D
Begasungsbrutschrank (Typ Hera cell)	Hera Cell, Kendro, Hanau, D
Absaugereinrichtung (Typ CVC 2000)	Vacuubrand, Wertheim, D
Neubauer-Zählkammer	Assistent, Sondheim, D
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss, Oberkochen, D
Durchlauf-Siegelgerät	hawo Gerätebau GmbH, Obrigheim, D
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf Research, Hamburg, D
Gilson-Pipetten	abimed, Langenfeld, Frankreich
Spektrophotometer (Typ DU 640)	Beckmann Instruments, Fullerton, USA
Vortexer (Typ G-560 E/Genie 2)	Scientific Industries, New York, USA
pH-Meter	Ino Lab WTW, Semat International, St.Albans, UK
Pipettierhilfe (Pipetboy acu)	IBS, Integra biosciences, Chur, Schweiz
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R, Kendro, Hanau, D
Tischzentrifuge	Tischzentrifuge 1-15, Sigma, Osterode am Harz, D
Kühlzentrifuge	Megafuge 1.0 R, Kendro, Hanau, D
Kühlschrank (-20°C)	Liebherr-Comfort, Bulle, Schweiz
Tiefkühlschrank (-80°C)	Kendro, Hanau, D
Eisflockenbereiter (Typ ZBE 30/10)	Ziegra-Eis-Maschinen, Isernhagen, D
Stickstofflagertank für Zellen	Typ Arpege 140, Air liquide GmbH, Düsseldorf, D
Tischzentrifuge (-4°C)	Biofuge Pico, Kendro, Hanau, D
Multichannel-Pipette	Eppendorf Research, Hamburg, D
ELISA-Gerät	Revelation MRX TC, Thermo, Engelsbach, D
Magnetischer Zellsorter (MACS)	Typ Vario MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D

PCR-Express Thermal Cycler	Hybaid, Ashford, GB
Elektrophorese-Gerät	Bio Rad, Hercules, USA
Elektrophorese-Auswert-Computer	Bio Rad, Hercules, USA
Software	Quantity One, Bio Rad, Hercules, USA
Analysenwaage	Research RC210P, Sartorius, Göttingen, D
bondEx EtBr (Ethidiumbromid-Entsorgung)	Macherey-Nagel, Düren, D
Vertikalautoklav	Varioklav Typ 500 ECH+P Labortechnik, Oberschleissheim, D
Reinstwasseranlage	Typ Purelab plus, USF Elga, Siershahn, D
Gelkammern	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA
Gelelektrophorese-Computer	Bio Rad Laboratories, Hercules, USA

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 Kultivierung humaner primärer Keratinozyten (PK)

Die Keratinozyten wurden aus menschlichen Vorhäuten gewonnen. Nach Trennung der Epidermis von der Dermis mittels Dispase wurden mit Hilfe von Trypsin (Invitrogen, Paisley, Schottland) Zellsuspensionen aus den epidermalen Schichten gewonnen, wie bereits zuvor beschrieben [Traidl 2000]. Die epidermalen Zellen ( $1.2-2 \times 10^4$  pro  $\text{cm}^2$ ) wurden auf einen Nährboden, bestehend aus bestrahlten 3T3 Fibroblasten ( $2 \times 10^4$  pro  $\text{cm}^2$ ) ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in einem modifizierten Greens-Medium, bestehend aus DMEM/Hams F12 Medium (3:1v/v) (Biochrom KG, Berlin, D), zu dem 10% FBS, 180 mM Adenin, 5 mg/ml Insulin, 5 mg/ml Apotransferrin, 0,1 nM Choleratoxin, 2 nM Triiodthyronin, 10 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor (alle Sigma, St. Louis, USA), 4 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin (alle Biochrom KG, Berlin, D), dazugegeben wurden. Bei 70-80%-iger Konfluenz wurden die Keratinozyten mit 0,05% Trypsin 0,02% EDTA (Sigma, Deisenhofen, D) abgelöst, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. In allen Experimenten wurden Keratinozyten der 2. oder 3. Passage eingesetzt.



Alle Zellen wurden vor Stimulationsbeginn über 3-5 Tage kultiviert. Die kryokonservierten Keratinozyten wurden hierzu kurz im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Unter sterilen Bedingungen wurde die Keratinozyten-Suspension in ein Falcon-Röhrchen mit 10 ml KGM + Hydrocortison (Clonetics, Walkersville, USA) überführt (KGM = 500 ml KBM + 500 µl Hydrocortison, 2 ml BPE (bovine pituitary extract), 0,5 ml GA-1000 (Gentamycin), 0,5 ml hEGF, 0,5 ml Insulin, 100 ml Pen/Strep), und daraufhin 10 min bei 1200 rcf (Megafuge 1.0 R von Kendro, Hanau, D) und einer Temperatur von 20°C mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die pelletierten Zellen wiederum in 10 ml KGM + Hydrocortison aufgenommen. Nach gründlicher Resuspendierung wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und mit 10 µl Trypanblau vermischt (1:2 - Verdünnung). Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss, Oberkochen, D) bestimmt (Verdünnungsfaktor der Zählkammer: 1: 10.000). Anschließend erfolgte das Aussäen der Keratinozyten in einer Konzentration von 10<sup>4</sup> Zellen in zwei Sechs-Loch-Platten (6-Well-Platten, Becton Dickinson, St.Louis, USA), in die 3 ml KGM+Hydrocortison vorgelegt wurde. Die Anzucht erfolgte im Brutschrank (Typ Hera Cell, Kendro, Hanau, D) bei 5%iger CO<sub>2</sub>-Begasung und einer Temperatur von 37°C. Nach 24-stündiger Inkubationszeit erfolgte ein Mediumwechsel. Nach drei Tagen im Brutschrank zeigten die Zellen eine rund 60%ige Adhärenz und waren bereit zur Weiterverarbeitung.

### **4.3.2 Präinkubation von Primärkeratinozyten mit den Antihistaminika / Hydrocortison und Stimulation mit IFN- $\gamma$**

Vorausgehende Forschungsarbeiten mit Mastzellen zeigten, dass eine signifikante Inhibierung der Zytokine nach einer Präinkubationszeit der Keratinozyten mit den Medikamenten von einer Stunde stattfand, und dass der inhibitorische Effekt prägnanter war, als bei zeitgleicher oder nachträglicher Zugabe der Therapeutika [Lippert 2000]. Für unseren Versuchsansatz wählten wir eine Präinkubationszeit von 4 Stunden vor Zugabe von IFN- $\gamma$ .

Desloratadin und Loratadin (Schering, Kenilworth, USA) wurden bis zur endgültigen Verarbeitung in Pulverform bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Vor Zugabe zu den Zellen

wurde es in Medium auf Konzentrationen von  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  oder  $10^{-5}$  M verdünnt. Hydrocortison (Biowhittaker, Walkersville, USA) wurde in Medium auf Konzentrationen von  $10^{-5}$  und  $10^{-4}$  M verdünnt. Diese Konzentrationen gelten für alle Versuchsreihen mit Ausnahme der Versuchsansätze, in denen die Ausschüttung von Chemokinen in den Überständen von stimulierten PK mittels ELISA untersucht wurden. Hierfür wurden für Desloratadin und Loratadin Konzentrationen von  $10^{-6}$  -  $10^{-4}$  M eingesetzt. Stimuliert wurde über 24 und 48 Stunden. Hydrocortison wurde im ELISA-Assay in den oben angegebenen Konzentrationen ( $10^{-5}$  und  $10^{-4}$  M) eingesetzt, die Stimulationszeiten betragen wie in den übrigen Ansätzen 16, 22 und 45 Stunden.

Bei einer Adhärenz von rund 60% wurden die Zellen in 6-Loch-Platten über vier Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison präinkubiert. Es folgte eine 16, 22 oder 45-stündige Stimulation mit IFN- $\gamma$  (300 U/ml) (R+D Systems, Minneapolis, USA). Die Kontrollzellen wurden mit IFN- $\gamma$  ohne Exposition zu einem der getesteten Therapeutika stimuliert. Eine andere Zellgruppe wurde weder mit Therapeutika präinkubiert, noch einer Stimulation unterzogen (nur Medium). Eine weitere Zellgruppe wurde über die gesamte Stimulationszeit nur mit Desloratadin ( $c=10^{-5}$ M) behandelt.

Vor der Stimulation der PK mit IFN- $\gamma$  wurde eine Desloratadin-Lösung hergestellt (Molekulargewicht Desloratadin: 310,8). Als Vorratslösung (=Stocklösung) wurde eine  $4.8 \times 10^{-2}$  molare Lösung hergestellt, die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurde. Das KGM-Medium wurde für die Stimulation ohne Hydrocortison angesetzt, da Hydrocortison noch als Kontrollsubstanz auf seine antiinflammatorischen Eigenschaften getestet wurde. Das Molekulargewicht Loratadins beträgt 382,89 mg/ml. Hydrocortison mit dem Molekulargewicht von 362,5 mg/ml wurde auf einen Grund-Stock von  $1 \times 10^{-3}$  M gebracht. Für die IFN- $\gamma$  - Verdünnungen wurde der vorhandene 10  $\mu\text{l}$  - Stock (Konzentration: 1.000 000 U/ml) 1:100 verdünnt. Die für die Stimulation benötigte Konzentration von 300 U/ml wurde berechnet. Die Überstände der adhärenzten Zellen wurden für die Stimulation mittels Pasteurpipette abgesaugt, und die Zellen mit 2 ml PBS je Well gewaschen. Auf die Mediumkontrollen wurden 3 ml KGM (ohne Hydrocortison) gegeben, auf die folgenden Desloratadin-Ansätze die absteigenden Verdünnungsreihen. Ebenso wurde mit den drei Loratadin und Hydrocortison-Ansätzen verfahren. Die Zellen

wurden vier Stunden im Brutschrank präinkubiert, danach wurde aus dem IFN- $\gamma$ -Stock je Well 90  $\mu$ l hinzupipettiert. Die anschließende Stimulation in Anwesenheit von Desloratadin und Loratadin +/- IFN- $\gamma$  erfolgte über 16, 22 bzw. 45 Stunden im Brutschrank bei 5 %CO<sub>2</sub> und 37 °C. Nach der jeweiligen Stimulationszeit wurden die Zellen für die weiteren Untersuchungen (Analyse der Zelladhäsionsmoleküle mittels Durchflusszytometrie, ELISA, rT-PCR) vorbereitet. Abb. 4.1 zeigt eine Fotografie mit IFN- $\gamma$  stimulierter, adhärenter Keratinozyten unter dem Lichtmikroskop.

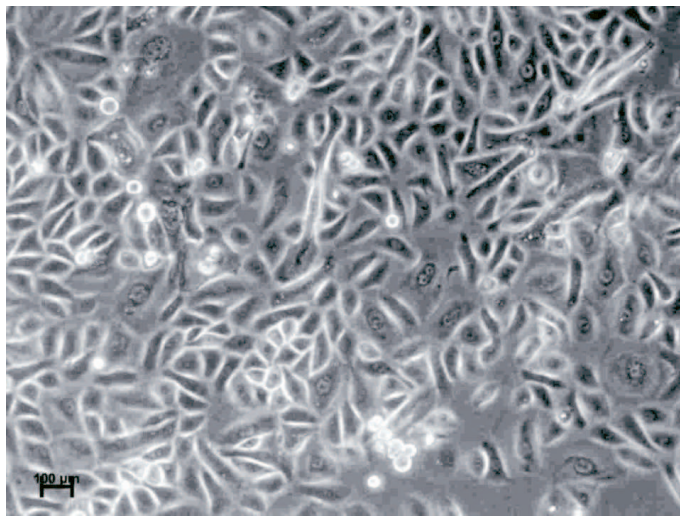


Abbildung 4.1: Mikroskopische Aufnahme mit IFN- $\gamma$  stimulierter Keratinozyten im Phasenkontrast.

### 4.3.3 Zytochemische Färbung der Zelladhäsionsmoleküle

Die auf den Zellen durch die Stimulation mit IFN- $\gamma$  exprimierten Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1, HLA-DR und HLA-ABC wurden im folgenden Ansatz mit Antikörpern gegen diese Moleküle markiert, die wiederum mit einem fluoreszierenden Stoff verbunden waren. Die Fluoreszenzaktivität wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen (FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, D).

Die Zell-Überstände der jeweiligen Stimulation wurden abgenommen, in Falcons überführt und bei 4000 rcf (Megafuge 1.0 R, Kendro, Hanau, D) 10 Minuten lang zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden sie auf Eppendorf-Tubes à 0,8 ml aliquotiert und bei -80 °C für

daraufliegende ELISA-Assays bzw. Migrationen eingefroren. Die Zellen wurden mit PBS (w/o Ca/Mg) gewaschen, im Anschluß wurde pro Well 0,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma) (Raumtemperatur) hinzugegeben und zur besseren Ablösung 10 min im Brutschrank inkubiert. Nach Kontrolle unter dem Mikroskop, ob die Zelladhärenz am Plattenboden aufgehoben war, wurden je Well 2,5 ml KGM (ohne HC) hinzupipettiert, um die Reaktion zu stoppen. Die Zellen wurden in elf 15 ml Falcons überführt und 10 min bei 1200 rcf zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Kendro, D). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet gelöst und die Zellen auf Eis verbracht. Für vier zu untersuchende Zelladhäsionsmolekül-Marker und elf Proben wurden pro Falcon 450  $\mu$ l Facs-Puffer (500 ml D-PBS w/o Ca/Mg + 0,02%NaZitrat + 5%FCS) hinzupipettiert.

Nach kurzem vortexen wurden je Probe 100  $\mu$ l auf eine 96 Well-Platte aufgetragen. Die 96-Well-Plate wurde mittels *Quick-Runs* auf rund 1400 rcf zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Kendro, D) und der Überstand vorsichtig abgeschüttet. Alle Vorgänge fanden bei 4°C statt, um zelluläre Reaktionen zu verhindern. Als monoklonale Antikörper für die Zelladhäsionsmoleküle wurden IgG 2a als Isotypenkontrolle, humanes ICAM, HLA-DR und HLA-ABC der Firma BD Biosciences verwendet, die an den Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppelt sind. Die monoklonalen Antikörper wurden dafür in FACS-Puffer 1:10 verdünnt. Je Reihe wurden 10  $\mu$ l des FITC-gekoppelten Antikörpers pro Probe aufgetragen, wobei die Zellen kräftig resuspendiert wurden. Nach  $\frac{1}{2}$  Stunde Inkubation auf Eis unter Lichtabschluss folgte der Waschgang der nicht gebundenen Antikörper, eine Zugabe von 200  $\mu$ l PBS, ein Überführen in *FACS-Cluster-Tubes* (Abgene, Surrey, UK) sowie die nachfolgende Messung im FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, D).

#### **4.3.4 Toxizitätsmessung mittels Propidiumjodidfärbung**

Propidiumjodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit hoher Bindungsaffinität zu DNA. Mit seiner Hilfe lässt sich die Plasmamembranintegrität der Keratinozyten durchflusszytometrisch bestimmen. Da PI ein nicht membranpermeabler Fluoreszenzfarbstoff ist, gelingt eine Kernfärbung der Keratinozyten mit PI nur bei geschädigter Plasmamembran, wie sie bei nekrotischen Zellen, nicht hingegen bei apoptotischen Zellen zu finden ist [Darzynkiewicz 1992].

Die Keratinozyten wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, das PI (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) enthielt. Die Anzahl der PI-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Propidiumjodid emittiert Licht nach einer optischen Anregung bei 488 nm im roten Bereich. Dabei liegt das Emissionsmaximum bei 617 nm [Grogan 1990]. Für die Messungen mittels Durchflusszytometrie wurde der FL-3 Filter (650 nm) für die rote Fluoreszenz verwendet. Der prozentuale Anteil der Keratinozyten mit hoher Intensität der Rotfluoreszenz wurde bestimmt. Diese Zellen wurden, da sie mit PI eingefärbt waren, und somit keine intakte Zellmembran aufwiesen, als nekrotisch eingestuft.

### 4.3.5 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das unter anderem ermöglicht, die Expression von Oberflächenmolekülen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden, darzustellen. Im vorliegenden Projekt sollte die Expression der ko-stimulatorischen Moleküle ICAM-1, HLA-DR und HLA-ABC nachgewiesen werden. IgG2a galt hierbei als Isotypenkontrolle der jeweiligen Antikörper. Die in die FACS-Cluster-Tubes überführten Keratinozyten, deren ko-stimulatorischen Moleküle auf der Zelloberfläche mit den Antikörpern Fluoreszenz-markiert wurden, wurden im FACS-Gerät auf die Anzahl der exprimierten Moleküle untersucht. Für die Messungen wurde das Durchflusszytometer FACSCalibur<sup>TM</sup> der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, D verwendet. Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte zunächst als Punkthistogramm („dotplot“), wobei die Größe und Granularität der Zellen im Vorwärts (FSC-H)- und Seitwärtsstreulicht (SSC-H) gegenübergestellt wurden. Zur Messung standen drei verschiedene Filter zur Auswahl: FL-1 (530/30 nm) für die grüne Fluoreszenz, FL-2 (585/42 nm) für die orange Fluoreszenz und FL-3 (650 nm) für die rote Fluoreszenz. Für die Datenanalyse wurde ein Mac-Computer der Firma Apple Computer Inc. verwendet. Die Bearbeitung und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Software-Programm Cellquest<sup>TM</sup> (Becton Dickinson, Heidelberg, D). Für die Messung der Zelladhäsionsmoleküle wurde je Probe nach Messung von 10.000 zu erfassenden Zellen gestoppt, als Filter wurde FL-1 verwendet. Mit Hilfe des Analyseprogramms der Cellquest<sup>TM</sup>-Software (Becton Dickinson, Heidelberg, D) wurde die Zahl der exprimierten

Adhäsionsmoleküle mit grüner Fluoreszenz (FITC) ermittelt. Abb.4.2 zeigt einen Ausschnitt aus dem Ergebnis einer solchen durchflusszytometrischen Analyse.

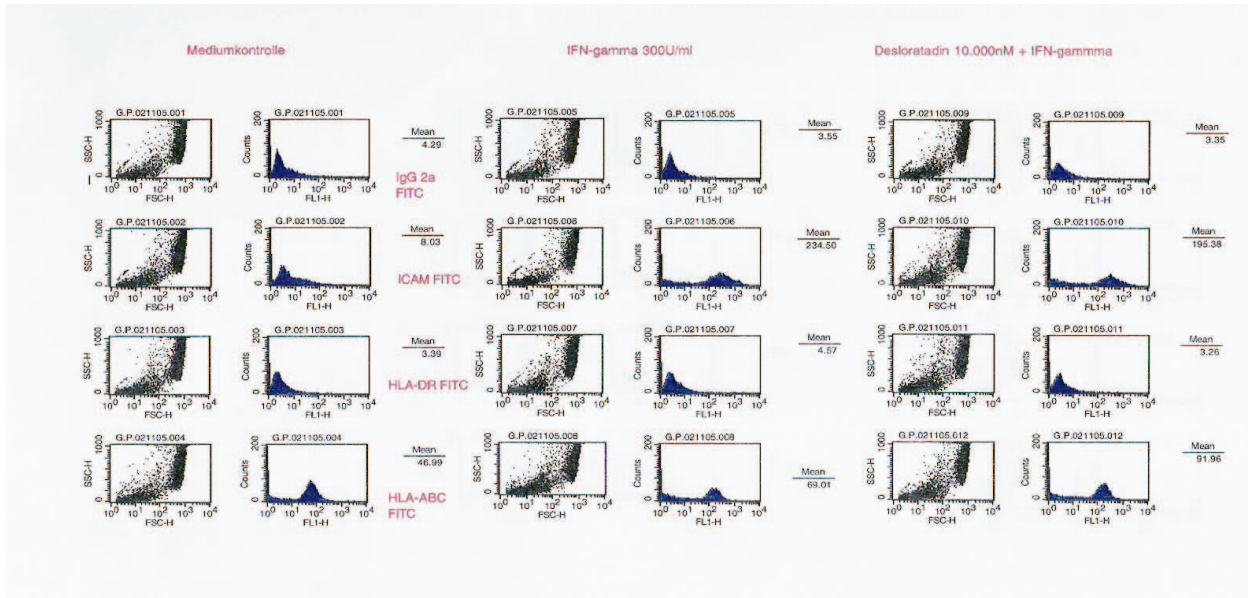


Abbildung 4.2: Beispiel einer fluoreszenzzytometrischen Analyse der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1, HLA-ABC und -DR. Stimulationszeit: 16 Stunden. Die linke Spalte stellt die Mediumkontrolle dar, die mittlere die mit IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen, die rechte die Zellen, die mit IFN- $\gamma$  + Desloratadin  $10^{-5}$ M inkubiert wurden. Innerhalb der Spalten sind linkerhand die einzelnen Zellen im SSC und FSC dargestellt, rechterhand unter der blauen Kurve die Zellen, deren Adhäsionsmoleküle sich mit den jeweiligen Fluoreszenzmarkern ICAM, HLA-DR, HLA-ABC, sowie der Isotypenkontrolle IgG2a anfärben ließen. Es wurden pro Probe 10 000 Zellen gezählt. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist rechterhand neben den jeweiligen Spalten angegeben.

### 4.3.6 RNA-Extraktion

Ein weiterer Teil der Versuchsreihen war die Untersuchung der durch die Stimulation erfolgten Veränderungen der Keratinozyten mittels molekularbiologischer Untersuchungsmethoden. Bei identischem Versuchsansatz wie unter 4.3.1 und 4.3.2 beschrieben wurden die präinkubierten und stimulierten Zellen nicht auf die Expression von Zelloberflächenmolekülen untersucht, sondern auf Veränderungen ihrer RNA. Die Isolierung der RNA wurde mittels peqGOLD-RNAPure-Puffers (PeqLab, Erlangen, D) durchgeführt. Sämtliche Materialien, die bei der Arbeit mit RNA zur Verwendung kommen, sollten RNase-frei sein. Aus diesem

Grunde wurden die Eppendorf-Tubes vor Verwendung sterilisiert und RNase freies Wasser, sowie RNase freie Pipettenspitzen der Firma Art (Molecular Bio Products, San Diego, Cal., USA) verwendet. Sämtliche Arbeitsschritte wurden mit Handschuhen durchgeführt, der Arbeitsplatz wurde vor Arbeitsbeginn mit RNaseZAP (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) RNasefrei gehalten.

#### RNA-Isolierung mittels peqGOLD-RNAPure-Puffers

Die RNA-Extraktion besteht aus den fünf Schritten Homogenisation, Phasentrennung, RNA-Präzipitation, Waschen und Lösen der RNA. Bei identischem Versuchsansatz wurden die adhärenen Keratinozyten je Well mit 1 ml (pro  $5-10 \times 10^{60}$  Zellen) peqGOLD RNAPure-Puffer versetzt (Homogenisation). Die Zellen wurden mittels Zell-Schaber vom Boden gelöst und die Zellsuspensionen unter gründlichem Resuspendieren in sterile Eppendorf-Tubes überführt. Sollte die RNA nicht unmittelbar im Anschluß isoliert werden, wurden die Tubes bei  $-80^{\circ}\text{C}$  weggefroren. Der beschriebene und die folgenden Arbeitsschritte sollten unter einem Abzug durchgeführt werden, da das im Puffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol zu Gesundheitsschäden führen kann. Die Proben wurden nach dem Homogenisierungsschritt 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um eine optimale Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Je eingesetztem ml peqGOLD-Puffers wurden nun 0,2 ml Chloroform dazugegeben. Die Proben wurden 15 Sekunden mit der Hand kräftig geschüttelt und wiederum rund 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach erfolgte eine 5 - minütige Zentrifugation bei  $12.000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  (Biofuge Pico, Kendro, D). Nach Zentrifugation waren die Proben in jeweils drei Phasen aufgeteilt: eine untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, in der sich die DNA und die Proteine befanden, eine dazwischenliegende etwas hellere Interphase und eine obere farblose wässrige Phase mit der gewünschten RNA. Für den dritten Schritt, der RNA-Präzipitation, musste die wässrige Phase in ein frisches, steriles Eppendorf-Tube überführt werden. Dafür wurden je Probe äußerst vorsichtig rund  $450 \mu\text{l}$  der wässrigen Phase abgesaugt. Die folgende Zugabe von 0,5 ml Isopropanols (Merck, Darmstadt, D) pro ml peqGOLD-Puffers je Probe galt der Präzipitation der RNA. Die Proben wurden wiederum rund 10 min bei Raumtemperatur gelagert und daraufhin 10 min bei  $12.000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$

zentrifugiert. Das danach in jedem Tube vorhandene RNA-Präzipitat sollte weißlich und von gelartiger Konsistenz sein und an der dem Spin abgewandten unteren Seite des Tubes liegen. Für die folgenden Waschschrirte wurde zunächst der Isopropanolüberstand vorsichtig abgezogen und das RNA-Pellet in zwei Schritten mit 1ml 75% igem Ethanol durch kurzes, sanftes Vortexen und anschließende Zentrifugation (10 min, 12.000 x g, 4 °C) gewaschen. Nach Abziehen des Ethanolüberstandes wurde das RNA-Pellet rund 10 min lang unter der Sterilbank getrocknet, um restliches Ethanol zu entfernen. Als letzter Schritt wurde das Pellet in 20  $\mu$ l RNase-freiem Wasser gelöst. Weitere Arbeitsschritte mit der RNA fanden nun auf Eis statt, bzw. die RNA wurde bei -80°C weggefroren. Ob die RNA-Isolierung erfolgreich war wurde mittels Gelelektrophorese bzw. photometrischer Messung überprüft. Mittels eines speziellen Photometer-Programms konnte die RNA-Konzentration für jede Probe gesondert berechnet werden. Alle elf Proben wurden auf die gleiche Konzentration (0,3  $\mu$ g/ml) gebracht, um für die folgende rT-PCR und PCR gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen.

#### Agarosegelelektrophorese von RNA

Mit Hilfe eines Agarose-Gels wurde überprüft, ob intakte Gesamt-RNA isoliert wurde. Dazu wurden je Probe 1  $\mu$ l RNA-Lösung mit 1  $\mu$ l Lade-Puffer (5x, Bio Rad Lab, Hercules, USA), 1  $\mu$ l Ethidiumbromid (1:10, Sigma, St. Louis, USA) und 3  $\mu$ l RNase freiem Wasser (Invitrogen, Carlsbad, USA) versetzt. Zugleich wurde ein 1%iges Agarose-Gel aus 2 g Agarose, aufgelöst in 200 ml TBE-Puffer (1x) (108 g Trizma Base + 55 g Borsäure 99%, Sigma, St.Louis, USA + 4 ml 0,5 M EDTA (pH=0,5), Merck, Darmstadt, D, (100 ml 10x Stock + 400 ml aqua dest = 1,0xTBE) hergestellt, die Lösung in der Mikrowelle erhitzt und in eine Gelkammer (Bio Rad, Hercules, USA) gegossen. In die Taschen des erstarrten Gels wurde die RNA-Puffer-Mischung pipettiert. Die Proben wurden bei einer Spannung von 100 V in der mit einfach konzentriertem TBE-Puffer gefüllten Gelkammer über 30 min elektrophoretisch aufgetrennt. Durch den Zusatz des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid konnten aufgetrennte Nucleinsäuren anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht und ausgewertet werden.



### Photometrische Messung der RNA

Der RNA-Gehalt wurde mit einem Photometer (Beckmann, Fullerton, USA) gemessen. Dazu wurde 1  $\mu\text{l}$  RNA-Lösung in eine Quarzküvette gegeben und die Probe bei 260 und 280 nm vermessen. Zuvor wurde ein Nullabgleich gegen DEPC-Wasser (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt. Die Konzentration der RNA wurde von einer speziellen Photometer-Software (Beckmann, Fullerton, USA) berechnet.

### **4.3.7 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (rT-PCR)**

Ziel der rT-PCR (Reverse Transkriptase - Polymerase Chain Reaction) ist es, die gewonnene RNA in cDNA (complementary-DNA) umzuschreiben. Für die rT-PCR wurden folgende Reagenzien der Firma Roche, Alameda, USA verwendet: 10x Puffer,  $\text{MgCl}_2$ , Desoxy-Nukleotid-Primer (dNTP), Oligo-Primer, RNase-Inhibitor und AMV-Reverse-Transkriptase (1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR). Folgende Versuchsbeschreibung gilt für die bereits erwähnten elf Probenansätze. Für eine Probe wurden jeweils 2  $\mu\text{l}$  10x Puffer, 4  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$ , 2  $\mu\text{l}$  dNTPs, 2  $\mu\text{l}$  Oligo-Primer, 7,2  $\mu\text{l}$  steriles Wasser, 1  $\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor und 0,8  $\mu\text{l}$  AMV-Reverse-Transkriptase in ein steriles 0,2 ml PCR-Tube pipettiert und 1  $\mu\text{l}$  der jeweils zu untersuchenden RNA dazugegeben ( $c = 0,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Die Proben wurden gevortext und daraufhin 30 sec bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben ins PCR-Gerät gesetzt und einem Temperaturzyklus von 10 min bei 25 °C, eine Stunde bei 42 °C, 5 min bei 99 °C und 5 min bei 4 °C ausgesetzt. Die letzten beiden Schritte dienen der Denaturierung der AMV-Reverse-Transkriptase.

### **4.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

#### Theoretische Grundlagen

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wird zur starken Amplifikation von definierten DNA-Bereichen benutzt. Das Grundprinzip der PCR ist die enzymatische Duplikation einer DNA-Sequenz. Hierzu werden zwei Oligonukleotide benötigt, die Primer, die jeweils komplementär homolog zu dem (+)-Strang des einen Endes und zu dem (-)-Strang des anderen Endes der zu amplifi-

zierenden DNA-Region sind. Nach Hitze-Denaturierung der DNA können sich die Primer bei der anschließenden Abkühlung des Reaktionsansatzes an die DNA-Matrize anlagern. Eine hitzestabile Polymerase, z.B. Taq-Polymerase, erstellt - ausgehend vom 3'-OH-Ende des Primers - durch Primer-Extension eine Kopie der DNA-Matrize. Die Primer müssen so orientiert sein, daß die Synthesen der DNA-Moleküle aufeinander zulaufen. Nachdem die gewünschte Sequenz synthetisiert ist, werden die Stränge durch Hitzeeinwirkung voneinander getrennt. Durch erneute schnelle Senkung der Temperatur wird eine spezifische Bindung der Primer an die entstandenen DNA-Stücke ermöglicht. Durch Primerverlängerung wird dann wieder eine neue Kopie der Template-DNA erstellt. Durch dreißig- bis vierzigfaches Wiederholen dieses Zyklus erreicht man eine vieltausendfache Vermehrung des definierten DNA-Bereiches zwischen den Primern. Bei 95 °C erfolgt die Trennung der Doppelstränge der Matrizen-DNA. Darauf erfolgt das Anlagern der Primer an homologe Bereiche der Template-DNA. Die optimale Annealing-Temperatur ist abhängig von der Länge und der Basenzusammensetzung der Primer und wurde für jeden Primer gesondert nach folgender Formel errechnet: Zunächst wird die Schmelztemperatur (TM) für den 3', sowie den 5'-Primer berechnet:

$$TM = 81.5 + 0,41 \%GC - 600/bp;$$

wobei GC = Anteil der Guanin und Cytosin-Basen des jeweiligen Primers, bp = Basenpaarlänge. Aus beiden Werten wird ein Mittelwert gebildet.

$$\text{Annealing-Temperatur} = \text{TM-Mittelwert} - 18.6$$

Bei 72 °C erfolgt die Primerextension im Temperaturoptimum der Polymerase durch Nucleotidveresterung.

### Durchführung der PCR

In der PCR wurde die erhaltene cDNA auf mehrere Millionen Kopien vervielfältigt. Für die Grundmischung wurden folgende Reagenzien der Firma Roche, Alameda, USA verwendet: 10x Puffer, MgCl<sub>2</sub>, steriles H<sub>2</sub>O, sowie Taq-Polymerase. Pro Primer wurden 5 µl cDNA eingesetzt. Pro Probe wurden 4 µl 10x Puffer, 5 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl des jeweilig zu untersuchenden 3'-Primers, 1 µl des korrespondierenden 5'- Primers, 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl), 33,5

$\mu\text{l}$  RNase freies Wasser und 5  $\mu\text{l}$  cDNA in ein steriles 0,2 ml PCR - Tube gegeben. Die Proben wurden nach kurzem Vortexen 30 sec lang bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert um eventuelle Luftblasen zu beseitigen. Im PCR-Gerät (Hybaid, Ashford, GB) wurden die Proben in 30 Zyklen jeweils 1 min bei 95 °C, 1 min bei der für den jeweiligen Primer erforderlichen Annealing-Temperatur und 1 min bei 72 °C bearbeitet. Für alle Primer wurde das gleiche PCR-Protokoll mit 30 Zyklen angewandt:

- ▶ Denaturierung: 1 Minute bei 95°C
- ▶ Hybridisierung: 1 Minute bei 53°C
- ▶ DNA-Synthese: 1 Minute bei 72°C (optimale Temperatur für Taq-Polymerase)

Von der Firma Invitrogen, Paisley, Schottland, UK wurden synthetische Oligonukleotide mit folgenden Sequenzen bezogen:

ICAM-1, 5'-GTGACATGCACGACCTCCTG-3' (Annealing-Temperatur: 55 °C),

DR- $\alpha$ , 5'-CGAGTTCTATCTGAATCCTG-3' (Annealing-Temperatur: 52°C),

MIG, 5'-TGGTGTTCTTTTCCTCTTGGGCAT-3' (Annealing-T: 55°C),

IP-10, 5'-TCTAAGTGGCATTCAAGGAGTACC-3' (Annealing-T: 55°C).

Als Kontrolle wurde das  $\beta$ -actin Gen verwendet:

5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3' (Annealing-T: 66°C).

### 4.3.9 Agarosegelelektrophorese von DNA

Zur Überprüfung der Polymerasekettenreaktion auf Erfolg und Spezifität wurden die Proben nach abgeschlossener Reaktion in der Agarosegelelektrophorese ausgewertet.

#### Theoretische Grundlagen

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente bedient man sich der Gelelektrophorese als Standardmethode. Diese beruht auf dem Prinzip, dass DNA durch ihre Phosphatgruppen im alkalischen Milieu negativ geladen ist und somit im elektrischen Feld zur Anode wandert. Als feste Phase dient in unserem Fall ein Gel, das aus Polymeren der Agarose besteht. Agarose ist ein lineares Polymer aus D-Galaktose und 3,6- anhydro- L- Galaktose. Die Agarose bildet somit ein Netz, durch das die DNA-Stücke wandern. Große Fragmente zeigen hierbei

eine geringere Mobilität als kleinere.

#### Durchführung der Agarosegelelektrophorese

Zunächst wurde ein 1 %iges Agarosegel aus Agarosepulver und TBE-Puffer (1x) hergestellt. Für die der Probenmenge entsprechende Gelgröße wurden Agarose und Puffer im entsprechenden Mischungsverhältnis (z.B. 200 ml TBE + 2 g Agarose + 20  $\mu$ l Ethidiumbromid) in einem Erlenmeyer-Glaskolben vermischt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach kurzer Abkühlzeit auf etwa 50-60 °C wurden 20  $\mu$ l Ethidiumbromid dazugegeben und durch Schütteln mit dem warmen Gel vermischt. Das Gel wurde luftblasenfrei in einen mit einem Kamm versehenen Gelträger gegossen und etwa 15 min gehärtet. Währenddessen wurden jeweils 8  $\mu$ l der DNA-Proben mit 2  $\mu$ l Ladungspuffer zur Beschwerung der Proben versetzt. Der Gelträger wurde in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt und mit TBE-Puffer überschichtet. Nacheinander wurden 2  $\mu$ l eines die Basenpaarlängen anzeigenden Markers (Hyper Ladder, Bioline, Luckenwalde, D), 2  $\mu$ l Ladungspuffer (Bio Rad, Hercules, USA) und 6  $\mu$ l steriles Wasser vermischt mit den Proben in die Geltaschen pipetiert. Es wurde eine Spannung von etwa 140 Volt angelegt und das Gel etwa eine Stunde lang laufen gelassen (die Stromstärke sollte unter 100 mA liegen). Die Darstellung der DNA erfolgte mit der Ethidiumbromidfärbung. Diese bereits zum flüssigen Gel zugegebene Substanz lagert sich an die doppelsträngige DNA an. Da Ethidiumbromid ein fluoreszierendes Agens ist, kann die DNA unter UV-Licht (310 nm) sichtbar gemacht werden.

### **4.3.10 Bestimmung von Chemokinen in Überständen von stimulierten Primärkeratinozyten mittels ELISA**

#### Theoretische Grundlagen

Der Enzymimmunoassay ist eine quantitative analytische Methode, bei der ein Reaktionspartner enzymatisch markiert ist. Dieser kann entweder das Antigen oder der Antikörper sein. Bei der in diesen Ansätzen verwendeten sogenannten „Sandwich-Technik“ zum Antigennachweis ist der Antikörper für das gesuchte Antigen an eine Mikrotiterplatte gebunden.

Die Menge des gebundenen Antigens aus der Probe wird durch die Zugabe eines markierten Zweitantikörpers, der unter Bildung des „Sandwich“ an das Antigen bindet, ermittelt [Burmester 1998].

### Durchführung der ELISAs

Um die Aktivierung der Keratinozyten durch IFN- $\gamma$  und die Effekte von Desloratadin und Loratadin auf die IFN- $\gamma$ -induzierten Mechanismen nachzuweisen, wurde im Überstand der Keratinozytenkultur die Messung von CXCL8 (IL-8), CCL5 (RANTES), CCL17 (TARC) und CXCL10 (IP-10) vorgenommen. Die Keratinozyten wurden mit verschiedenen Substanzen zu unterschiedlichen Konzentrationen (Desl./Lor.:  $10^{-6}$  -  $10^{-4}$  M, Hydrocortison:  $10^{-5}$  und  $10^{-4}$  M) über vier Stunden vorinkubiert, bevor sie mit IFN- $\gamma$  zu 300 U/ml über 24 oder 48 Stunden (Desl./Lor.) bzw. 16, 22 oder 45 Stunden (Hydrocortison) stimuliert wurden. Die Kulturüberstände wurden zentrifugiert, um somit eventuell in Suspension gegangene, tote Keratinozyten zu eliminieren. Die zellfreien Überstände wurden mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Sets (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, USA; R+D Systems, Minneapolis, USA) nach den unterschiedlichen Protokollen der jeweiligen Herstellerfirmen auf CCL 5, CXCL 8, CCL 17 und CXCL 10 untersucht. Die Messung der Proben erfolgte in Einfachbestimmung, die Experimente wurden drei bzw. viermal wiederholt. Für das Verfahren des ELISA benötigt man präparierte Platten, die mit einem Antikörper spezifischer Art gegen die zu messende Substanz beschichtet sind. Für den Versuch wurden Standards und zu untersuchende Proben in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe der Probe bindet die gesuchte Substanz an das Antigen auf der Platte. Nach Wegwaschen aller ungebundenen Substanzen wurde ein zweiter, enzymgekoppelter Antikörper, der spezifisch für das jeweilige Antigen ist, auf die Wells verbracht. Je nach Menge der gebundenen Substanz bindet nun eine entsprechende Menge des sekundären Antikörpers, in sogenannter „Sandwich-Technik“ an das Zielmolekül. Es folgte ein erneuter Waschgang, dessen Ziel die Eliminierung jeglichen ungebundenen Antikörper-Enzym-Komplexes ist. Das an den Zweitantikörper gebundene Enzym ist in der Lage, einen hinzugefügten Farbstoff durch Spaltung zu aktivieren, so dass die Enzymaktivität photometrisch erfasst werden kann. Sie ist proportional zur Menge des

gebundenen Zielmoleküls [Quantikine].

### **4.3.11 Migration von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten auf Primärkeratinozytenüberstände (Migrationsassay)**

#### **4.3.11.1 Isolierung der neutrophilen Granulozyten**

Humane PMN wurden aus dem Vollblut der Probanden durch Dichtegradient-Zentrifugation gewonnen (Histopaque 1077/1119, Sigma, Deisenhofen, D). 80 ml Vollblut wurde in EDTA-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, D) abgenommen. In vier 50 ml Falcon-Tube wurden zunächst steril 13 ml Histopaque-1119 mit 13 ml Histopaque-1077 (Sigma, Deisenhofen, D) mit einer 10 ml Pipette überschichtet, dann wurden vorsichtig je 20 ml EDTA-Vollblut darüber geschichtet. Histopaque-1077 und -1119 müssen Raumtemperatur haben. Es folgte eine Dichtezentrifugation (Megafuge 1.0, Kendro, Hanau, D) bei 754 x g über 45 min. bei 20°C ohne Bremse. Das Plasma wurde mit der Pasteur-Pipette unter Vakuum bis ca 0,5 cm über der zweiten Interphase, in der sich die Granulozyten angereichert haben, abgezogen. Die Granulozytenbande in der zweiten Interphase in der Dichte 1119 wurde vorsichtig mit einer Glaspipette bis in den Bereich der am Boden liegenden Erythrozyten geerntet, in ein 50 ml Falcon überführt und mit PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt. Für die Isolierung von PMN schlossen sich nun drei Waschschriffe an. Der erste bei 409xg und 20°C über 10 min mit Bremse in der Megafuge 1.0. Danach wurde der Überstand abgenommen und die Zellen über 20 sec. mit 5 ml sterilem Aqua dest. hypoton geschockt. Nach Zugabe von 5 ml 1.8%igem sterilem NaCl fand ein zweiter Zentrifugationsschritt (353 x g, 10 min, 20°C, mit Bremse) statt. Der Überstand wurde abgenommen, die Pellets mit 5 ml PBS aufgefüllt. Im 3. Waschschriff wurde bei 301 x g über 10 min und 20°C mit Bremse zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 10 ml RPMI complete + 5% BSA resuspendiert und gezählt (Neubauer-Zählkammer, Assistent, Sondheim, D). Die PMN wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml in einer Suspension von RPMI Kompletmedium plus 0,5% BSA in die obere Kammer der Transwell-Kammer (Corning Costar, Cambridge, USA) transferiert.

#### 4.3.11.2 Isolierung der eosinophilen Granulozyten

Die Eosinophilenisolierung wurde analog dem obigem Schema durchgeführt, wobei sich nur die Waschschrirte unterschieden. Im ersten Waschgang wurden die Falcontubes bis auf 50 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D). Zentrifugiert wurde bei 409xg über 20 min bei 20°C mit Bremse. Im zweiten Waschgang wurde das Pellet auf 35 ml MACS-Puffer aufgefüllt und bei 301xg über 10 min bei 20°C mit Bremse zentrifugiert. Es folgte der dritte Waschgang und die Erythrozytenlyse. Über 20-30 sec wurden 1000  $\mu$ l Aqua dest. hinzugegeben, dann 1000  $\mu$ l 1,8%ige NaCl Lösung. Der Ansatz wurde mit MACS-Puffer auf 30 ml aufgefüllt und erneut abzentrifugiert (301 x g, 10 min, 20°C, mit Bremse. Eine Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer schloss sich an. Die Granulozyten wurden durch ein System für magnetische Zelltrennung (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D) laufen gelassen, CD16+ Neutrophile wurden hierbei aussortiert und eosinophile Granulozyten wurden gewonnen. Vor der Anreicherung der eosinophilen Granulozyten mit der Vario-MACS-Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D) mussten die Neutrophilen dafür zunächst mit Microbeads CD 16 (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D) inkubiert werden. Pro  $5 \times 10^7$  Zellen wurden 50  $\mu$ l MACS-Puffer sowie 50  $\mu$ l CD16 Microbeads addiert. Die Zellen wurden 30 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde mit MACS-Puffer auf ein Endvolumen von 1 ml pro  $5 \times 10^7$  Zellen aufgefüllt. In der Zwischenzeit wurde die CS-Säule nach Angaben des Herstellers, sowie ein Eisbad mit Ständer für ein 50 ml Falcontube vorbereitet. Es folgte eine Äquilibrierung der Säule mit 60 ml Puffer, das Auftragen von 1000 - 4000  $\mu$ l der Zellsuspension und ein Spülen mit 30 ml Puffer. Die CD16-negativen Zellen (Eosinophile) wurden im 50 ml Falcontube im Eisbad aufgefangen und nachfolgend bei 301 x g über 10 min zentrifugiert. Die CD16-positiven, Micorbead-gebundenden Zellen, die aufgrund der magnetischen Wirkung in der Säule verblieben waren, wurden verworfen. Das Zellpellet wurde nun in 2-3 ml RPMI complete aufgenommen und die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

PMN (siehe Abschnitt 4.3.11.1) und Eosinophile wurden daraufhin in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-6}$  Zellen pro ml in RPMI 1640, supplementiert mit 2 mM Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 1% nicht-essentielle Aminosäuren (Life Technologies, Chagrin Falls, OH; komplettes

RMPI), resuspendiert, und in den entsprechenden Assays (siehe Abschnitt 4.3.11.3) eingesetzt.

#### 4.3.11.3 Migrationsassay

Die chemotaktische Aktivität der Keratinozytenüberstände wurde mittels Messung der Migration von PMN oder Eosinophilen durch 5  $\mu\text{m}$  porige Polykarbonatfilter in 24-Well Transwell-Kammern, wie bereits zuvor beschrieben [Traidl-Hoffmann 2002, Ploetz 2004], bestimmt.

Die PMN befanden sich in einer Suspension von RPMI Komplettmedium plus 0,5% BSA und einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml. Je 100  $\mu\text{l}$  davon wurden in die obere Kammer pipettiert. Die Überstände der über 48 Stunden mit IFN- $\gamma$  stimulierten und mit verschiedenen Therapeutika inkubierten Keratinozyten wurden daraufhin in die Bodenkammer der Transwellplatte gegeben (je 0,6 ml).

Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde die obere Kammer entfernt und die Suspension in der Bodenkammer mit einer 1000er Pipette gut resuspendiert und je Ansatz 300  $\mu\text{l}$  in ein Polystyrol-Tube überführt, das auf Eis gestellt wurde. Die in die untere Kammer migrierten Zellen wurden mittels FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, D) über 60 sec bei einer Flußrate von 60  $\mu\text{l}$  pro Minute gemessen.

## 4.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Origin 6.0, *data analysis and graphing software* (Microcal Software, Inc., Northampton, MA, USA) herangezogen. Es kamen die One-Way-Varianzanalyse (OneWay-Anova) und der ungepaarte t-Test zur Anwendung. Ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als signifikant eingeschätzt, ein p-Wert von  $p < 0,1$  als schwach signifikant.



# Kapitel 5

## Ergebnisse

### Zusammenfassung

In den durchgeführten Versuchen konnte ein antiinflammatorischer Effekt von Desloratadin und Loratadin auf mit IFN- $\gamma$  stimulierte Keratinozyten gezeigt werden. Loratadin zeigt ein höheres antientzündliches Potential als sein Metabolit Desloratadin. Die Antihistaminika lassen mit der Dauer der Anwesenheit des Stimulans IFN- $\gamma$  in ihrer antiinflammatorischen Potenz nach.

Im Vergleich zum bekanntermaßen antiinflammatorisch wirksamen Hydrocortison zeigten sich die Antihistaminika weniger potent in ihrer IFN- $\gamma$ -antagonisierenden Wirkung.

### **5.1 Toxizität von Desloratadin und Loratadin auf humane Keratinozyten**

Um toxische Effekte der Antihistaminika auf die Keratinozyten auszuschließen, wurden die Zellen in der durchflusszytometrischen Messung mit Propidiumjodid angefärbt. Hierbei nahmen nur die nekrotischen Zellen den Farbstoff auf. Keratinozyten wurden mit Desloratadin und Loratadin in ansteigenden Konzentrationen über 16, 22 und 45 Stunden inkubiert (4-stündige Präinkubation mit Desloratadin/Loratadin und anschließende Stimulationen mit IFN- $\gamma$  oder Medium/Desloratadin alleine). Die Keratinozyten wurden mit Propidiumjodid

(PI) gefärbt und die Anzahl der PI aufnehmenden Zellen mittels Flow-Zytometrie gemessen. Abb.5.1 verdeutlicht die Anzahl der nekrotischen Zellen in Prozent nach 45 Stunden Stimulationszeit. Es zeigte sich nur geringfügige Induktion von Nekrose in den Keratinozyten, die mit höherer Dosierung der Antihistaminika sogar abnahm und jeweils noch unter dem Vergleichswert der Mediumkontrolle lag. Erst ab einer Konzentration der Antihistaminika von  $10^{-4}$  M war die Induktion von Nekrose in den Zellen signifikant. Wie in Abb. 5.5 dokumentiert, lag die IC<sub>50</sub> für die beobachteten anti-inflammatorischen Effekte der Antihistaminika im Bereich von  $10^{-5}$  M, was toxische Wirkungen von Desloratadin und Loratadin als Erklärung für das beobachtete Phänomen ausschließt. Desloratadin und Loratadin weisen also keine nachweisbare toxische Wirkung auf die Zellen auf, sie scheinen im Gegenteil einen protektiven Einfluss auszuüben.

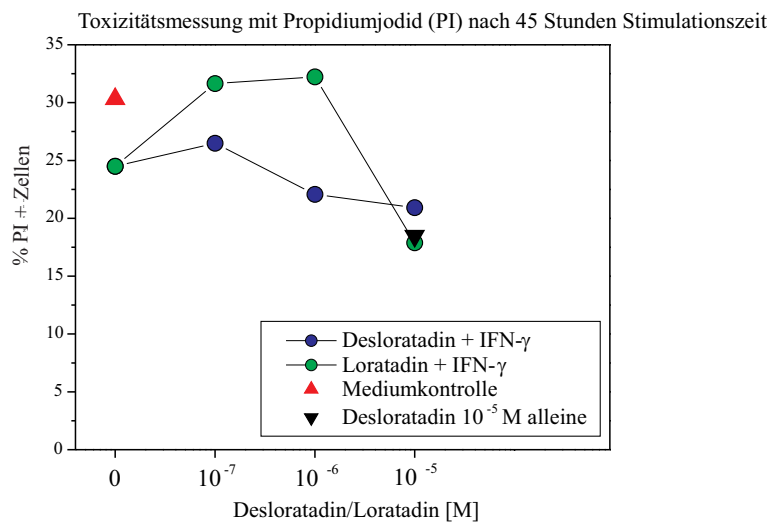


Abbildung 5.1: *Toxizitätsmessung mit Propidiumjodid (PI) nach 45 Stunden Stimulationszeit.* Die Anzahl der nekrotischen Zellen lag bei allen Ansätzen unter 30%. Die Induktion von Nekrose durch die Antihistaminika lag nahezu immer unter der Mediumkontrolle. Mit ansteigender Konzentration schienen Desloratadin und Loratadin sogar einen protektiven Effekt auszuüben.

## **5.2 Einfluß von Desloratadin und Loratadin auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Hochregulierung von co-stimulatorischen Molekülen auf Keratinozyten**

Wir nahmen an, dass nach Stimulation der Keratinozyten mit IFN- $\gamma$  und gleichzeitiger Inkubation mit den Antihistaminika Desloratadin und Loratadin, sowie Hydrocortison, eine Hochregulierung bzw. Inhibierung von co-stimulatorischen Molekülen auf den Keratinozyten gezeigt werden kann [Vignola 1995, Albanesi 1998/1, Papi 2001]. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden nach der Stimulation mit IFN- $\gamma$  und nachfolgender Inkubation mit Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison die co-stimulatorischen Moleküle ICAM-1, HLA-ABC und HLA-DR auf der Keratinozytenoberfläche mittels Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und Durchflusszytometrie quantitativ gemessen. Die Stimulationszeiten betragen jeweils 16, 22 und 45 Stunden, die Präinkubation mit den Antihistaminika und Hydrocortison 4 Stunden.

## 5.2.1 Einfluss von Desloratadin/Loratadin und Hydrocortison auf die Oberflächenexpression von ICAM-1 auf Keratinozyten

ICAM-1 wird konstitutiv nicht auf den Keratinozyten exprimiert, wie sich in unseren Versuche bestätigen ließ. Desloratadin  $10^{-5}$  M alleine induzierte während der drei Stimulationszeiten keine Expression von ICAM-1.

Durch IFN- $\gamma$  erfolgte eine signifikante, von der Stimulationszeit abhängige Hochregulierung der Expression von ICAM-1 auf den Keratinozyten, die nach 48 Stunden ein Maximum zeigte. Auf diese IFN- $\gamma$ -induzierte Expression von ICAM-1 hatten beide Antihistaminika in den getesteten Konzentrationen ( $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M und  $10^{-5}$ M) keinen Einfluss (siehe Abb. 5.2). Einzig Hydrocortison blockierte die Hochregulierung signifikant (siehe Abb. 5.2, Abschnitt A), allerdings nur bei kurzer Stimulationsdauer. Bei längerer Anwesenheit von IFN- $\gamma$  erwies es sich als nicht ausreichend wirksam.

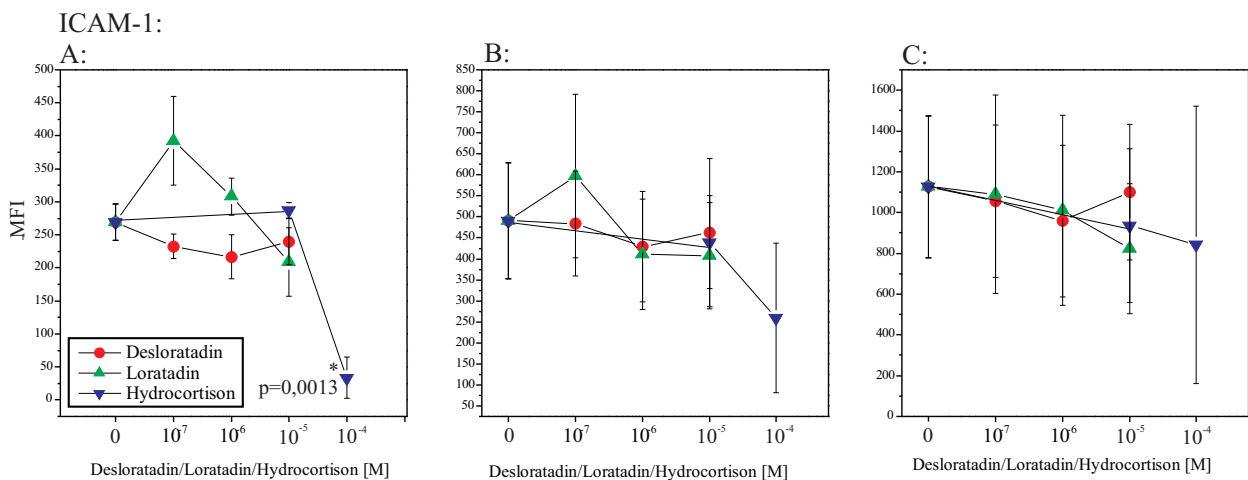


Abbildung 5.2: ICAM-1-Expression auf den Keratinozyten nach 16 (A), 22 (B) und 45 (C) Stunden Stimulationszeit mit IFN- $\gamma$  ( $n=3$ ). ICAM-1 wurde konstitutiv nicht auf den Keratinozyten exprimiert. Die Stimulation mit IFN- $\gamma$  hingegen bewirkte eine starke Expression des Moleküls. Nur Hydrocortison reduzierte die IFN- $\gamma$ -induzierte Expression von ICAM-1 um mehr als 50%, diese Wirkung ließ jedoch nach längerer Stimulationsdauer nach. Desloratadin  $10^{-5}$  M alleine induzierte während der drei Stimulationszeiten keine Expression von ICAM-1.

## 5.2.2 Regulierung des MHC-Klasse-I-Moleküls (HLA-ABC) auf Keratinozyten durch Desloratadin/Loratadin und Hydrocortison

Das MHC-Klasse-I-Molekül wird konstitutiv auf den Keratinozyten exprimiert. Desloratadin in einer Konzentration von  $10^{-5}$ M ohne IFN- $\gamma$  zeigte im Vergleich zur Mediumkontrolle eine geringfügig niedrigere Expression von HLA-ABC auf den Keratinozyten. Durch den Stimulus IFN- $\gamma$  erfolgte eine signifikante Hochregulierung des MHC-Klasse-I Moleküls. Hydrocortison blockierte diese Hochregulierung signifikant fast bis unter den konstitutiven Wert, Loratadin nur schwach signifikant, Desloratadin zeigte keinen Einfluss auf das durch IFN- $\gamma$  hochregulierte MHC-Klasse-I Molekül (siehe Abb.5.3).

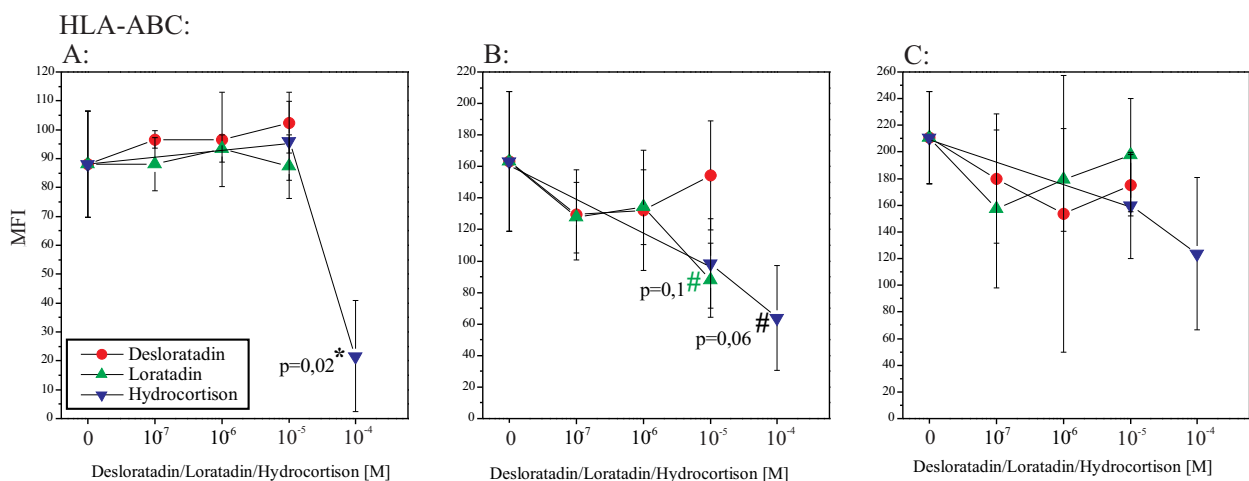


Abbildung 5.3: HLA-ABC-Expression auf den Keratinozyten nach 16 (A), 22 (B) und 45 (C) Stunden Stimulationszeit mit IFN- $\gamma$  ( $n=3$ ). Das MHC-Klasse-I-Molekül wird konstitutiv auf den Keratinozyten exprimiert. Die Zellen, die mit Desloratadin in der Konzentration  $10^{-5}$ M ohne IFN- $\gamma$  inkubiert wurden wiesen eine geringfügig niedrigere Expression von HLA-ABC auf ihrer Oberfläche auf. Hydrocortison zeigte nach 16 und 22 Stunden Stimulationszeit einen blockierenden Einfluss auf die IFN- $\gamma$ -induzierte HLA-ABC-Expression. Auch Loratadin wirkte schwach signifikant supprimierend auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Expression des MHC-Klasse-I-Moleküls (B). Desloratadin hatte keinen Effekt.

### 5.2.3 Regulierung des MHC-Klasse-II-Moleküls (HLA-DR) auf Keratinozyten durch Desloratadin/Loratadin und Hydrocortison

Die 16- und 22-stündigen Stimulationen mit IFN- $\gamma$  zeigten in unserem Fall wie erwartet zum größten Teil Werte unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt). Nach 45 Stunden zeigte sich eine signifikante Expression des MHC-Klasse-II Moleküls auf den Keratinozyten. Während die Antihistaminika keine Blockade dieser IFN- $\gamma$ -induzierten Expression bewirkten, war Hydrocortison  $10^{-4}$  M in der Lage, die Expression des Moleküls unter die Nachweisgrenze zu supprimieren (siehe Abb. 5.4).

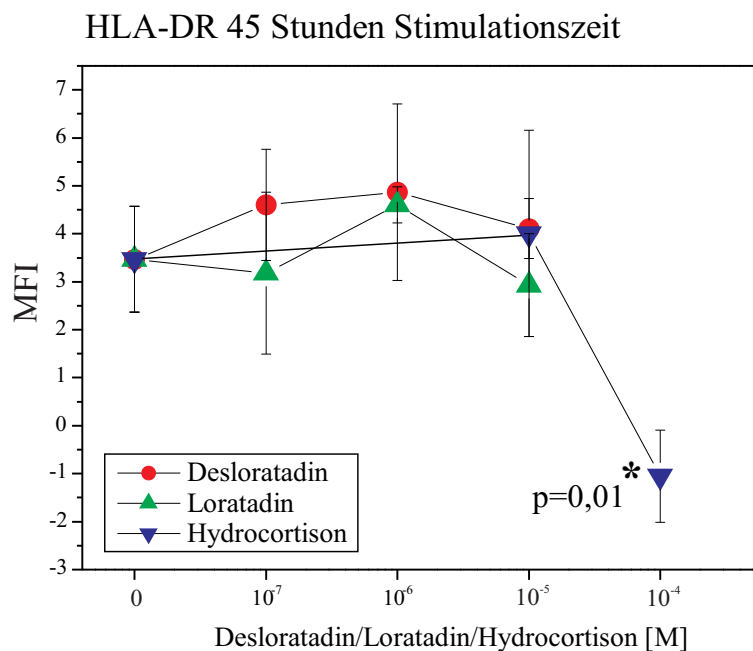


Abbildung 5.4: *HLA-DR-Expression auf den Keratinozyten nach 45h Stimulationszeit mit IFN- $\gamma$  ( $n=3$ ).* Erst nach 45-stündiger Stimulationszeit ließ sich eine IFN- $\gamma$ -induzierte Expression von HLA-DR auf den Zellen überhaupt nachweisen. Diese war äußerst gering, ließ sich jedoch durch Hydrocortison wieder bis unter die Nachweisgrenze supprimieren. Die Antihistaminika zeigten keinen supprimierenden Effekt. Konstitutiv und durch Desloratadin wurde kein HLA-DR auf den Keratinozyten exprimiert.

## **5.3 Desloratadin und Loratadin reduzieren die IFN- $\gamma$ - induzierte Freisetzung von Chemokinen aus primären Keratinozyten**

Primäre humane Keratinozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Loratadin und Desloratadin ( $10^{-6}$  -  $3 \times 10^{-5}$  M), sowie Hydrocortison ( $10^{-5}$  -  $10^{-4}$  M) vorinkubiert. Nach vier Stunden Inkubation wurde die Kultur mit IFN- $\gamma$  (300 U/ml) stimuliert. Die Überstände wurden nach jeweils 24 oder 48 Stunden Inkubationszeit (Desloratadin/Loratadin) bzw. 16, 22 und 45 Stunden (Hydrocortison) auf die Anwesenheit der Chemokine CCL5, CXCL10, CXCL8 und CCL17 untersucht. Als Kontrollen wurden Medium und Desloratadin  $10^{-5}$ M alleine verwendet.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, schütteten die Keratinozyten nach IFN- $\gamma$ -Stimulation erhebliche Mengen an CXCL10 und CCL5 aus, wobei die CCL5-Produktion mit Dauer der Stimulationszeit anstieg, die Konzentration an CXCL10 hingegen bereits nach 16 Stunden Stimulationszeit ein Maximum betrug. Es wurden geringe Mengen an CXCL8 ausgeschüttet und kaum CCL17. Die Zellen, die nur mit Desloratadin ohne Stimulus bzw. nur mit Medium inkubiert wurden, setzten ebenfalls Chemokine frei, allerdings in sehr geringen Mengen. Eine Ausnahme bildete CXCL8, das sowohl konstitutiv, als auch in der Desloratadinkontrolle in größeren Mengen freigesetzt wurde. Auch CCL17 wurde konstitutiv - wenn auch in sehr geringen Mengen - sezerniert, wobei dessen Ausschüttung, wie zuvor bereits beschrieben, durch den Stimulus IFN- $\gamma$  kaum angeregt wurde.

### **5.3.1 Einfluß von Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von CCL5**

Auf die Freisetzung des Chemokins CCL5 hin werden basophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten an den Ort einer Entzündung gelockt [John 1997]. Wie be-

**Tabelle 1:** Zytokinproduktion von humanen Keratinozyten nach Stimulation mit 300 U/ml IFN- $\gamma$  über 16 Stunden, 22 Stunden und 45 Stunden ohne Präinkubation mit den getesteten Therapeutika.

	16 Stunden (4 Experimente)	22 Stunden	45 Stunden
CCL 5 (RANTES)	349,7 +/- 131,2	1191,6 +/- 497,9	4682,5 +/- 1134,3
CXCL 8 (IL-8)	171,9 +/- 12,5	178,8 +/- 7,9	186,9 +/- 14,7
CXCL 10 (IP-10)	4593,2 +/- 131,9	4676,4 +/- 214,8	4659,2 +/- 120,3
CCL 17 (TARC)	4,9 +/- 1,3	3,7 +/- 1,0	3,8 +/- 0,9

Die Daten sind dargestellt als Mittel +/- SD aus vier (16h) bzw. drei unabhängigen Experimenten und in der Einheit pg/ml.

reits zuvor beschrieben, wird CCL5 von Keratinozyten als Reaktion auf Stimulation mit dem inflammatorisch wirkenden IFN- $\gamma$  freigesetzt [Albanesi 1998/1]. Wie aus den Abb. 5.5, Abschnitt B und D, sowie 5.6 ersichtlich, inhibierten die Antihistaminika und Hydrocortison die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von CCL5 dosisabhängig. Dies traf auch nach längerer Stimulationzeit zu. Die IC<sub>50</sub> für die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von CCL5 betrug  $3 \times 10^{-6}$ M für Loratadin,  $10^{-5}$ M für Desloratadin, sowie  $10^{-5}$ M für Hydrocortison. Auch die konstitutive Freisetzung von CCL5 wurde durch die Antihistaminika dosisabhängig inhibiert (siehe Abb. 5.5, Abschnitt A und C). Hierbei konnte besonders Loratadin einen außergewöhnlich wirksamen blockierenden Effekt auf die konstitutive Expression von CCL5 ausüben (IC<sub>50</sub>  $2 \times 10^{-6}$ M für Loratadin gegenüber  $7 \times 10^{-6}$ M für Desloratadin).

### 5.3.2 Einfluß von Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von CXCL8

Wie bereits zuvor beschrieben, wird sowohl konstitutiv, als auch in der Desloratadinkontrolle CXCL8 sezerniert [Albanesi 1998/1]. Dies ließ sich in unseren Versuchen bestätigen. Desloratadin alleine schien jedoch einen inhibierenden Effekt auf die konstitutive CXCL8-Produktion auszuüben, da es signifikant geringer sezerniert wurde, als in der Mediumkontrolle ( $p=0,009$ ). Es zeigte sich eine signifikante dosisabhängige Verringerung sowohl der IFN- $\gamma$ -induzierten



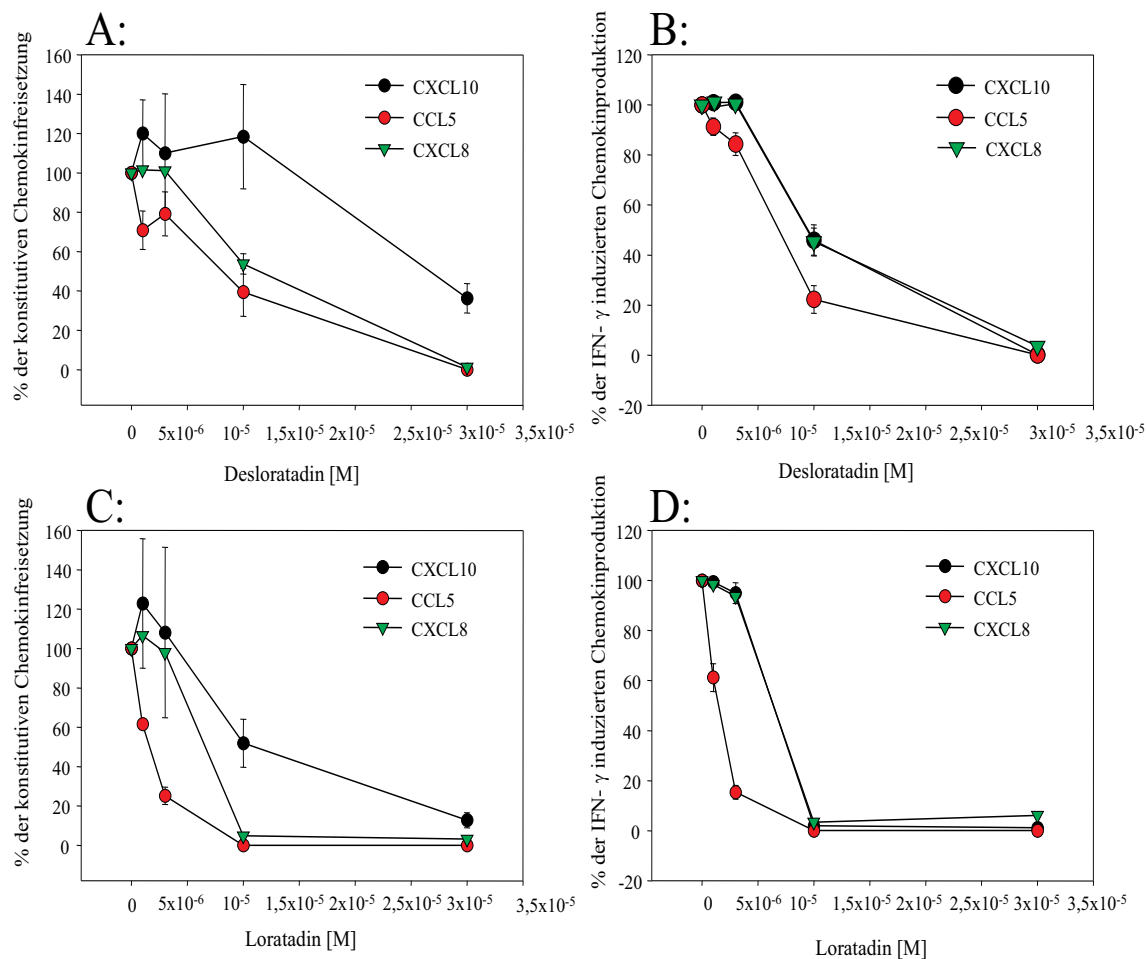


Abbildung 5.5: Verminderte Chemokinfreisetzung aus primären Keratinozyten in Anwesenheit von Desloratadin (A, B) und Loratadin (C, D): Keratinozyten wurden über vier Stunden mit Desloratadin und Loratadin präinkubiert und daraufhin mit IFN- $\gamma$  (300 U/ml) stimuliert. Überstände wurden nach 24-stündiger IFN- $\gamma$ -Stimulation gewonnen und auf die Anwesenheit von CCL5, CXCL10 und CXCL8 untersucht. Die Vorinkubation der Keratinozyten mit den Antihistaminika inhibierte dosisabhängig die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von CCL5, CXCL10 und CXCL8 (B, D). Ebenso wurde auch die konstitutive Freisetzung von CCL5, CXCL10 und CXCL8 vermindert (A, C). Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert gepoolter Daten +/- SEM aus vier unabhängigen Experimenten.

Freisetzung, als auch der konstitutiven Sekretion von CXCL8 durch Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison (sh. Abb. 5.5 und Abb. 5.6). Die IC<sub>50</sub> für die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von CXCL8 betrug  $5 \times 10^{-5}$ M für Hydrocortison, die IC<sub>50</sub> für Desloratadin und Loratadin zeigte keinen Unterschied und lag bei  $10^{-5}$ M.

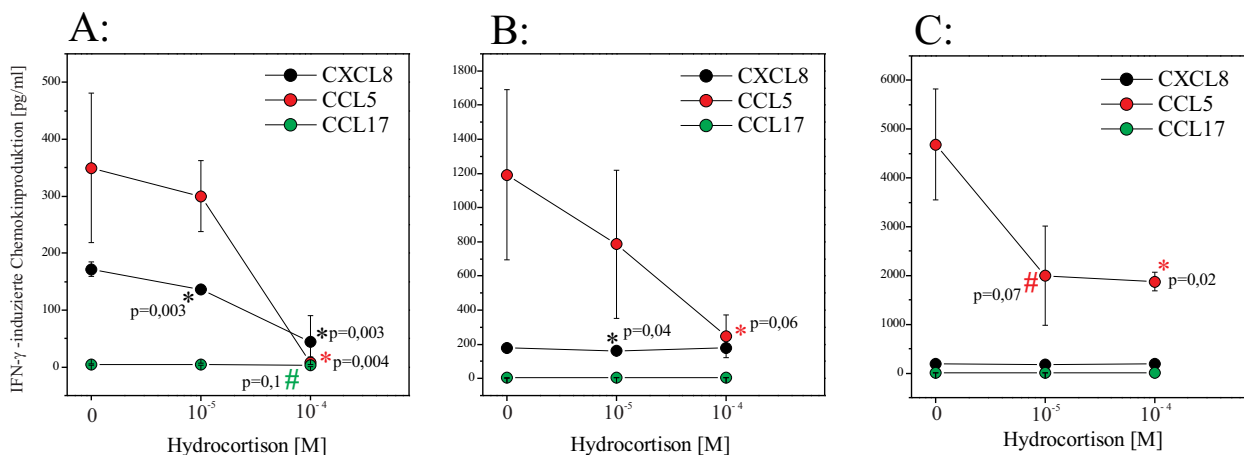


Abbildung 5.6: *Einfluß von Hydrocortison auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung der Chemokine CXCL8, CCL5 und CCL17 nach 16 (A), 22 (B) und 45 (C) Stunden Stimulationszeit:* Hydrocortison inhibiert die IFN- $\gamma$ -induzierte Sekretion von CXCL8 und CCL5 signifikant. Hydrocortison in den Konzentrationen  $10^{-5}$ M und  $10^{-4}$ M inhibiert deutlich die Freisetzung von CXCL8 (A, B). Nach längerer Stimulationszeit läßt dieser Effekt allerdings nach (C). Ein deutlicher Einfluß des Glukokortikoids ( $c= 10^{-4}$ M) zeigt sich auch auf CCL5, der über alle drei Stimulationszeiten anhält. Lediglich ein schwach supprimierender Effekt kann von Hydrocortison ( $10^{-4}$ M) nach kürzerer Stimulationsdauer auf die IFN- $\gamma$ -induzierte, ohnehin geringe Freisetzung von CCL17 gezeigt werden.

### 5.3.3 Einfluß von Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von CCL17

CCL17 wurde in wesentlich geringeren Mengen ausgeschüttet, als die zuvor beschriebenen Chemokine. Ungefähr identisch geringe Mengen an CCL17 wurden in den Überständen der mit IFN- $\gamma$  stimulierten Keratinozyten, sowie der unstimulierten Keratinozyten gefunden (3,7 pg/ml +/- 1,0). Geringfügig größere Mengen an CCL17 wurden in den Überständen der Desloratadin-Kontrolle angetroffen (5,0 pg/ml). Die sehr geringe Freisetzung von CCL17 wurde weder durch Loratadin, noch durch Desloratadin signifikant beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Nur Hydrocortison zeigte schwach signifikant supprimierende Effekte auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von CCL17 nach einer Stimulationszeit von 16 Stunden, die nach längerer Stimulationszeit nicht mehr nachgewiesen konnten. (sh. Abb. 5.6) .

### 5.3.4 Einfluß von Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von CXCL10

Im Vergleich zu CCL17 wurde CXCL10 nach IFN- $\gamma$ -Stimulation in viel größeren Mengen sezerniert. Die Werte bewegten sich bis zu 5000 pg/ml. Die IFN- $\gamma$ -induzierte starke Freisetzung von CXCL10 durch die Keratinozyten wurde durch Desloratadin und Loratadin in den eingesetzten Konzentrationen signifikant reduziert, wobei die IC50 keinen Unterschied hinsichtlich des Antihistaminikums zeigte und bei  $10^{-5}$  M lag (siehe Abb. 5.5, Abschnitt B und D). Auch die konstitutive Sekretion von CXCL10 konnte durch die Antihistaminika signifikant geblockt werden, das Chemokin wies hier jedoch im Vergleich zu den übrigen untersuchten Chemokinen die größte Unempfindlichkeit gegenüber den Antihistaminika auf (siehe Abb. 5.5, Abschnitt A und C). Auch Hydrocortison ( $10^{-4}$ M) zeigte nach einer Stimulationszeit von 16 Stunden einen hemmenden Einfluß auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Sekretion von CXCL10 (sh. Abb.5.7).

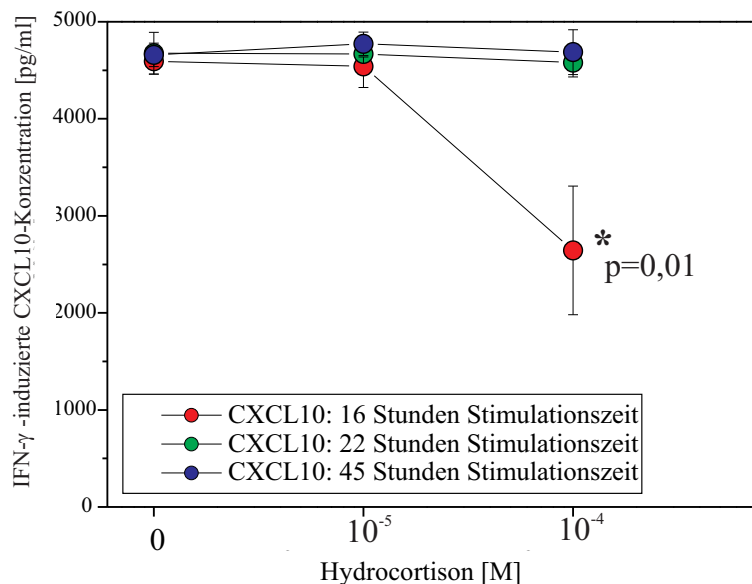


Abbildung 5.7: Einfluß von Hydrocortison auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung des Chemokins CXCL10 nach 16, 22 und 45 Stunden Stimulationszeit: Hydrocortison zeigt bei länger andauernder Stimulationszeit keinen Einfluß auf die IFN- $\gamma$ -induzierte hohe Sekretion von CXCL10. Nach kürzerer Stimulationszeit (16 Stunden) allerdings erkennt man einen signifikanten hemmenden Einfluß auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Sekretion von CXCL10.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die IFN- $\gamma$ -induzierte Ausschüttung der untersuchten Chemokine (pg/ml) während der jeweiligen Stimulationszeiten von 16, 22 und 45 Stunden, sowie die antiinflammatorischen Effekte, die die Zugabe von Hydrocortison auf die Sekretion der Chemokine durch die Keratinozyten bewirkte.

**Tabelle 2:** Chemokinproduktion von humanen Keratinozyten nach Stimulation mit 300 U/ml IFN- $\gamma$  über 16 Stunden, 22 Stunden und 45 Stunden ohne/mit Inkubation mit Hydrocortison.

	Hydrocortison [M]	16 Stunden (4 Experimente)	22 Stunden	45 Stunden
CCL5 (RANTES)	0 (nur IFN- $\gamma$ )	350,0 +/- 131,2	1191,6 +/- 498,0	4682,5 +/- 1134,3
	$10^{-5}$	300,1 +/- 62,7	785,5 +/- 434,5	2003,1 +/- 1016,4
	$10^{-4}$	8,5 +/- 8,8	246,3 +/- 124,0	1875,6 +/- 186,5
CXCL8 (IL-8)	0 (nur IFN- $\gamma$ )	172,0 +/- 12,5	179,0 +/- 8,0	187,0 +/- 15,0
	$10^{-5}$	136,4 +/- 4,2	162,3 +/- 1,4	181,0 +/- 8,3
	$10^{-4}$	44,7 +/- 45,7	179,0 +/- 11,9	188,0 +/- 15,0
CXCL10 (IP-10)	0 (nur IFN- $\gamma$ )	4593,2 +/- 132	4676,4 +/- 215	4659,2 +/- 120,3
	$10^{-5}$	4540,5 +/- 218,3	4669,1 +/- 32,1	4773,2 +/- 121,1
	$10^{-4}$	2644,1 +/- 663	4578,3 +/- 146	4687,3 +/- 231,4
CCL17 (TARC)	0 (nur IFN- $\gamma$ )	4,9 +/- 1,3	3,7 +/- 1,0	3,8 +/- 0,9
	$10^{-5}$	4,9 +/- 1,4	4,3 +/- 0,4	5,6 +/- 0,8
	$10^{-4}$	2,7 +/- 1,5	3,9 +/- 0,6	3,5 +/- 0

Die Daten sind dargestellt als Mittel +/- SD aus vier (16 Stunden) bzw. drei unabhängigen Experimenten und in der Einheit pg/ml.

## 5.4 Nachweis intakter RNA-Banden im Agarosegel nach Extraktion

Keratinozytäre RNA wurde 6, 16, 24 und 48 Stunden nach Stimulation der Keratinozyten mit IFN- $\gamma$  isoliert. Zum Nachweis der extrahierten Gesamt-RNA wurde eine RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. In der Gel-Aufnahme (sh. Abb.5.8) sind für eine Stimulationszeit von 16 Stunden die Untereinheiten der extrahierten Gesamt-RNA dargestellt. Aufgrund der umschriebenen Banden kann man von einer nicht degradierten und intakten RNA ausgehen.

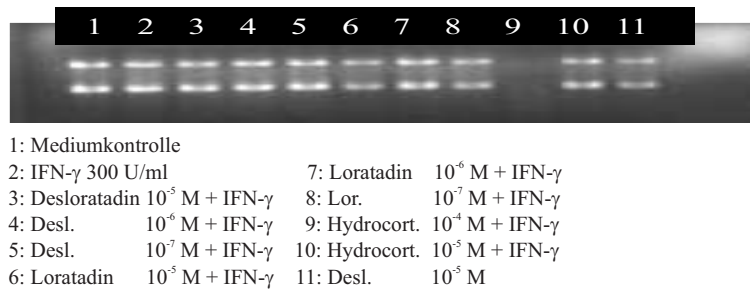


Abbildung 5.8: Nachweis intakter RNA-Banden in der Gelelektrophorese

## 5.5 Ergebnisse der PCR

Gegenstand der Polymerasekettenreaktion war die Darstellung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen und Chemokinen auf molekularer Ebene. Hierfür wurde aus den mit IFN- $\gamma$  stimulierten und mit Desloratadin, Loratadin oder Hydrocortison inkubierten Keratinozyten RNA isoliert. Diese wurde mittels rT-PCR in cDNA umgeschrieben. Untersucht wurden die Oberflächenmolekül- und Chemokin-Genexpressionsmuster von ICAM-1, DR- $\alpha$ , CXCL9, Fas-R und CXCL10 auf den Keratinozyten. Als Kontrolle fungierte das konstitutiv exprimierte Gen  $\beta$ -actin. Die Auswertung erfolgte nach 30 PCR-Zyklen. Die Abb. 5.9 bis 5.14 zeigen Ergebnisse der PCR. Die Auswertung erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

Je nach Stimulationsdauer (6 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden) stellten sich unterschiedliche Ergebnisse in der PCR dar. Die aussagekräftigsten Ergebnisse liessen sich nach kürzerer Stimulationszeit demonstrieren. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Veränderungen auf

RNA-Ebene zeitlich vor den Veränderungen in der Chemokinausschüttung bzw. der Expression von Zelladhäsionsmolekülen stattfinden müssen.

Abb. 5.9 zeigt einen Versuchsansatz, in dem über 48 Stunden mit IFN- $\gamma$  stimuliert wurde. Vergleicht man Bande 12 mit Bande 17, sieht man, dass bei gleichzeitiger Inkubation mit Desloratadin ( $c=10^{-5}M$ ) eine signifikante Herunterregulierung von ICAM-1 durch das Antihistaminikum erzielt wurde. Leider ließ sich der Versuch mit diesem Ergebnis nicht reproduzieren.

Auch zeigt diese PCR-Analyse keine Übereinstimmung mit den von uns erhobenen Erkenntnissen über die Hemmung der IFN- $\gamma$ -induzierten Expression von ICAM-1 auf humanen Keratinozyten, die von Hydrocortison ( $c=10^{-4}M$ ) nach 16 Stunden Stimulationszeit erzielt werden konnte, nicht jedoch durch Desloratadin (siehe Abb. 5.2).

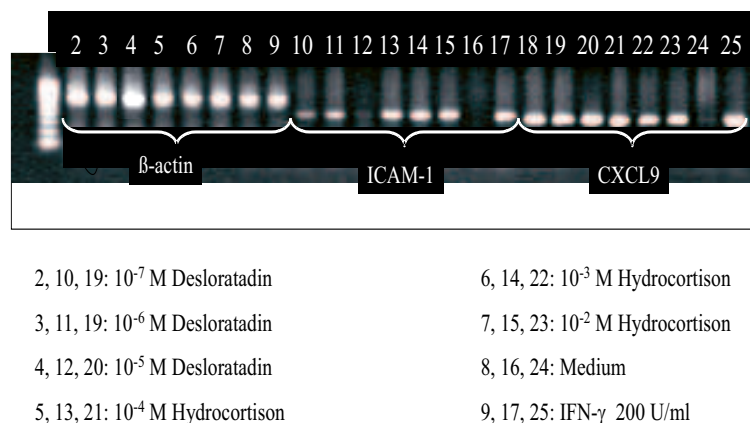


Abbildung 5.9: rT-PCR Analyse nach ICAM-1 und CXCL9 bei IFN- $\gamma$ -stimulierten Keratinozyten (200 U/ml), die mit Desloratadin und Hydrocortison vorbehandelt wurden. 48 Stunden Stimulationszeit, 30 Zyklen,  $n=1$ . Unbehandelte Keratinozyten (16, 24) exprimierten kein ICAM-1 oder CXCL9. Desloratadin reduzierte - im Gegensatz zu Hydrocortison - die IFN- $\gamma$ -induzierte Hochregulierung von ICAM-1 (12). Die Expression von CXCL9 blieb sowohl von Desloratadin als auch von Hydrocortison unbeeinflusst.

Abb. 5.10 zeigt einen Ansatz, in dem über 24 Stunden mit IFN- $\gamma$  stimuliert wurde. Verglichen mit der IFN- $\gamma$ -Kontrolle (jeweils Nr.2) ist keine Verminderung der IFN- $\gamma$ -induzierten Expression von ICAM-1, DR- $\alpha$ , CXCL9 oder Fas-R durch Desloratadin oder Hydrocortison zu erkennen.

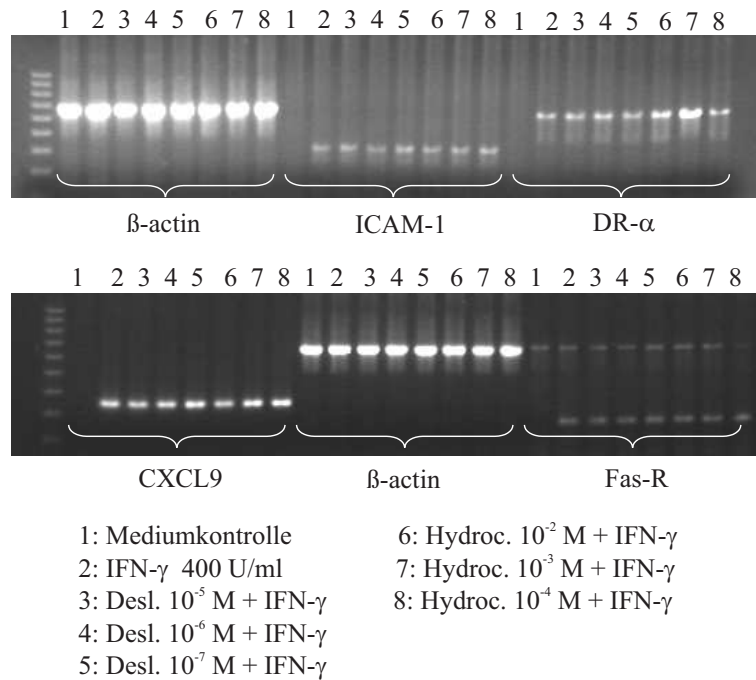


Abbildung 5.10: PCR mit ICAM-1, DR- $\alpha$ , CXCL9 und Fas-R. 24-stündige Stimulationszeit, 30 Zyklen, n=1. In den verschiedenen Banden zeigte sich kein Unterschied zwischen den nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten Keratinozyten und den zusätzlich mit Desloratadin oder Hydrocortison inkubierten Zellen.

Im Versuchsansatz, der in Abb. 5.11 wiedergegeben wird, wurde nur 6 Stunden lang mit IFN- $\gamma$  stimuliert. Vergleicht man hier die IFN- $\gamma$ -Kontrolle (jeweils Bande 2) mit den mit Hydrocortison ( $c=10^{-4}$ M) inkubierten Keratinozyten (jeweils Bande 9 bei ICAM-1 und DR- $\alpha$ ), ist die Fluoreszenzintensität in den letztgenannten Banden abgeschwächt. Dies lässt Rückschlüsse auf eine geringere Expression von ICAM-1 und DR- $\alpha$  zu. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit den im ELISA erhobenen Resultaten (sh. Abb. 5.2 und 5.4).

Auch Abb. 5.12 zeigt einen Versuchsansatz, in dem nur 6 Stunden lang mit IFN- $\gamma$  stimuliert wurde. Im Vergleich der Banden Nr.4 (ICAM-1/DR- $\alpha$ ) mit den Banden 2 im jeweiligen Abschnitt (nur IFN- $\gamma$ ), läßt die geringere Fluoreszenzintensität auf eine geringere Expression von ICAM-1 und DR- $\alpha$  durch Desloratadin in der Konzentration  $10^{-6}$  M Rückschlüsse ziehen. Wie schon in Abb. 5.9 beschrieben, zeigt Hydrocortison ( $10^{-4}$ M) hier wieder keinen Einfluss auf ICAM-1 und DR- $\alpha$ , wie im ELISA gezeigt werden konnte (sh. Abb. 5.2 und 5.4) und auch einmalig in der vorangestellten PCR (siehe Abb. 5.11).

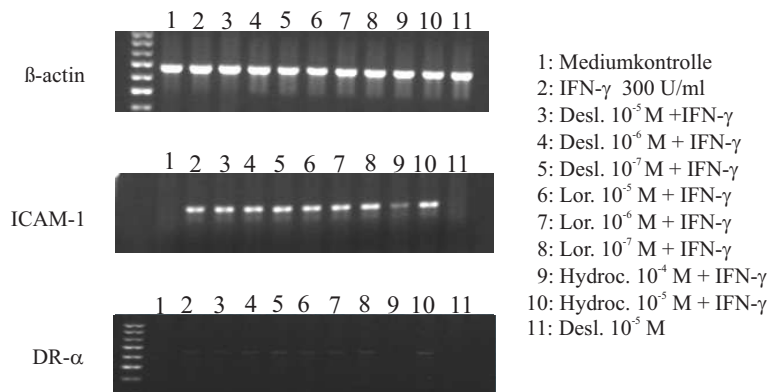


Abbildung 5.11: PCR mit ICAM-1 und DR-α, n=1. 6-stündige Stimulation mit IFN-γ (300 U/ml) nach 4-stündiger Vorinkubation mit Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison. Die Banden 9 bei ICAM-1 und DR-α stellen die mit IFN-γ und Hydrocortison 10<sup>-4</sup>M inkubierten Keratinozyten dar. Verglichen mit den Banden Nr.2 in der jeweiligen Reihe (nur IFN-γ) zeigte sich eine geringere Fluoreszenzintensität, was auf eine geringere Expression von ICAM-1 und HLA-Dr-α hinweist.

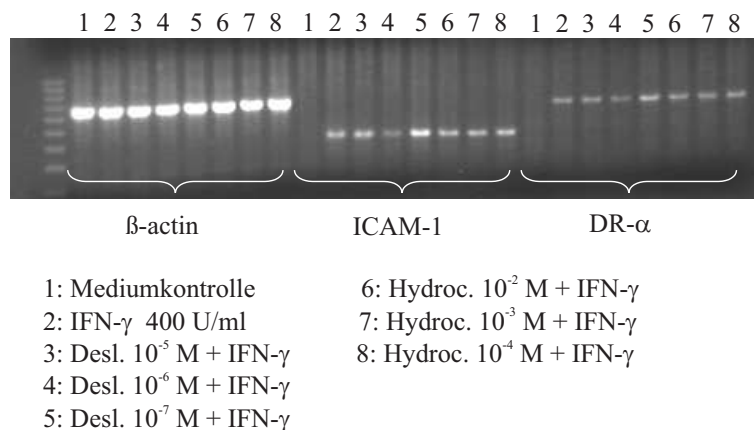


Abbildung 5.12: PCR mit ICAM-1 und Dr-α. 6 Stunden Stimulationszeit. 30 Zyklen, n=1. Vergleicht man die Banden Nr.4 mit den Banden Nr.2 (nur IFN-γ), so erkennt man eine Herunterregulierung von ICAM-1 und DR-α durch Desloratadin in der Konzentration 10<sup>-6</sup>M.

Abb. 5.13 stellt wiederum eine Stimulation über 6 Stunden dar. Hier wird gezeigt, dass Hydrocortison ( $c=10^{-4}$ M) die Expression von CXCL10 und CXCL9 herunterreguliert. In einer Wiederholungs-PCR und vergrößert wird dies noch einmal in Abb. 5.14 demonstriert. Dass Hydrocortison in dieser Konzentration in der Lage war, die IFN-γ-induzierte Ausschüttung von CXCL10 zu blockieren, ließ sich auch im ELISA demonstrieren (sh. Abb. 5.7).



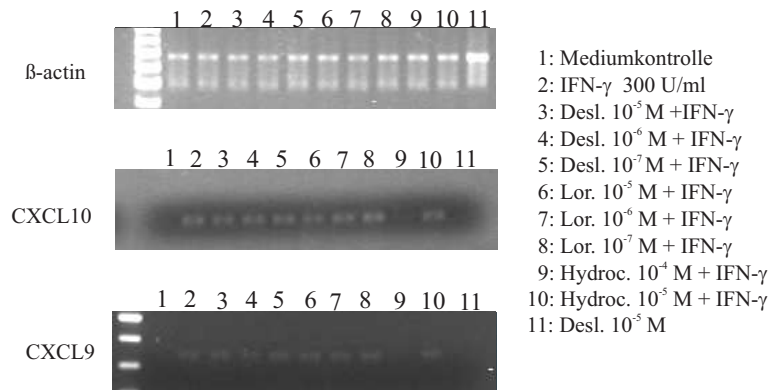


Abbildung 5.13: PCR mit CXCL10 und CXCL9. 6-stündige Stimulation mit IFN- $\gamma$  (300 U/ml) nach 4-stündiger Vorinkubation mit Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison. Die Banden Nr. 9 in der zweiten und dritten Reihe stellen die mit IFN- $\gamma$  und Hydrocortison  $10^{-4}$ M stimulierten Keratinozyten dar. Verglichen mit den Banden Nr. 2 (nur IFN- $\gamma$ ) zeigte sich eine geringere Fluoreszenzintensität, was auf eine geringere Expression von CXCL10 und CXCL9 hindeutet.

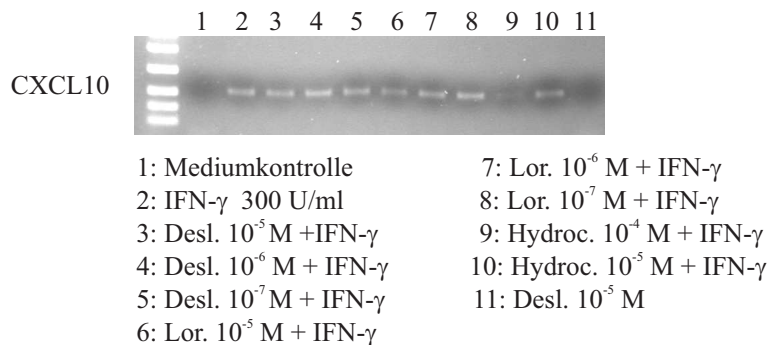


Abbildung 5.14: Wiederholung der vorher gezeigten PCR (sh. Abb. 5.13) mit CXCL10 nach 4-stündiger Vorinkubation mit Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison und anschließender Stimulation mit IFN- $\gamma$  über 6 Stunden. In der ersten Bande wurde der Marker aufgetragen. Bande Nr. 9 stellt die mit IFN- $\gamma$  stimulierten und mit Hydrocortison in der Konzentration  $10^{-4}$ M inkubierten Keratinozyten dar. Im Vergleich mit Bande Nr. 2, die die nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen repräsentiert, sieht man eine Herunterregulierung des IFN- $\gamma$ -induzierten Chemokins CXCL10 durch Hydrocortison.

## 5.6 Mit Desloratadin oder Loratadin vorbehandelte primäre Keratinozyten zeigen eine verminderte Kapazität, Neutrophile und Eosinophile anzuziehen

Wie in Abbildung 5.5 dargestellt, inhibierten Loratadin und Desloratadin die Freisetzung von CCL5 und CXCL8. Um zu untersuchen, ob diese Blockade der Freisetzung von Chemokinen zu einer funktionellen Beeinträchtigung der Migration von Entzündungszellen führt, wurden Überstände von mit IFN- $\gamma$  stimulierten und mit Loratadin und Desloratadin vorinkubierten Keratinozytenkulturen für Migrationsstudien herangezogen. Keratinozyten wurden über 24 Stunden mit IFN- $\gamma$  (300 U/ml) stimuliert. Voraus ging eine Vorinkubation über vier Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Loratadin oder Desloratadin ( $10^{-6}$ M -  $10^{-4}$ M). Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Überstände steril filtriert und in Migrationsstudien eingesetzt.

### Desloratadin und Loratadin blockieren die Chemoattraktion von Neutrophilen durch humane Keratinozyten

Wie aus Abb. 5.15 abzulesen ist, inhibierten Desloratadin (A) und Loratadin (B) beide dosisabhängig die Freisetzung von konstitutiven (Medium-Stimulation) und IFN- $\gamma$ -induzierten Chemoattraktantien für humane neutrophile Granulozyten. Ein direkter Effekt der Antihistaminika auf die Migration von Neutrophilen wurde bei der Experimentplanung durch einen Mediumwechsel nach 24 Stunden und gründliches Waschen ausgeschlossen. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von drei im Duplikat durchgeführten Versuchen.

Wie in Abb. 5.5 dargestellt, wurde die Ausschüttung von CXCL8 durch Desloratadin und Loratadin signifikant geblockt. Dies lässt den Rückschluss zu, dass CXCL8 in den Überständen der Keratinozytenkulturen dasjenige Chemokin ist, das für die Induktion der Migration neutrophiler Granulozyten die Hauptverantwortung trägt, da es *in-vivo* selektiv Neutrophile dazu anregt, in verletztes oder entzündetes Gewebe einzuwandern [Hebert 1991].

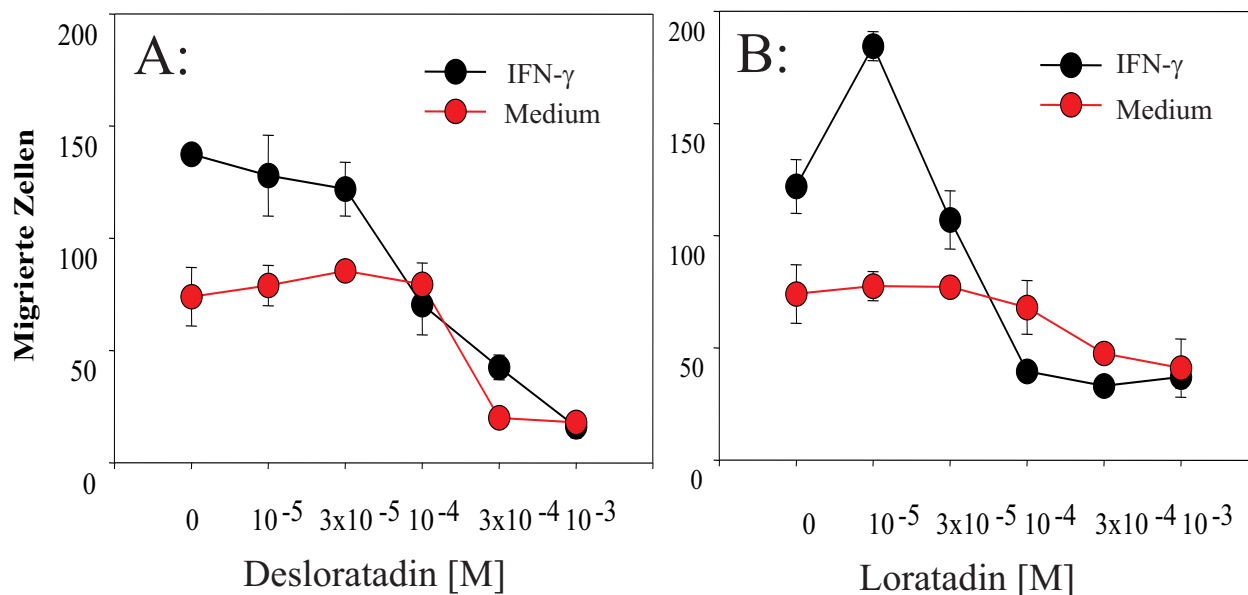


Abbildung 5.15: *Desloratadin und Loratadin blockieren die Chemoattraktion von Neutrophilen durch humane Keratinozyten.* Je höher die eingesetzte Konzentration der Antihistaminika, desto geringer war die Zahl der migrierenden Neutrophilen.

#### Desloratadin und Loratadin blockieren dosis-abhängig die Chemoattraktion von Eosinophilen durch humane Keratinozyten

Die Abb. 5.16 zeigt darüber hinaus, dass eine Reduktion in der Chemokinfreisetzung der mit Desloratadin und Loratadin vorinkubierten Keratinozyten auch zu einer funktionellen Verminderung der Migration humaner eosinophiler Granulozyten beitrug. CCL5 wirkt vor allem auf basophile und eosinophile Granulozyten chemoattraktiv [John 1997].

Interessant ist hierbei, dass CCL5 (und daraus resultierend eine verminderte Eosinophilenmigration auf die Überstände der mit Desloratadin und Loratadin vorbehandelten Keratinozyten hin) der sensibelste Parameter in dieser Versuchsanordnung war. Dieses Ergebnis lässt auf einen besonders interessanten anti-entzündlichen Wirkmechanismus der beiden Antihistaminika schließen (sh. Abb. 5.5).

Bemerkenswert ist, dass auch die konstitutive Expression der für die eosinophile und neutrophile Migration verantwortlichen Chemoattraktanzien signifikant durch Desloratadin und Loratadin geblockt wurde (sh. Abb. 5.5). Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von drei im Duplikat durchgeführten Versuchen.

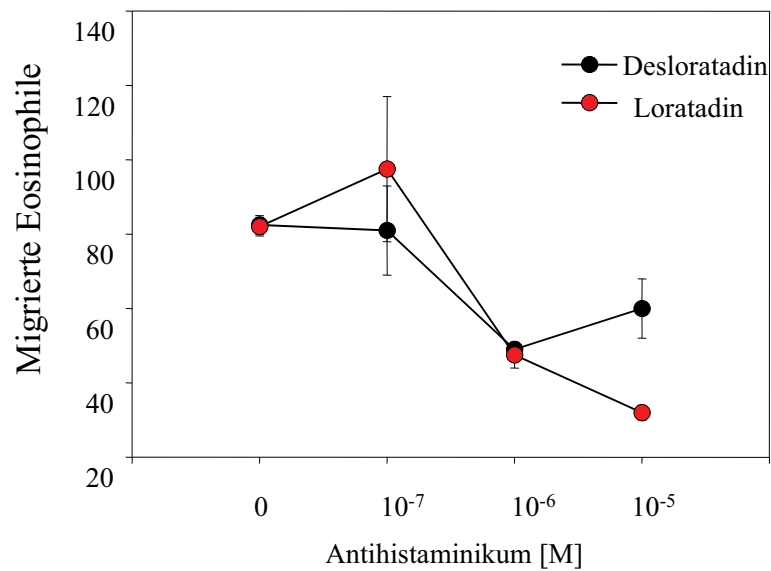


Abbildung 5.16: *Desloratadin und Loratadin blockieren dosisabhängig die Freisetzung chemotaktischer Faktoren für eosinophile Granulozyten aus humanen Keratinozyten. Je höher die eingesetzte Konzentration der Antihistaminika, desto geringer war die Zahl der migrierenden Eosinophilen.*

# Kapitel 6

## Diskussion

### 6.1 Ausgewählte Angriffspunkte in der Bekämpfung entzündlicher Hauterkrankungen

Als Hauptaufgabe von Keratinozyten wird der Aufbau der Epidermis und somit die Aufrechterhaltung von struktureller und physikalischer Integrität der äußersten Schicht der Haut angesehen. Die Sicherstellung eines Schutzes vor Verletzungen aus der Aussenwelt wird somit gewährleistet. Darüber hinaus produzieren Keratinozyten noch zahlreiche antimikrobielle Peptide, die die Haut gegen mikrobielle Angriffe schützen [Leung 2003].

Keratinozyten nehmen auch aktiv an der Initiierung und Regulation von Entzündungsreaktionen der Haut teil. Sie können eine Vielzahl von Zytokinen mit pro-inflammatorischer und anti-inflammatorischer Aktivität synthetisieren und freisetzen [Pastore 1996]. Darüber hinaus sind sie in der Lage Chemokine auszuschütten, die Entzündungszellen anlocken, [Albanesi 1998/1] und an ihrer Oberfläche Membranmoleküle zu exprimieren, die die Anwesenheit von T-Zellen in der Epidermis, sowie deren Aktivierung steuern. Diese Aktivitäten spielen sich unter anderem bei chronisch inflammatorischen Hauterkrankungen wie der Psoriasis, der Kontaktdermatitis oder dem atopischen Ekzem ab [Johansson 2003].

Von den auf der Oberfläche der Keratinozyten präsenten Membranmolekülen ist ICAM-1 eines der wichtigsten. Es wird von Keratinozyten bei einer Vielzahl von Hauterkrankungen

exprimiert [Griffiths 1989, Bennion 1995, Fritsch 2004]. Die Expression von ICAM-1 durch Keratinozyten kann sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* durch IFN- $\gamma$  induziert werden, weniger effizient auch durch TNF- $\alpha$  [Bennion 1995, Albanesi 1998/1]. Während IFN- $\gamma$  in erster Linie von T-Lymphozyten produziert wird, kann TNF- $\alpha$  von einer Vielzahl von Zellen, einschließlich der Keratinozyten selbst, freigesetzt werden.

In zahlreichen Studien wurde bisher beschrieben, dass die Expression von ICAM-1 auf Keratinozyten eine Rolle bei der Retention von T-Zellen in der Epidermis darstellt und darüber hinaus ein co-stimulatorisches Signal bei der Aktivierung von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten [Kalish 1989, Nickoloff 1994]. Aus diesem Grunde scheint die Expression von ICAM-1 auf Keratinozyten ein wichtiger Angriffspunkt zu sein, um T-Zell-medierte Hauterkrankungen abzuschwächen. Parallel zu ICAM-1 regulieren mit IFN- $\gamma$  stimulierte Keratinozyten auch die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen (HLA-ABC) nach oben und exprimieren das konstitutiv nicht zu findende MHC-Klasse-II-Molekül (HLA-DR). MHC-Klasse-II+ Keratinozyten fungieren fortan als sogenannte „nicht-professionelle“ Antigen-präsentierende Zellen und besitzen somit die Fähigkeit, den T-Zellen Antigene zu präsentieren [Nickoloff 1994]. In einer von Traidl et al. veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass mit IFN- $\gamma$  stimulierte Keratinozyten sowohl ICAM-1, als auch MHC-Klasse-II Moleküle exprimieren, und dadurch empfänglich für Th1-medierte Zytotoxizität wurden, eine Tatsache, die bei der epidermalen Gewebeschädigung durch die allergische Kontaktdermatitis eine wichtige Rolle zu spielen scheint [Traidl 2000].

## **6.2 Einfluß von Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison auf entzündliche Prozesse in der Haut**

### **6.2.1 Einfluß der Antihistaminika und des Glukokortikoids auf die Expression von Zelladhäsionsmolekülen**

In der vorliegende Arbeit wurde untersucht, ob die Antihistaminika Desloratadin und Loratadin und das Glukokortikoid Hydrocortison die Fähigkeit besitzen, die Freisetzung ver-

schiedener Chemokine und die Expression von Membranmolekülen durch stimulierte humane Keratinozyten zu inhibieren. Um einzuschätzen, ob Desloratadin und Loratadin bestimmte Schritte eines entzündlichen Prozesses innerhalb der Epidermis blockieren können, wählten wir als ein *in-vitro*-Modell der kutanen Entzündung die Stimulation humaner Keratinozyten mit IFN- $\gamma$ .

Unsere Ergebnisse bestätigen, dass ICAM-1 und HLA-DR konstitutiv nicht auf Keratinozyten exprimiert werden. Durch Stimulation mit IFN- $\gamma$  wird die transiente Expression von hohen Mengen von ICAM-1 und geringeren Mengen HLA-DRs induziert. Auch HLA-ABC wird stark hochreguliert. Darüber hinaus bewirkt der inflammatorische Stimulus IFN- $\gamma$  eine starke Sekretion von Chemokinen. Desloratadin, das in der höchsten eingesetzten Konzentration ( $c=10^{-5}$  M) ohne zusätzlichen Stimulus als Kontrolle untersucht wurde, bewirkte in allen Versuchen, verglichen mit der Mediumkontrolle, keine Induktion der Expression von Zelladhäsionsmolekülen und auch keine Ausschüttung von Chemokinen.

Während Albanesi et al. [Albanesi 1998/1] eine Hemmung der IFN- $\gamma$ -induzierten ICAM-1-Expression auf den Keratinozyten durch das Antihistaminikum Cetirizin beschrieben, konnte dies in unseren fluoreszenzzytometrischen Versuchen mit den Antihistaminika Desloratadin und Loratadin nicht bestätigt werden. Hydrocortison wirkte jedoch in hohen Konzentrationen ( $>10^{-5}$ M) hemmend auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Expression von ICAM-1 und MHC-Klasse-II. Loratadin ( $\geq 10^{-5}$ M) und Hydrocortison ( $10^{-4}$ M) in hohen Konzentrationen verhinderten darüber hinaus die Hochregulierung von MHC-Klasse-I. Desloratadin zeigte keinen Einfluss auf die konstitutive oder IFN- $\gamma$ -induzierte Expression der drei Membranmoleküle.

Die für Desloratadin beschriebenen hemmenden Effekte auf die Expression von ICAM-1 und HLA-DR, die in vorausgehenden Studien an Epithelzellen [Vignola 1995, Papi 2001] mit identischer Desloratadinkonzentration beschrieben wurden, lassen sich also für Keratinozyten in unseren Versuchen nicht bestätigen. Auch Loratadin musste in unserem Versuchsansatz in höherer Konzentration eingesetzt werden um denselben hemmenden Effekt auf Keratinozyten auszuüben, wie zuvor für Epithelzellen beschrieben worden war [Vignola 1995, Papi 2001].

Wie bei Albanesi et al. dargestellt wird [Albanesi 1998/1], inhibiert Hydrocortison in hoher Dosierung ( $10^{-4}\text{M}$ ) die HLA-DR-Expression. Dies wurde von uns bestätigt. Im Widerspruch zu Albanesi et al. inhibierte Hydrocortison in unseren Versuchen auch die IFN- $\gamma$ -induzierte Expression von ICAM-1 auf den Keratinozyten, sowie die Expression von HLA-ABC. Bei Albanesi et al. stieg die IFN- $\gamma$ -induzierte Expression von ICAM-1 durch Hydrocortison noch an, auf HLA-ABC zeigte es keinen Einfluss.

Albanesi et al. führen dies auf die Tatsache zurück, dass Glukokortikoide ihre Wirkung über eine Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B ausüben, der eingesetzte Stimulus IFN- $\gamma$  sich jedoch anderer Signaltransduktionswege bedient [Baldwin 1996, Albanesi 1998/1]. Andere Autoren beschreiben jedoch eine Reduktion von ICAM-1 auf Zellarten, wie Endothelzellen und Epithelzellen durch Glukokortikoide [Cronstein 1992, Paolieri 1997, Wheller 1997, Papi 2001], wie auch wir sie fanden.

Auch in diesen Studien wurde IFN- $\gamma$  als Stimulus eingesetzt, obwohl es nicht über den NF- $\kappa$ B-Weg wirkt [Paolieri 1997]. Dies liefert also keine suffiziente Erklärung für eine mögliche mangelnde Wirksamkeit von Glukokortikoiden. Abhängig ist der Effekt auf ICAM-1 und HLA-ABC wahrscheinlich von der Potenz des eingesetzten Glukokortikoid, sowie dessen Konzentration [Kashihara-Sawami 1992, Cronstein 1992, Paolieri 1997, Wheller 1997, Papi 2001].

### **6.2.2 Einfluß der Antihistaminika und des Glukokortikoids auf die Freisetzung von Chemokinen**

Chemokine und ihre Rezeptoren spielen eine bedeutende Rolle bei der Einwanderung von Leukozyten an Entzündungsorte. Aus den von Keratinozyten synthetisierten und freigesetzten Chemokinen wurden in dieser Arbeit vier herausgegriffen und näher untersucht. Unter den C-X-C Chemokinen ist CXCL8 wichtig bei der Rekrutierung von Neutrophilen und T-Lymphozyten. CXCL10 hingegen lockt Th1-Zellen an. Das zu der C-C - Familie der Che-



mokine gehörende CCL17 ist hingegen spezialisiert auf die Rekrutierung von Th2-Zellen. CCL5 ist wiederum ein starker chemotaktischer Faktor für T-Zellen und Eosinophile.

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass als Reaktion auf die Stimulation mit IFN- $\gamma$  hohe Mengen der Chemokine CCL5 und CXCL10, eine moderate Menge an CXCL8, sowie eine vernachlässigbare Anzahl CCL17 ausgeschüttet werden. Hohe Dosen von Hydrocortison ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$ M), sowie von Loratadin ( $10^{-5}$ M) inhibierten die IFN- $\gamma$ -induzierte Ausschüttung von CCL5 und CXCL8 signifikant. Diese Effekte sind jedoch hinsichtlich der Stimulationsdauer unterschiedlich - bei CCL5 zeigt sich die beste Wirksamkeit der Medikamente nach 45-stündiger Stimulation, bei CXCL8 jedoch nach 16-stündiger Stimulation. Auch Desloratadin wirkte reduzierend auf die IFN- $\gamma$ -induzierte CCL5- und CXCL8-Ausschüttung, allerdings weniger potent als die übrigen getesteten Therapeutika. Wiederum stehen diese Ergebnisse im Widerspruch zu Albanesi et al., in deren Versuchen ein induzierender Effekt von Hydrocortison auf die Freisetzung von CCL5 gezeigt werden konnte [Albanesi 1998/1].

Eine hemmende Wirkung auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Ausschüttung von CCL17 konnte in dieser Arbeit nur durch Hydrocortison in hoher Dosierung ( $10^{-4}$ M) gezeigt werden. Die Antihistaminika zeigten hier keine Wirkung. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits zuvor von Tokura et al. beschrieben [Tokura 2003]. In der genannten Studie konnte die CXCL10-Produktion durch Keratinozyten durch das Antihistaminikum Olopatadine in den Konzentrationen  $10^{-5}$ M und  $10^{-6}$ M nicht beeinflusst werden. Der Autor stellt die Frage in den Raum, ob hierfür höhere Dosierungen des Antihistaminikums notwendig wären. Allerdings könnte man auch die Hypothese aufstellen, ob einige Antihistaminika selektiv auf bestimmte Moleküle wirken, bzw. keinen Einfluss auf diese haben. So stellten Albanesi et al. fest, dass Cetirizin keinen Einfluss auf die konstitutive und IFN- $\gamma$ -induzierte Expression des Membranmoleküls CD40 auf Keratinozyten aufwies [Albanesi 1998/1].

Auf die sehr starke Freisetzung von CXCL10 hatten beide Antihistaminika eine deutlich hemmende Wirkung. Die IC<sub>50</sub> lag hier jeweils bei  $10^{-5}$ M. Auch Hydrocortison ( $10^{-4}$ M) gelang es, die Ausschüttung von CXCL10 zu supprimieren, allerdings nur bei kurzer Stimulationszeit.

Wir konnten also zeigen, dass Loratadin und - jedoch schwächer - auch sein aktiver Metabo-

lit Desloratadin die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung von CXC und CC Chemokinen inhibieren können. Diese Beobachtung wurde durch funktionelle Studien bestätigt, in denen gezeigt werden konnte, dass die chemotaktische Aktivität von mit IFN- $\gamma$  stimulierten Keratinozyten auf eosinophile und neutrophile Granulozyten stark reduziert wurde, wenn sie mit den Antihistaminika inkubiert wurden.

Wesentlich stärker jedoch als die untersuchten Antihistaminika, wirkte in allen Versuchsansätzen das als Vergleichssubstanz eingesetzte Hydrocortison.

Bei höheren Konzentrationen von Hydrocortison als  $10^{-4}$ M stellten Albanesi et al. einen toxischen Effekt fest [Albanesi 1998/1]. Die Toxizität von Hydrocortison wurde in unseren Versuchen nicht getestet, allerdings konnten in unserer Arbeit schon bei der noch nicht toxisch wirkenden Konzentration von  $10^{-4}$ M gute antiinflammatorische Wirkungen des Steroids nachgewiesen werden. Desloratadin und Loratadin üben in den von uns eingesetzten Konzentrationen keine toxische Wirkung auf die Keratinozyten aus.

Vergleicht man die Potenz der beiden untersuchten Antihistaminika, so zeigte Loratadin eine deutlich stärkere Wirksamkeit. Diese Beobachtung stimmt nicht mit der beschriebenen höheren Affinität von Desloratadin zum Histaminrezeptor überein. Andererseits unterstreicht es die Vermutung, dass die Inhibition der Chemokinfreisetzung durch diese Antihistaminika nicht an eine Wirkung am Histaminrezeptor gekoppelt ist.

### **6.2.3 Kongruenz der erzielten Ergebnisse auf molekularer Ebene**

Auf mRNA-Ebene konnte in dieser Arbeit in einigen Versuchen ein inhibitorischer Effekt von Desloratadin ( $10^{-5}$  und  $10^{-6}$ M) auf die Expression von ICAM-1 und HLA-DR, sowie Hydrocortison ( $10^{-4}$ M) auf ICAM-1, HLA-DR, CXCL10 und CXCL9 nachgewiesen werden. Was Hydrocortison betrifft, stimmen diese Werte mit den in der durchflusszytometrischen Analyse erhobenen Ergebnissen für ICAM-1 und HLA-DR überein. Auch konnte ein supprimierender Effekt auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Freisetzung des Chemokins CXCL10 durch Hydrocortison in der Untersuchung der Überstände festgestellt werden.

Die molekularbiologischen Ergebnisse der Wirkung von Desloratadin auf ICAM-1 und HLA-

DR liessen sich in der Durchflusszytometrie jedoch nicht bestätigen.

Hinzu kommt, dass die Anzahl der durchgeführten Versuche mit  $n=1$  in der 6-stündigen Stimulation nicht als repräsentativ gelten kann. Um repräsentative Werte zu erhalten, müssten die Versuche nochmals überprüft werden.

#### **6.2.4 Einfluss von Stimulationszeit und Dosierung der getesteten Substanzen und klinische Relevanz der erzielten Ergebnisse**

Die molekularen Mechanismen der antiallergischen Effekte von Antihistaminika liegen noch weitgehend im Dunkeln. Diskutiert werden eine mögliche Inhibierung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Aufnahme nach Stimulation mit Substanzen, die den  $Ca^{2+}$ -Fluss modulieren, wie anti-IgE, PMA oder A23187. Eine andere Möglichkeit wäre eine Stabilisierung von Zellmembranen oder eine Kombination beider Mechanismen [Akagi 1983, Tasaka 1986, Lippert 1995]. Es besteht darüber hinaus die Möglichkeit, dass bestimmte H1-Rezeptor-Antagonisten Calmodulin inhibieren, das ein integraler Bestandteil bei der Mediator-Freisetzung zu sein scheint [Marone 1983].

Wu et. al. zeigten vor kurzem, dass Desloratadin einen inhibitorischen Effekt auf die konstitutive und Histamin-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung besitzt [Wu 2004]. Da NF- $\kappa$ B für zahlreiche immunregulatorische Gene verantwortlich ist, unter anderem für ICAM-1, MHC-Klasse-I, CXCL8 und CCL5 [Baldwin 1996], könnten die inhibitorischen Effekte von Loratadin und Desloratadin auf die NF- $\kappa$ B-Signalgebung eine Rolle bei der konstitutiven Expression von CXCL8 und CCL5 spielen.

IFN- $\gamma$  bedient sich jedoch anderer Signalübertragungswege. Diese basieren in erster Linie auf der Aktivierungskaskade von Janus-Kinasen und STAT-Molekülen, sowie der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, die bestimmte reagible Elemente in der Promotorregion von inflammatorischen Genen erkennen [Farrar 1993]. Schlüsselstellen bei der Signaltransduktion durch IFN- $\gamma$  in Keratinozyten beinhalten eine Aktivierung von Jak1 und Jak2, gefolgt von

einer IFN- $\gamma$ R $\alpha$ -Phosphorylierung und einem Triggern von STAT1.

So werden zum Beispiel ICAM-1, der Klasse-II-Transaktivator, CXCL10, CXCL9 und CCL2 alle stark auf mit IFN- $\gamma$  behandelten Keratinozyten exprimiert, und durch STAT1 auf transkriptionaler Ebene streng reguliert.

Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Inhibierung der IFN- $\gamma$ -induzierten Produktion von CXCL8 und CCL5 in unseren Versuchen sehr wahrscheinlich zum einem Teil auf einem anderen Wege erfolgt, der unabhängig von NF- $\kappa$ B ist.

Jedoch auch Glukokortikoide üben ihre anti-inflammatorischen Mechanismen primär über eine Inhibierung von NF- $\kappa$ B aus [Baldwin 1996]. Ein antiinflammatorischer Effekt konnte auch für sie nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden [Paolieri 1997]. Der Mechanismus, über den antiinflammatorische Effekte von Glukokortikoiden und Antihistaminika wirken, bleibt also immer noch Gegenstand zukünftiger Forschungen.

In dieser Arbeit wurden zudem unterschiedliche Stimulationszeiten eingesetzt. Die zuvor vier Stunden mit Desloratadin, Loratadin und Hydrocortison präinkubierten Keratinozyten wurden im Anschluss über jeweils 16, 24 und 48 Stunden mit dem Stimulus IFN- $\gamma$  inkubiert. Hinsichtlich der verschiedenen Stimulationszeiten zeigen sich auch unterschiedliche Ergebnisse. Im Allgemeinen scheint der Effekt der Antihistaminika und des Glukokortikoids nach längerer Stimulationszeit nachzulassen. Eine Ausnahme bildet hierbei CCL5, dessen IFN- $\gamma$ -induzierte Expression sowohl durch Desloratadin und Loratadin, als auch durch Hydrocortison eine Herunterregulierung erfährt, die nicht abhängig von der Stimulationszeit ist. *In-vivo* wird aufgrund der Metabolisierung im Körper eine 24-stündliche Einnahme der Antihistaminika empfohlen.

Wir stellen in dieser Arbeit also fest, dass Loratadin ( $c=10^{-5}$ M), Desloratadin ( $c=10^{-5}$ M) und Hydrocortison ( $10^{-4}$ - $10^{-5}$ M) die IFN- $\gamma$ -induzierte Aktivierung von Keratinozyten hemmen. Diese Dosen scheinen allerdings nicht mit den physiologischen Dosierungen der Medikamente übereinzustimmen.

Laut Molet et al. [Molet 1997] wird eine Loratadin-Konzentration von  $10^{-5}$ M *in-vivo* nie erreicht. Die maximal bei Menschen gemessene Serumkonzentration von Loratadin, 1 Stunde

nach einer oralen Einzelgabe von 10mg Loratadin, betrug ungefähr  $5 \times 10^{-8} \text{M}$ . Ein signifikanter Effekt von Loratadin auf die stimulierten Keratinozyten wurde in dieser Studie bei dieser Konzentration nicht mehr gemessen.

Laut Genovese et al. sind die in ihren Versuchen eingesetzten Konzentrationen von Desloratadin und Loratadin ( $3 \times 10^{-6} - 10^{-4} \text{M}$ ) jedoch pharmakologisch wirksam [Genovese 1997].

Auch Lippert beschrieb 1995 [Lippert 1995], dass die von ihm eingesetzten Konzentrationen von Loratadin ( $10^{-6} \text{M} - 10^{-11} \text{M}$ ) durchaus klinisch relevanten Levels entsprachen. Zu klären bleibt also immer noch, inwieweit die eingesetzten Konzentrationen der Medikamente einem angemessenen klinischen Level entsprechen.

Der Versuchsaufbau stellt ein *in-vitro* Modell einer Th1-medierten entzündlichen Hautveränderung dar. Die erhobenen Daten könnten nahelegen, dass Loratadin und, in schwächerem Maße, Desloratadin, durch ihre Inhibierung der untersuchten Chemokine, eine Rolle bei der Herunterregulierung der Spätphase-Reaktion und hierbei speziell bei der Leukozyten-Rekrutierung spielen könnten.

Zusammengefasst deuten die Resultate der vorliegenden Arbeit an, dass Desloratadin und Loratadin die IFN- $\gamma$ -induzierte Aktivierung von kultivierten primären Keratinozyten inhibieren können. Die Konzentrationen jedoch, die für eine Inhibierung der Ausschüttung von CCL5 und CXCL8 benötigt wurden, scheinen viel höher, zu sein, als diejenigen, die im Plasma bei einer regulären oralen Einnahme von 5 bzw. 10 mg/Tag erzielt werden [Michel 1988, Simons 1995]. Aus diesem Grunde ist denkbar, dass eine höhere Dosierung von Desloratadin oder Loratadin oder auch eine topische Applikation eingesetzt werden sollte, um sich diese antiinflammatorischen Effekte nutzbar zu machen [Caproni 1995].

# Kapitel 7

## Zusammenfassung

Desloratadin ist ein H1-Histamin-Antagonist, welcher zudem antiinflammatorische Fähigkeiten besitzt. So inhibiert es die Aktivierung von Leukozyten und reduziert die ICAM-1-Expression auf Epithelzellen. Keine Studie hat sich bisher den möglichen antiinflammatorischen Effekten von Desloratadin und Loratadin auf Keratinozyten in der menschlichen Haut gewidmet.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Antihistaminika Desloratadin und Loratadin einen antiinflammatorischen Effekt auf mit IFN- $\gamma$  stimulierte primäre humane Keratinozyten ausüben. Als Vergleichssubstanz wurde das Glukokortikoid Hydrocortison eingesetzt. Untersucht wurden die Expression von immunomodulatorischen Zelladhäsionsmolekülen, sowie die Ausschüttung von Chemokinen.

Keratinozytenkulturen aus normaler Haut gesunder Probanden wurden zunächst über vier Stunden mit den Antihistaminika ( $10^{-5}$ - $10^{-7}$ M) und Hydrocortison ( $10^{-4}$ - $10^{-5}$ M) präinkubiert. Daran schloss sich eine 16, 22 oder 48-stündige Stimulierung mit IFN- $\gamma$  (300 U/ml) an. Die Zellen wurden auf die Expression der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1, HLA-ABC und -DR untersucht. Die Überstände der Zellkulturen auf die Freisetzung der Chemokine CCL5, CXCL8, CXCL10 und CCL17. Darüber hinaus wurden die Überstände der unterschiedlich

stimulierten Keratinozyten für Migrationsstudien von humanen neutrophilen und eosinophilen Granulozyten herangezogen. Auf molekularer Ebene wurden die Ergebnisse mittels Polymerasekettenreaktion geprüft.

Hydrocortison ( $10^{-4}\text{M}$ ) inhibierte die Freisetzung von ICAM-1, HLA-ABC und HLA-DR. Loratadin ( $10^{-5}\text{M}$ ) inhibierte nur die Freisetzung von HLA-ABC schwach. Desloratadin hatte keinen Einfluss auf die IFN- $\gamma$ -induzierte Expression von Membranmolekülen.

Hydrocortison ( $10^{-5}$ - $10^{-4}\text{M}$ ) blockierte die Ausschüttung von CCL5, CXCL8, CCL17 und CXCL10. Loratadin und Desloratadin ( $10^{-5}\text{M}$ ) hemmten ebenfalls die Freisetzung von CCL5, CXCL8 und CXCL10, wobei Loratadin sich als potenter präsentierte. Beide Antihistaminika übten einen hemmenden Einfluss auf die Migration von Neutrophilen ( $10^{-3}$ - $10^{-4}\text{M}$ ) und Eosinophilen ( $10^{-5}$ - $10^{-6}\text{M}$ ) aus. Auf mRNA Ebene konnte für Desloratadin ( $10^{-6}\text{M}$ ) eine hemmende Wirkung auf ICAM-1 und HLA-DR dargestellt werden, sowie auf ICAM-1, HLA-DR, CXCL10 und CXCL9 durch Hydrocortison ( $10^{-4}\text{M}$ ).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass beide Antihistaminika die Fähigkeit besitzen, die IFN- $\gamma$ -induzierte Aktivierung von Keratinozyten zu blockieren, wobei Loratadin die stärkere Potenz besitzt. Hydrocortison stellte sich in unseren Versuchen als stärkster Inhibitor der IFN- $\gamma$ -induzierten Aktivierung der Keratinozyten dar. Alle drei getesteten Therapeutika können folglich wichtige regulatorische Effekte auf zell-mediierte Immunantworten in der Haut ausüben. Die eher hohen Dosierungen, die für die untersuchten Effekte eingesetzt werden mussten, sprechen für eine topische Anwendung in der therapeutischen Nutzung von Desloratadin oder Loratadin bei entzündlichen Prozessen in der Haut.

# Literaturverzeichnis

[Abbas 1996] Abbas, Abul K.: Immunologie/Abul K. Abbas; Andrew H. Lichtman; Jordan S. Pober. Übers. von Beda M. Stadler und Max Hess. - Bern; Göttingen; Toronto; Seattle: Huber, 1996 Einheitssacht.: Cellular and molecular immunology -dt.- ISBN 3-456-82596-X

[Affrime 2002/1] Affrime, M., Banfield, C., Gupta, S., Cohen, A., Boutros, T., Thonoor, M., Cayen, M. (2002). Effect of race and sex on single and multiple dose pharmacokinetics of desloratadine. Clin Pharmacokinet 2002; 41 Suppl 1:21-8.

[Affrime 2002/2] Affrime, M., Gupta, S., Banfield, C., Cohen, A. (2002). A pharmacokinetic profile of desloratadine in healthy adults, including elderly. Clin Pharmacokinet 2002; 41 Suppl 1:13-9.

[Akagi 1983] Akagi, M., Mio, M., Okamoto M. (1983). Histamine release inhibition and prevention of the decrease in membrane fluidity induced by certain anti-allergic drugs: Analysis of inhibitory mechanisms of NCO-650. Agents Actions 1983:13:149-156.

[Albanesi 1998/1] Albanesi, C., Pastore, S., Fanales-Belasio, E., Girolomoni, G. (1998). Cetirizine and hydrocortisone differentially regulate ICAM-1 expression and chemokine release in cultured human keratinocytes. Clinical and Experimental Allergy, 1998, 28, 101-109.



- [Albanesi 1998/2] Albanesi, C., Cavani, A., Girolomoni, G. (1998). Interferon-gamma-stimulated human keratinocytes express the genes necessary for the production of peptide-loaded MHC class II molecules. *J Invest Dermatol* 1998;110:138-42.
- [Albanesi 1999] Albanesi, C., Cavani, A., Girolomoni, G. (1999). IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *J Immunol* 1999;162:494-502.
- [Albanesi 2000] Albanesi, C., Scarponi, C., Sebastiani, S., Cavani, A., Federici, M., de Pita, O., Puddu, P., Girolomoni G. (2000). IL-4 enhances keratinocyte expression of CXC3 agonistic chemokines. *J Immunol* 2000;165:1395.
- [Andersson 1991] Andersson, M., Nolte, H., Baumgarten, C., Pipkorn, U. (1991). Suppressive effect of loratadine on allergen-induced histamine release in the nose. *Allergy* 1991; 46:540-6.
- [Bachert 1990] Bachert, C., Prohaska, P., Pipkorn, U. (1990). IgE-positive mast cells on the human nasal mucosal surface in response to allergen exposure. *Rhinology*. 1990 Sep; 28(3):149-58.
- [Bachert 1995] Bachert, C., Wagenmann, M., Hauser, U. (1995). Proinflammatory cytokines: measurement in nasal secretion and induction of adhesion receptor expression. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995 May-Jun; 107(1-3):106-8.
- [Bachert 1998/1] Bachert, C., Wagenmann, M., Holtappels, G. (1998). Cytokines and adhesion molecules in allergic rhinitis. *Am J Rhinol*. 1998 Jan-Feb; 12(1):3-8.
- [Bachert 1998/2] Bachert, C. Histamine - a major role in allergy? (1998). *Clin Exp Allergy*, 1998; 28 (Suppl. 6):15-9.
- [Bachert 2001/1] Bachert, C. (2001). Abschwellende Wirkung von Desloratadin bei Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis. *Allergy* 2001; 56: 17-25.

- [Bachert 2001/2] Bachert, C. (2001). Editorial: Mögliche Kriterien für die dritte Generation von Antihistaminika. *Allergologie*, Jahrgang 24, Nr. 12/2001, S. 561-562.
- [Bachert 2002/1] Bachert, C., Lange, B. (2002). Desloratadin: Profil eines modernen Antihistaminikums. *Allergologie*, Jahrgang 25, Nr. 1/2002, S.24-33.
- [Bachert 2002/2] Bachert, C., Lange, B. (Übersetzer) (2002). Das Management der allergischen Rhinitis und ihr Einfluß auf das Asthma. *Allergologie*, Jahrgang 25, Nr. 1/2002, S.7-18.
- [Bachert 2002/3] Bachert, C. (2002). Review article. The role of histamine in allergic disease: re-appraisal of its inflammatory potential. *Allergy* 57 (4), 287-296.
- [Baena-Cagnani 2001] Baena-Cagnani, C.E. (2001). Die Aktivität von Desloratadin bei saisonaler allergischer Rhinitis mit begleitendem Asthma bronchiale. *Allergy* 2001; 56: 26-35.
- [Baggiolini 1989] Baggiolini, M., Walz, A., Kunkel, SL. (1989). NAP-1/IL-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest.* 1989;84:1045.
- [Bagnasco 1995] Bagnasco, B., Canocia, CW. (1995). Influence of H1-receptor antagonists on adhesion molecules and cellular traffic. *Allergy* 1995; 50:17-23.
- [Baldwin 1996] Baldwin, SA. (1996). The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-81.
- [Barnes 1993] Barnes, P.J., Adcock, I. (1993). Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences (TIPS)* 1993: 14: 436-441.
- [Bennion 1995] Bennion, SD., Middleton, MH., David-Bajar, KM., Brice, S., Norris, DA. (1995). In three types of interface dermatitis, different patterns of expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) indicate different triggers of disease. *J Invest Dermatol.* 1995 Jul; 105(1 Suppl ):71S-79S.

- [Bernstein 1988] Bernstein, IL., Bernstein, DI. (1988). The efficacy and safety of loratadine in the management of chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:211.
- [Berthon 1994] Berthon, B., Taudou, G., Combettes, L., Czarlewski, W., Carmi-Leroy, A., Marchand, F., Weyer, A. (1994). In vitro inhibition, by loratadine and descarboxyethoxylopratadine, of histamine release from human basophils, and of histamine release and intracellular calcium fluxes in rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3). *Biochem Pharmacol.* 1994 Mar 2; 47(5):789-94.
- [Blackley 1959] Blackley, CH. Experimental researches on the causes and nature of *Catarrhus aestivus* (hayfever or hay-asthma). London: Dawson's of Pall Mall; 1959 (original publication: London: Balliere, Tindall & Cox; 1873).
- [Bousquet 1988] Bousquet, J., Lebel, B., Chanal, I., Morel, A., Michel FB. (1988). Antiallergic activity of H1-receptor antagonists assessed by nasal challenge. *J Allergy Clin Immunol.* 1988; 82:881-7.
- [Bousquet 1996] Bousquet, J., Vignola, AM., Campbell, AM., Michel, FB. (1996). Pathophysiology of allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1996 Jul; 110(3):207-18.
- [Bryce 2003] Bryce, P.J., Geha, R., Oettgen, H.C. (2003). Desloratadine inhibits allergen-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness and alters T-cell responses in murine models of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Jul;112(1):149-58.
- [Budnik 1992] Budnik, A., Trefzer, U., Parlow, F., Grewe, M., Kapp, A., Schopf, E., Krutmann, J. (1992). Human epidermal keratinocytes are a source of soluble ICAM-1 molecules. *Exp Dermatol* 1992;1:27-30.
- [Burke-Gaffney 2000] Burke-Gaffney, A., Hellewell, PG. (2000). Contribution of endothelial cells to airway inflammation. in: *Cellular Mechanisms in Airway Inflammation.* Page, CP., Banner, KH., Spina, B., eds. Basel: Birkhäuser-Verlag, 2000;223-244.

- [Burmester 1998] Burmester, G., Pezzutto, A. (1998) *Taschenatlas der Immunologie*. Georg Thieme Verlag, 1998.
- [Bury 1992] Bury TB., Corhay JL., Radermecker MP. (1992). Histamine-induced inhibition of neutrophil chemotaxis and T-lymphocyte proliferation in man. *Allergy* 1992; 57:624-629.
- [Candi 2005] Candi, E., Schmidt, R. Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:328-40.
- [Caproni 1995] Caproni, M., Palleschi, GM., Falcos, D., Papi, C., Lotti, T. (1995). Pharmacologic modulation by cetirizine of some adhesion molecules expression in psoriatic skin lesions. *Int J Dermatol* 1995;34:510-3.
- [Cardelus 1999] Cardelús, I., Antón, F., Beleta, J., Palacios, JM. (1999). Anticholinergic effects of desloratadine, the major metabolite of loratadine, in rabbit and guinea-pig iris smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1999; 374:249-254.
- [Castillo 1986] Castillo, JG., Sanz, ML., Oehling, A. (1986). Action of ketotifen on histamine release and intracellular cAMP levels in basophil cultures from pollinic subjects. *Allergol Immunopathol.* 1986;14:107-13.
- [Church 1999] Church, MK. (1999). Non H1-Receptor effects of antihistamines. *Clin Exp Allergy* 1999;57:39-48.
- [Ciprandi 1996] Ciprandi, G., Pronzato, C., Passalacqua, G., Ricca, V., Grogan, J., Mela, GS., Varese, P., Bertolini, C., Bagnasco, M., Canonica, GW. (1996). Topical azelastine reduces eosinophil activation and intercellular adhesion molecule-1 expression on nasal epithelial cells: an antiallergic activity. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98:1088-96.
- [Ciprandi 1997/1] Ciprandi, G., Pronzato, C., Ricca, V., Passalacqua, G., Danzig, M., Canonica, G.W. (1997). Loratadine treatment of rhinitis due to pollen allergy reduces epithelial ICAM-1 expression. *Clin Exp Allergy* 27 (10), 1175-1183.

- [Ciprandi 1997/2] Ciprandi, G., Ricca, V., Passalacqua, G., Truffelli, T., Bertolini, C., Fiorino, N., Riccio, AM., Bagnasco, M., Canonica, GW. (1997). Seasonal rhinitis and azelastine: long- or short-term treatment. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:301-7.
- [Clarinet Product Information] Clarinet (desloratadine) Tablets. Product Information. Schering Corporation, Kenilworth, NJ 07033 USA.
- [Claritin Product Information] Claritin brand of loratadine Product Information. Tablets, Syrup, and Rapidly-disintegrating Tablets. Schering Corporation, Kenilworth, NJ 07033 USA.
- [Coca 1923] Coca, AF., Cooke, RA. (1923). On the classification of the phenomena of hypersensitiveness. *J Immunol.* 163-82; 1923.
- [Corrigan 1988] Corrigan, C.J., Kay, A.B. (1988). T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today* 1992; 13:501-506.
- [Crockett-Torabi 1998] Crockett-Torabi, E. (1998). Selectins and mechanisms of signal transduction. *J Leukoc Biol.* 1998; 63:1-14.
- [Cronstein 1992] Cronstein, B.N., Kimmel, S.C., Levin, R.I., Martiniuk, F., Weissmann, G. (1992). A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: The glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci*, 1992;89:9991-5.
- [Darzynkiewicz 1992] Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, MA., Lassota, P., Traganos, F. (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992;13:795-808.
- [de Bueger 1993] de Bueger, M., Badder, A., Goulmy, E. (1993). Human keratinocytes activate primed major and minor histocompatibility antigen specific Th cells in vitro. *Transpl Immunol.* 1993;1(1):52-9.

- [Del Prete 1988] Del Prete, G.F., Maggi, E., Parronchi, P., Chretien, I., Tiri, A., Macchia, D., Ricci, M., Banchereau, J., De Vries, J., Romagnani, S. (1988). IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J Immunol* 1988; 140:4193-4198.
- [Denham 2003] Denham, KJ., Boutsiouki, P., Clough, GF., Church, MK. (2003). Comparison of the effects of desloratadine and levocetirizine on histamine-induced wheal, flare and itch in human skin. *Inflamm Res.* 2003;52:424-7.
- [Detmers 1990] Detmers, PA., Lo, SK., Olsen-Egbert, E., Walz, A., Baggiolini, M., Cohn, ZA. (1990). Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med* 1990; 171:1155-62.
- [Devalia 1991] Devalia, JL, Davies, RJ. (1991). Human nasal and bronchial epithelial cells in culture. An overview of their characteristics and function. *Allergy Proc* 1991;57:71-79.
- [Devalia 2000] Devalia, JL., Rusznak, C., Davies, RJ. (2000). Epithelial cell dysfunction in rhinitis. In: *Asthma and Rhinitis*, 2nd edn. Busse, WW, Holgate, St, eds. London: Blackwell Science Ltd., 2000;841-854.
- [Diamond 1990] Diamond, MS., Staunton, DE., de Fougères AR., Stacker, SA., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, ML., Springer, TA. (1990). ICAM-1 (CD54): A Counter-Receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol.* 1990; 111:3129-39.
- [Diaz-Sanchez 2000] Diaz-Sanchez, D. (2000). Pollution and the immune response: atopic diseases - are we too dirty or too clean? *Immunology* 2000;101:11-18.
- [Dustin 1988] Dustin, ML., Singer, KH., Tuck, DT., Springer, TA. (1988). Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon- $\gamma$  and is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Exp Med* 1988;167:1323-40.

- [Eda 1993] Eda, R., Sugiyama, H., Hopp, R.J., Bewtra, A.K., Townley, R.G. (1993). Effect of loratadine on human eosinophil function in vitro. *Annals of Allergy* 1993; 71:373-8.
- [Enk 2002] Enk, A., Knop, J. (2002). Das Immunsystem der Haut. *Die gelben Hefte*. 42:1 (2002)
- [IL-8 ELISA] IL-8 ELISA Hintergrundinformation. Bender MedSystems Informationsbroschüre.
- [Fadel 1990] Fadel, R., David, B., Herpin-Richard, N., Borgnon, A., Rassemont, R., Rihoux, J.P. (1990). In vivo effects of cetirizine on cutaneous reactivity and eosinophil migration induced by platelet-activating factor (PAF-acether) in man. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:314-20.
- [Farrar 1993] Farrar, M.A., Schreiber, R.D. (1993). The molecular cell biology of interferon- $\gamma$  and its receptor. *Annu Rev Immunol* 1993;11:571-611.
- [Fasce 1996] Fasce, L., Ciprandi, G., Pronzato C., Cozzani, S., Tosca, M.A., Grimaldi, I., Canonica, G.W. (1996). Cetirizine reduces ICAM-1 on epithelial cells during nasal minimal persistent inflammation in asymptomatic children with mite-allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109:272-6.
- [Flier 1999] Flier, J., Boorsma, D.M., Bruynzeel, D.P., Van Beek P.J., Stoof, T.J., Scheper, R.J., Willemze, R., Tensen, C.P. (1999). The CXCR3 activating chemokines IP-10, Mig, and IP-9 are expressed in allergic but not in irritant patch test reactions. *J Invest Dermatol*. 1999 Oct; 113(4):574-8.
- [Fontenot 2003] Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-36.
- [Fritsch 2004] Fritsch, P. *Dermatologie Venerologie*. 2.Auflage (2004). Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. ISBN 3-540-00332-0

- [Fung-Leung 2004] Fung-Leung, WP., Thurmond, RL., Ling, P., Karlsson L. (2004). Histamine H4 receptor antagonists: the new antihistamines? (Review). *Curr Opin Investig Drugs* 2004; 5(11):1174-83.
- [Gassner-Bachmann 2000] Gassner-Bachmann, B., Wüthrich, B. (2000). Bauernkinder leiden selten an Heuschnupfen und Asthma. *Dtsch med Wschr* 2000; 125: 924-931.
- [Geha 2001] Geha, R.S., Meltzer, E.O. (2001). Desloratadine: A new, nonsedating, oral antihistamine. *J Allergy Clin Immunol* 2001 Apr; 107 (4):752-62.
- [Genovese 1997] Genovese, A., Patella, V., De Crescenzo, G., De Paulis, A., Spadaro, G., Marone, G. (1997). Loratadine and desethoxycarbonyl-loratadine inhibit the immunological release of mediators from human FcεRI<sup>+</sup> cells. *Clin Exp Allergy* 1997; 27:559-67.
- [Glass 2003] Glass, D.J., Harper, A.S. (2003). Assessing satisfaction with desloratadine and fexofenadine in allergy patients who report dissatisfaction with loratadine. *BMC Family Practice* 2003; 4.
- [Gorelik 2002] Gorelik, L., Flavell, RA. (2002). Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2002;2:46-53.
- [Greiff 2002] Greiff, L, Persson, C.G., Andersson, M. (2002). Desloratadine reduces allergen challenge-induced mucinous secretion and plasma exudation in allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002 Oct; 89(4):413-8.
- [Griffiths 1989] Griffiths, CEM., Voorhees, JJ., Nickoloff, BJ. (1989). Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and human inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. *J Am Acad Dermatol* 1989;20:617-29.
- [Gröne 2002] Gröne, A. (2002). Keratinocytes and cytokines (Review). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 88 (2002) 1-12.



- [Grogan 1990] Grogan, W., Collins, J. (1990). Guide to flow cytometry methods. Marcel Dekker, Inc., New York.
- [Groux 1997] Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, JE., Roncarolo, MG. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389:737-42.
- [Gupta 1996] Gupta, SK. (1996). Effect of cetirizine and prednisolone on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late cutaneous responses. *Clin Exp Allergy* 1996; 26:68-78.
- [Guyre 1988] Guyre, P.M., Girard, M.T., Morganelli, P.M., Manganiello, P.D. (1988). Glucocorticoid effects on the production and actions of immune cytokines. *J steroid Biochem.* 1988; 30: 89-93.
- [Hamid 1997] Hamid, QA., Schotman, E., Jacobson, MR., Walker, SM., Durham, SR. (1997). Increases in IL-12 messenger RNA+ cells accompany inhibition of allergen-induced late skin responses after successful grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:254-60.
- [Handley 1997] Handley, DA., McCullough, JR., Fang, Y., Wright, SE., Smith, ER. (1997). Descarboethoxyloratadine, a metabolite of loratadine, is a superior antihistamine. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997; 78:164:
- [Hashimoto 1968] Hashimoto, K., Tarnowski, WM. (1968) Some new aspects of the Langerhans cell. *Arch Dermatol* 1968;97:450-64.
- [Hayashi 1999] Hayashi, S., Hashimoto, S. (1999). Anti-inflammatory actions of new antihistamines. *Clin Exp Allergy* 1999; 29, 1593-1596.
- [Haye 2005] Haye, R., Hoyer, K., Berg, O., Frones, S., Odegard, T. (2005). Morning versus evening dosing of desloratadine in seasonal allergic rhinitis: a randomized controlled study [ISRCTN23032971]. *Clin Mol Allergy* 2005;3:3.

- [Hebert 1991] Hébert, CA., Baker, JB. (1991). Interleukin-8: A review. *Cancer Invest* 1991; 11: 743-750.
- [Henz 2001] Henz, B.M. (2001). Das pharmakologische Profil von Desloratadin. *Allergy* 2001; 56: 8-16.
- [Horak 2002] Horak, F., Stübner, U.P., Zieglmayer, R., Harris, A.G. (2002). Effect of desloratadine versus placebo on nasal airflow and subjective measures of nasal obstruction in subjects with grass pollen-induced allergic rhinitis in an allergen-exposure unit. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:956-61.
- [Hori 2003] Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
- [ISAAC 1998] ISAAC/The International Study of Asthma and Allergies in Childhood Steering Committee. World-wide variation of asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic eczema in prevalence of symptoms. *Lancet* 1998;351:1225-1232.
- [Ishizaka 1966] Ishizaka, K., Ishizaka, T., Hornbrook, MM. (1966). Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. *J Immunol* 1966;97:840-53.
- [Ishizaka 1967/1] Ishizaka, K., Ishizaka, T. (1967). Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 1967;99:1187-98.
- [Ishizaka 1967/2] Ishizaka, K., Ishizaka, T., Hornbrook, MM. (1967). Allergen-binding activity of gamma-E, gamma-G and gamma-A antibodies in sera from atopic patients. In vitro measurements of reaginic antibody. *J Immunol* 1967;98:490-501.
- [Itoh 1999] Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: Production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999.162:5317-26.

- [Janeway 1999] Janeway, C.A. *Immunobiology: the immune system in health and disease* (1999)/ Charles A. Janeway, Jr., Paul Travers, Mark Walport; with the assistance of J. Donald Capra. - 4th ed..p.cm. 1999 by Elsevier Science Ltd/Garland Publishing ISBN 0-8153-3217-3
- [Johansson 2003] Johansson, SG., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, PS., Lanier, BQ., Lockey, RF., Motala, C., Ortega Martell, JA., Platts-Mills, TA., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenberge, P., Williams, HC. (2003). Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization. October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:832-6.
- [John 1997] John, M., Hirst, SJ., Jose, PJ., Robichaud, A., Berkman, N., Witt, C., Twort, CH., Barnes, PJ., Chung, KF. (1997). Human airway smooth muscle cells express and release RANTES in response to T helper 1 cytokines: regulation by T helper 2 cytokines and corticosteroids. *J Immunol* 1997;158:1841-7.
- [Junqueira 1996] Junqueira, L.C., Carneiro, J. *Histologie* (1996). Schiebler, Theodor H.(Übers.): *Histologie*. 4.Auflage, Berlin: Springer, 1996. ISBN 3-540-60404-9.
- [Kakinuma 2001] Kakinuma, T., Nakamura, K., Wakugawa, M., Mitsui, H., Tada, Y., Saeiki, H., Torii, H., Asahina, A., Onai, N., Matsushima, K., Tamaki, K. (2001). Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. *J Allergy Clin Immunol* 2001 Mar; 107:535-41.
- [Kalish 1989] Kalish, RS. (1989). Non specifically activated human peripheral blood mononuclear cells are cytotoxic for human keratinocytes in vitro. *J Immunol* 1989;142:74-80.
- [Karow 2000] Karow, T., Lang, R. (2000). *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Druckerei F. Hansen, Bergisch-Gladbach.
- [Kashihara-Sawami 1992] Kashihara-Sawami, M., Norris, D. (1992). The state of differentiation of cultured human keratinocytes determinates the level of intercellular

adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression induced by gamma interferon. *J Invest Dermatol* 1992;98:741-7.

[Kemp 1987] Kemp, JP., Bahna, SL., Chervinsky, P., Rachelefsky, GS., Seltzer, JM., Vande Stouwe, RA., Valero, RN. (1987). A comparison of loratadine, a new nonsedating antihistamine, with clemastine and placebo in patients with fall seasonal allergic rhinitis. *Am J Rhinol* 1987;1:151-4.

[Kidd 2003] Kidd, P. (2003). Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease. *Alt Med Rev* 2003; 8(3):223-46.

[Klein 1995] Klein, CL., Bittinger, F., Kohler, H., Wager, M., Otto, M., Hermanns, I., Kirkpatrick, CJ. (1995). Comparative studies on vascular endothelium in vitro. 3. Effects of cytokines on the expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 by cultured human endothelial cells obtained from different passages. *Pathobiology*. 1995; 65:83-92.

[Kleine-Tebbe 1994] Kleine-Tebbe, J., Josties, C., Frank, G., Stalleicken, D., Buschauer, A., Schunack, W., Kunkel, G., Czarnetzki, B. (1994). Inhibition of IgE- and non IgE-mediated histamine release from human basophil leukocytes in vitro by a histamine H1-antagonist, desethoxycarbonyl-loratadine. *J Allergy Clin Immunol* 1994 Feb; 93 (2).

[Kleine-Tebbe 2001] Kleine-Tebbe, J., Fuchs, T., Klimek, L., Kuhr, J., Lepp, U., Niggemann, B., Rakoski, J., Renz, H., Saloga, J., Simon, J. (2001). Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) mit Allergenen. Positionspapier der DGAI, inhaltlich abgestimmt mit dem ÄDA. *Allergologie* 2001;24:535-44.

[Klunker 2003] Klunker, S., Trautmann, A., Akdis, M., Verhagen, J., Schmid-Grendelmeier, P., Blaser, K., Akdis, CA. (2003). A second step of chemotaxis after transendothelial migration: keratinocytes undergoing apoptosis release IFN- $\gamma$ -inducible protein 10, monokine induced by IFN- $\gamma$  and IFN- $\gamma$ -inducible  $\alpha$ -chemoattractant for T cell chemotaxis toward epidermis in atopic dermatitis. *J Immunol*. 2003, 171:1078-84.

- [Kohda 2002] Kohda, F., Koga, T., Uchi, H., Urabe, K., Furue, M. (2002). Histamine-induced IL-6 and IL-8 production are differentially modulated by IFN- $\gamma$  and IL-4 in human keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2002, 28:34-41.
- [Koizumi 1999] Koizumi, H., Ohkawara, A. (1999). H2 histamine receptor-mediated increase in cultured human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 1999;57:127-132.
- [Konno 1994] Konno, S., Asano, K., Okamoto, K., Adachi, M. (1994). Inhibition of cytokine production from human peripheral blood leukocytes by anti-allergic agents in vitro. *Eur J Pharmacol*. 1994;264:265-8.
- [Kowalski 2005] Kowalski, ML., Lewandowska, A., Wozniak, J., Makowska, J., Jankowski, A., DuBuske, L. (2005). Inhibition of nasal polyp mast cell and eosinophil activation by desloratadine. *Allergy* 2005; 60:80-5.
- [Krämer 1999] Krämer, U., Behrendt, H., Dolgner, R., Ranft, U., Ring, J., Willer, H., Schlipkoter, HW. (1999). Airway diseases and allergies in East and West German children during the first 5 years after reunification: time trends and the impact of sulphur dioxide and total suspended particles. *Int J Epidemiol*. 1999 Oct; 28(5):865-73.
- [Krämer 2002] Krämer, U. (2002). Ost-West-Vergleich der Allergie-Prävalenz in Deutschland. *Allergo J* 2002. 11:486-7.
- [Kreutner 1987] Kreutner, W., Chapman, R.W., Gulbenkian, A., Siegel, M.I. (1987). Antiallergic activity of loratadine, a non-sedating antihistamine. [abstract] *Allergy*. 1987 Jan;42(1):57-63.
- [Kreutner 2000/1] Kreutner, W., Hey, J.A., Anthes, J., Barnett, A., Young, S., Tozzi, S. (2000). Preclinical Pharmacology of Desloratadine, a Selective and Nonsedating Histamine H1 Receptor Antagonist. 1st communication: receptor selectivity, antihistaminic activity, and antiallergenic effects. *Arzneimittelforschung* 2000; 50:345-52.

- [Kreutner 2000/2] Kreutner, W., Hey, J. A., Chiu P., Barnett, A. (2000). Preclinical pharmacology of Desloratadine, a Selective and Nonsedating Histamine H1 Receptor Antagonist. 2nd Communication: Lack of central nervous system and cardiovascular effects. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 50 (I), 441-448 (2000).
- [Krieger 1992] Krieger, M., Brunner, T., Bischoff, SC., von Tschärner, V., Walz, A., Moser, B., Baggiolini, M., Dahinden, CA. (1992). Activation of human basophils through the IL-8 receptor. *J Immunol* 1992: 149:2662-2667.
- [Lafaille 1998] Lafaille, JJ. (1998). The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9:139-51.
- [Lange, Bachert 2003] Lange, B., Bachert, C. (2003). Die topische intranasale Therapie der allergischen Rhinitis. *Allergologie*, Jahrgang 26, Nr. 5/2003, S.177-195.
- [Lawrence 1991] Lawrence, MB., Springer, TA. (1991). Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell.* 1991; 65:859-73.
- [Lee 2003] Lee, D.K.C., Bates, C.E., Currie G.P., Lipworth, B.J. (2003). Comparative in vivo bioactivity of modern H1-antihistamines on AMP challenge in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003 Feb; 111 (2): 337-41.
- [Letari 1994] Letari, O., Miozzo, A., Folco, G., Belloni, P.A., Sala, A., Rovati, G.E., Nicosia, S. (1994). Effects of loratadine on cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels and leucotriene release: novel mechanisms of action independent of the anti-histamine activity.[abstract] *Eur J Pharmacol.* 1994 Feb 15;266(3):219-27.
- [Leung 2003] Leung, DY. (2003). Infection in atopic dermatitis. *Curr Opin Pediatr* 2003;15:399-404.
- [Li 1996] Li, J., Ireland, GW., Farthing, PM., Thornhill, MH. (1996). Epidermal and oral keratinocytes are induced to produce RANTES and IL-8 by cytokine stimulation. *J Invest Dermatol* 1996;106:661-6.

- [Limon 2003] Limon, L., Kockler, D.R. (2003). Desloratadine: A Nonsedating Antihistamine. *Ann Pharmacother* 2003 Feb; 37 (2): 237-46.
- [Ling 2004] Ling, P., Ngo, K., Nguyen, S., Thurmond, RL., Edwards, JP., Karlsson, L., Fung-Leung, WP. (2004). Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *Br J Pharmacol* 2004 May; 142(1):161-71.
- [Lippert 1995] Lippert, U., Krüger-Krasagakes, S., Möller, A., Kiessling, U., Czarnetzki, BM. (1995). Pharmacological modulation of IL-6 and IL-8 secretion by the H1-antagonist decarboethoxy-loratadine and dexamethasone by human mast and basophilic cell lines. *Exp. Dermatol.* 1995; 4: 272-276.
- [Lippert 1996] Lippert, U., Welker, P., Kruger-Krasagakes, S., Moller, A., Henz, BM. (1996). Modulation of in vitro cytokine release from human leukemic mast cells (HMC-1) by glucocorticoids. *Skin Pharmacol* 1996; 9(2):93-8.
- [Lippert 2000] Lippert, U., Möller, A., Welker, P., Artuc, M., Henz, B.M. (2000). Inhibition of cytokine secretion from human leukemic mast cells and basophils by H1-and H2-receptor antagonists. *Exp Dermatol* 2000; 9: 118-124.
- [Lustor 1998] Lustor, AD. (1998). Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New England Journal of Medicine* 1998; 338:436-45.
- [Maggi 1998] Maggi, E. (1998). The TH1/TH2 paradigm in allergy. *Immunotechnology* 1998;3:233-44.
- [Marone 1983] Marone, G., Columbo, M., Poto, S., Condorelli, M. (1983). Inhibition of histamine release from human basophils in vitro by calmodulin antagonists. *Clin Immunol Immunopathol* 1983;28:334-40.
- [Marshall 2000] Marshall, G.D. (2000). Therapeutic options in allergic disease: Antihistamines as systemic antiallergic agents. *J Allergy Clin Immunol* 2000 Nov; 106 (5): 303-9.

- [Masuyama 1994] Masuyama, K., Jacobson, MR., Rak, S., Meng, Q., Sudderick, RM., Kay, AB., Lowhagen, O., Hamid, Q., Durham, SR. (1994). Topical glucocorticosteroid (fluticasone propionate) inhibits cells expressing cytokine mRNA for interleukin-4 in the nasal mucosa in allergen-induced rhinitis. *Immunology*. 1994; 82(2):192-9.
- [McClellan 2001] McClellan, K., Jarvis, B. (2001). Desloratadine. *Drugs* 2001;61(6):789-96;discussion 797.
- [McGuirk 2002] McGuirk, P., Mills, KH. (2002). Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* 2002;23:450-55.
- [Metcalf 1997] Metcalfe, DD., Baram, D., Mekori, YA. (1997). Mast cells. *Physiol Rev*. 1997 Oct; 77(4):1033-79.
- [Miadonna 1994] Miadonna, A., Milazzo, N., Lorini, M., Marchesi, E., Tedeschi, A. (1994). Inhibitory effect of the H1 antagonist loratadine on histamine release from human basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 1994; 105:12-7.
- [Michel 1988] Michel, L., De Vos, C., Rihoux, JP., Burtin, C., Benveniste, J., Dubertret, L. (1988). Inhibitory effect of oral desloratadine on in vivo antigen-induced histamine and PAF-acether release and eosinophil recruitment in human skin. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:101-9.
- [Miki 1996] Miki, I., Kusano, A., Ohta, S., Hanai, N., Otoshi, M., Masaki, S., Sato, S., Ohmori, K. (1996). Histamine enhanced the TNF-alpha-induced expression of E-selectin and ICAM-1 on vascular endothelial cells. *Cell Immunol*. 1996;171:285-8.
- [Miller 1995] Miller, J., Knorr, R., Ferrone, M., Houdei, R., Carron, CP., Dustin, ML. (1995). Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. *J Exp Med* 1995;182:1231-41.
- [Moeller 1993] Möller, A., Lippert, U., Lessmann, D., Kolde, G., Hamann, K., Welker, P., Schadendorf, D., Rosenbach, T., Luger, T., Czarnetzki, BM. (1993). Human mast cells produce IL-8. *J Immunol* 1993; 151: 3261-3266.



- [Molet 1997] Molet, S., Gosset, P., Lassalle, P., Czarlewski, W., Tonnel, A.B. (1997). Inhibitory activity of loratadine and descarboxyethoxyloratadine on histamine-induced activation of endothelial cells. *Clin Exp Allergy* 1997 Oct; 27(10):1167-74.
- [Monroe 2003] Monroe, E., Finn, A., Patel, P., Guerrero, R., Ratner, P., Bernstein, D., Desloratadine Urticaria Study Group. (2003). Efficacy and safety of desloratadine 5 mg once daily in the treatment of chronic idiopathic urticaria: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Am Acad Dermatol* 2003 Apr; 48 (4): 535-41.
- [Moqbel 1994] Moqbel, R., Levi-Schaffer, F., Kay, AB. (1994). Cytokine generation by eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:1183-1188.)
- [Moser 2000] Moser, M., Murphy, KM. (2000). Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 2000;1:199-205.
- [Mosmann 1989] Mosmann, TR., Coffman, RL. (1989). Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173.
- [Mukaida 1989] Mukaida, N., Shiroo, M., Matsushima, K. (1989). Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol.* 1989; 143:1366-71.
- [Mutius 1999] Mutius, E. von. (1999). *Asthma bronchiale und atopische Erkrankungen im Kindesalter. Prävalenz und Risikofaktoren.* München: Dustri, 1999.
- [Mygind 1998] Mygind, N., Dahl, R. *Allergologie: Textbuch und Farbatlas.* Hrsg der dt. Ausg.: Hans F. Merk. Aus dem Engl. übers. von Hanna Bedürftig. - Berlin; Wien [u.a.]: Blackwell Wiss.-Verl., 1998 ISBN 3-89412-305-2.
- [Nabe 1989] Nabe, M., Agrawal, DK., Sarmiento, EU , Townley, RG. (1989). Inhibitory effect of terfenadine on mediator release from human blood basophils and eosinophils. *Clin Exp Allergy.* 1989;19:515-20.

- [Nabe 1991] Nabe, M., Miyagawa, H., Agrawal, DK., Sugiyama, H., Townley, RG. (1991). The effect of ketotifen on eosinophils as measured at LTC<sub>4</sub> release and by chemotaxis. *Allergy Proc.* 1991;12:267-71.
- [Nayak 2001] Nayak, AS., Schenkel, E. (2001). Desloratadine reduces nasal congestion in patients with intermittent allergic rhinitis. *Allergy* 2001;56:1077-80.
- [Nickel 1999] Nickel, R., Beck, LA., Stellato, C., Schleimer, RP. (1999). Chemokines and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:723-42.
- [Nickoloff 1994] Nickoloff, B.J., Turka, L.A. (1994). Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Imm Today*, 1994;15:464-69.
- [Ohtani 2003] Ohtani, T., Aiba, S., Mizuashi, M., Mollah, ZU., Nakagawa, S., Tagami, H. (2003). H1 and H2 histamine receptors are absent on Langerhans cells and present on dermal dendritic cells. *J Invest Dermatol* 2003; 121:1073-9.
- [Oliveira 2003] Oliveira, SHP., Lukacs, NW. (2002). The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions. *Braz Med Biol Res* 2003; 36:1455-63.
- [Packard 2003] Packard, K.A., Khan, MM. (2002). Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. *Int Immunopharmacol.* 2003, 3:909-20.
- [Paolieri 1997] Paolieri, F., Battifora, M., Riccio, AM., Ciprandi, G., Scordamaglia, A., Morelli, C., Bagnasco, M., Canonica, GW. (1997). Inhibition of adhesion molecules by budesonide on a human epithelial cell line (lung carcinoma). *Allergy*. 1997 Sep; 52(9):935-43.
- [Papi 2001] Papi, A., Papadopoulos, N.G., Stanciu, L.A., Degitz, K., Holgate, S.T., Johnston, S.L. (2001). Effect of desloratadine and loratadine on rhinovirus-induced intercellular adhesion molecule 1 upregulation and promoter activation in respiratory epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 2001 Aug; 108 (2): 221-28.

- [Pastore 1996] Pastore, S., Cavani, A., Girolomoni, G. (1996). Epidermal cytokine and neuronal peptide modulation of contact hypersensitivity reactions. *Immunopharmacology*. 1996 Mar; 31(2-3):117-30.
- [Paul 1988] Paul, D. (1988). Loratadine and terfenadine in the treatment of chronic urticaria. *Allergy* 1988;43(suppl 7):122.
- [Pirquet 1906] Pirquet, Cv. (1906). *Allergie. Münch.Med. Wschr* 30: 1457-58; 1906.
- [Ploetz 2004] Plötz, S., Traidl-Hoffmann, C., Feussner, I., Kasche, A., Feser, A., Ring, J., Jakob, T., Behrendt, H. (2004). Chemotaxis and activation of human peripheral blood eosinophils induced by pollen associated lipid mediators. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1152-60.
- [Postma 2000] Postma, DS., Koppelman, GH., Meyers, DA. (2000). The Genetics of Atopy and Airway Hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:118-123.
- [Przybilla 2000] Przybilla, B., Rueff, F. *Allergie und Atopie - eine Begriffsbestimmung*. Aus: *Dermatologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend: Aktueller Stand von Klinik und Forschung*; Hrsg.: A. Plettenberg; Springer Verlag Berlin Heidelberg 2000. ISBN 3-540-66240-5.
- [Quantikine] Quantikine human RANTES; R&D Systems Versuchsanleitung.
- [Raif 2001] Raif, S., Meltzer, E.O. (2001). Desloratadine: A new, nonsedating, oral antihistamine. *J Allergy Clin Immunol* 2001 Apr; 107 (4).
- [Rassner 2000] Rassner, G. *Dermatologie Lehrbuch und Atlas*. 6., aktualisierte Auflage (2000). Urban & Fischer Verlag München Jena. ISBN 3-437-42760-1.
- [Ray 1990] Ray, A., LaForge KS., Sehgal, PB. (1990). On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol Cell Biol*. 1990; 10:5736-46.

- [Redier 1992] Rédier, H., Chanez, P., De Vos, C., Rifai, N., Clauzel, AM., Michel, FB., Godard, P. (1992). Inhibitory effect of cetirizine on the bronchial eosinophil recruitment induced by allergen inhalation challenge in allergic patients with asthma: *J Allergy Clin Immunol* 1992; 37:215-24.
- [Ricci 1994] Ricci, M., Matucci, A., Rossi, O. (1994). T cells, cytokines, IgE and allergic airways inflammation. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1994 Sep-Oct; 4(5):214-20.
- [Ring 1985] Ring, J. Erste Beschreibung einer atopischen Familienanamnese im Julio-Claudischen Kaiserhaus: Augustus, Claudius, Britannicus. *Hautarzt* 36: 470-471, 1985.
- [Ring et al 2000] *Weißbuch Allergie in Deutschland 2000* / Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI) ... [Hrsg.: Johannes Ring ... Autoren: Claus Bachert]. - München : Urban und Vogel Medien- und Medizin-Verl.-Ges., 2000 (Medizin & Wissen) ISBN 3-86094-128-3
- [Ring 2001/1] Ring, J., Hein, R., Gauger, A. (2001). Desloratadin in der Therapie der chronisch-idiopathischen Urtikaria. *Allergy* 2001: 56: 36-41.
- [Ring 2001/2] Ring, J., Hein, R., Gauger, A., Bronsky, E., Miller, B. (2001). Once-daily desloratadine improves the signs and symptoms of chronic idiopathic urticaria: a randomized, double blind, placebo-controlled study. *International Journal of Dermatology* 40 (1), 72-76.
- [Ring 2001/3] Ring, J., Krämer, U., Schäfer, T., Behrendt, H. (2001). Why are allergies increasing? *Curr Opin Immunol* 2001;13:701-708.
- [Ring 2001/4] Ring, J., Eberlein-König, B., Behrendt, H. (2001). Environmental pollution and allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;87:2-6.
- [Ring 2004] Ring, J. *Angewandte Allergologie*. 3., neu bearbeitete Auflage (2004). Urban & Vogel Medien und Medizin Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, München 2004. ISBN 3-89935-128-2.

- [Roche Lexikon 1998] Roche-Lexikon Medizin (1998). hrsg. von der Hoffmann-La Roche AG und Urban & Fischer. München; Stuttgart: Urban & Fischer 4. Auflage 1998. ISBN 3-541-17114-6.
- [Rollins 1997] Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood* 1997;90:909-28.
- [Rühl 2003] Rühl, A., Fischer, J. (2003). Therapieoptionen bei allergischer Rhinitis. *Med Welt* 2003; 54:35-41.
- [Salmun 2002] Salmun, L.M., Lorber, R. (2002). 24-hour efficacy of once-daily desloratadine therapy in patients with seasonal allergic rhinitis. *BMC Family Practice* 2002, 3:14.
- [Sanderson 1992] Sanderson, C.J. (1992). Interleukin-5, eosinophils and disease. *Blood* 1992;79:3101-3109.
- [Saxon/Diaz-Sanchez 2005] Saxon, A., Diaz-Sanchez, D. (2005). Air pollution and allergy: you are what you breathe. *Nature immunology* 2005;6:223-26.
- [Schäfer 1998] Schäfer, T., Ring, J. (1998). Epidemiologie des atopischen Ekzems. *Allergologie* 1998; 21:259-271.
- [Schenkel 2002] Schenkel, E., Corren, J., Murray, J.J. (2002). Efficacy of Once-Daily Desloratadine/Pseudoephedrine for Relief of Nasal Congestion. *Allergy Asthma Proc* 2002 Sept-Oct; 23 (5):325-30.
- [Schroeder 2001] Schroeder, J.T., Schleimer, R.P., Lichtenstein, L.M., Kreutner, W. (2001). Inhibition of cytokine generation and mediator release by human basophils treated with desloratadine. *Clinical and Experimental Allergy* 2001; 31, 1369-1377.
- [Secrist 1993] Secrist, H., Chelen, C.J., Wen, Y., Marshall, J.D., Umetsu, D.T. (1993). Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 1993;178:2123-30.

- [Shimoda 1996] Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, MY., Sarawar, SR., Carson, RT., Tripp, RA., Chu, C., Quelle, FW., Nosaka, T., Vignali, DA., Doherty, PC., Grosveld G., Paul, WE., Ihle, JN. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat5 gene. *Nature* 1996; 380:630-3.
- [Sim 1995] Sim, T.C., Reece, L.M., Hilsmeier, K.A., Grant, J.A., Alam, R. (1995). Secretion of chemokines and other cytokines in allergen-induced nasal responses: inhibition by topical steroid treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 Sep; 152(3):927-33.
- [Simons 1992] Simons, F. Estelle R. (1992). The antiallergic effects of antihistamines (H1-receptor antagonists). *J Allergy Clin Immunol* 1992 Oct; 90 (4Pt2): 705-15.
- [Simons 1994] Simons, E. ed. (1994). *Ancestors in Allergy*. New York:Global Med Com, 1994.
- [Simons 1995] Simons, FER., Murray, HE., Simons, KJ. (1995). Quantitation of H1-receptor antagonists in skin and serum. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95:759-64.
- [Simons 2002] Simons, F. Estelle R., Silver, N.A., Gu, X., Simons, K.J. (2002). Clinical pharmacology of H1-antihistamines in the skin. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 777-83.
- [Simons 2003] Simons, F. Estelle R., Prenner, BM., Finn, A. (2003). Efficacy and safety of desloratadine in the treatment of perennial allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003 Mar; 111 (3): 617-22.
- [Sing 1999] Singh, VK., Mehrotra, S, Agarwal SS. (1999). The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: its relevance to autoimmunity and allergy. *Immunol Res* 1999;20:147-61.
- [Skassa-Brociek 1988] Skassa-Brociek, W., Bousquet, J., Montes, F., Verdier, M., Schwab, D., Lherminier, M., Michel, FB. (1988). Double-blind placebo-controlled study of loratadine, mequitazine, and placebo in the symptomatic treatment of seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1988;81:725-30.

- [Soll 1979] Soll, AH., Walsh, JH. (1979). Regulation of gastric acid secretion. *Annu Rev Physiol*; 41:35-53.
- [Soumelis 2002] Soumelis, V., Reche, PA., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., Smith, K., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Menon, S., McClanahan, T., Waal-Malefyt de, R., Bazan, F., Kastelein, RA., Liu, Y. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *nature immunol* 2002;3:673-80.
- [Sydbom 2001] Sydbom, A., Blomberg, A., Parnia, S., Stenfors, N., Sandström, T., Dahlèn, S-E. (2001). Health effects of diesel exhaust emissions. *Eur Respir J* 2001;17:733-46.
- [Tasaka 1986] Tasaka, K., Mio, M., Okamoto, M. (1986). Intracellular calcium release induced by histamine releasers and its inhibition by some antiallergic drugs. *Ann Allergy*. 1986; 56:464-9.
- [Temple 1988] Temple, DM., McCluskey, M. (1988). Loratadine, an antihistamine, blocks antigen-and ionophore-induced leukotriene release from human lung in vitro. *Prostaglandins* 1988; 35(4):549-54.
- [Tobler 1992] Tobler, A., Meier, R., Seitz, M., Dewald, B., Baggiolini, M., Fey, M.F. (1992). Glucocorticoids downregulate gene expression of GM-CSF, NAP-1/IL-8, and IL-6, but not of M-CSF in human fibroblasts. *Blood* 1992; 79: 45-51.
- [Tokura 2003] Tokura, Y., Kobayashi, M., Ito, T., Takahashi, H., Matsubara, A., Takigawa, M. (2002). Anti-allergic drug olopatadine suppresses murine contact hypersensitivity and downmodulates antigen-presenting ability of epidermal Langerhans cells. *Cell Immunol* 2003;224:47-54.
- [Traidl 2000] Traidl, C., Sebastiani, S., Albanesi, C., Merk, HF., Puddu, P., Girolomoni, G., Cavani, A. (2000). Disparate Cytotoxic Activity of Nickel-Specific CD8+ and CD4+ T Cell Subsets Against Keratinocytes. *J Immunol* 2000;1165:3058-64.

- [Traidl-Hoffmann 2002] Traidl-Hoffmann, C., Kasche, A., Jakob, T., Huger, M., Plötz, S., Feussner, I., Ring, J., Behrendt, H. (2002). Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:831-38.
- [Van Cauwenberge 2002] Van Cauwenberge, P. (2002). Advances in allergy management. *Allergy* 2002; 57 Suppl 75: 29-36.
- [Vignola 1993] Vignola, AM., Campbell, AM., Chanez, P., Lacoste, P., Michel, FB., Godard, P., Bousquet, J. (1993). Activation by histamine of bronchial epithelial cells from non-asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;57:411-417.
- [Vignola 1995] Vignola, A.M., Crampette, L., Mondain, M., Sauvere, G., Czarlewski, W., Bousquet, J., Campbell, A.M. (1995). Inhibitory activity of loratadine and des-carboethoxyloratadine on expression of ICAM-1 and HLA-DR by nasal epithelial cells. *Allergy* 1995 Mar; 50(3):200-3.
- [Wagenmann 1997] Wagenmann, M., Baroody, FM., Cheng, CC., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, LM., Naclerio, RM. (1997). Bilateral increases in histamine after unilateral nasal allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:426-31.
- [Wagner 2000] Wagner, JG., Roth, RA. (2000). Neutrophil Migration Mechanisms, with an Emphasis on the Pulmonary Vasculature. *Pharmacol Rev* 2000; 52:349-374.
- [Wahn 2000] Wahn, U., Wichmann, HE., Bergmann, R., Heilmaier, HE., Groß, I., Grüber, C., Jacob, B., Kamtsiuris, P., Klettke, U., Niggemann, B., Bergmann KE. (2000). Spezialbericht Allergien. Statistisches Bundesamt, Stuttgart: Metzler und Poeschel, 2000.
- [Wakugawa 2001] Wakugawa, M., Nakamura, K., Akatsuka, M., Nakagawa, H., Tamaki, K. (2001). Interferon-gamma-induced RANTES production by human keratinocytes is enhanced by IL-beta, TNF-alpha, IL-4 and IL-13 and is inhibited by dexamethasone and tacrolimus. *Dermatology* 2001;202:239-45.



- [Walsh 2000] Walsh, G.M. (2000). The clinical relevance of the anti-inflammatory properties of antihistamines. *Allergy* 55 (supp60), 53-61.
- [Walsh 1997] Walsh, G.M. (1997). Human eosinophils: their accumulation, activation and fate. *Br J Haematol* 1997;97:701-709.
- [Walsh 2004] Walsh, P.T., Taylor, D.K., Turka, L.A. (2004). Tregs and transplantation tolerance. *J Clin Invest* 2004;114:1398-1403.
- [Wang 2000] Wang KY, Arima N., Higuchi S., Shimajiri, S., Tanimoto, A., Murata, Y., Hamada, T., Sasaguri, Y.(2000). Switch of histamine receptor expression from H2 to H1 during differentiation of monocytes into macrophages. *FEBS Lett* 2000; 57:345-348.
- [Weidinger 2004] Weidinger, S., Klopp, N., Wagenpfeil, S., Rümmler, L., Schedel, M., Kabesch, M., Schäfer, T., Darsow, U., Jakob, T., Behrendt, H., Wichmann, H.E., Ring, J., Illig, T. (2004). Association of a STAT 6 haplotype with elevated serum IgE levels in a population based cohort of white adults. *J Med Genet* 2004;41:658-663.
- [Weidinger 2005] Weidinger, S., Klopp, N., Rümmler, L., Wagenpfeil, S., Novak, N., Baurecht, H.J., Groer, W., Darsow, U., Heinrich, J., Gauger, A., Schäfer, T., Jakob, T., Behrendt, H., Wichmann, H.E., Ring, J., Illig, T. (2005). Association of NOD1 polymorphisms with atopic eczema and related phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:177-84.
- [Weidinger 2006] Weidinger, S., Illig, T., Baurecht, H.J., Irvine, A., Rodriguez, E., Diaz-Lacava, A., Klopp, N., Wagenpfeil, S., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S., Palmer, C., Jenneck, C., Maintz, L., Hagemann, T., Behrendt, H., Ring, J., Nothen, M., McLean, W.H., Novak, N. (2006). Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:214-9.

- [Weller 1993] Weller, P.F. (1993). Eicosanoids, cytokines and other mediators elaborated by eosinophils. In: Makino S, Fukuda T, editors. Eosinophils, biological and clinical aspects. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993:125-154.
- [Wheller 1997] Wheller, SK., Perretti, M. (1997). Dexamethasone inhibits cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 up-regulation on endothelial cell lines. *Eur J Pharmacol.* 1997 Jul 16; 331(1):65-71.
- [Wilson 2002] Wilson , AM., Haggart, K., Sims, EJ., Lipworth, BJ. (2002). Effects of fexofenadine and desloratadine on subjective and objective measures of nasal congestion in seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1504-09.
- [Wu 2004] Wu, RL., Anthes, JC., Kreutner, W., Harris, AG., West Jr., RE. (2004). Desloratadine inhibits constitutive and histamine-stimulated nuclear factor-kB activity consistent with inverse agonism at the histamine H1 Receptor. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;135:313-18.
- [Yagi 2004] Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Yamazaki, S., Kitawaki, T., Hori, S., Mameda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S., Sakaguchi, S. (2004). Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004;16:1643-56.
- [Zhao 2004] Zhao, Y., Leung, PC., Woo, KS., Chen, GG., Wong, YO., Liu, SX., van Hasselt, CA. (2004). Inhibitory effects of budesonide, desloratadine and dexamethasone on cytokine release from human mast cell line (HMC-1). *Inflamm Res.* 2004; 53(12):664-9.
- [Zlotnik 2000] Zlotnik, A., Yoshio, Q. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12:121-27.

# Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle
AUC	Area under the curve, Systemische Bioverfügbarkeit
CAM	Cellular adhesion molecule (Zelladhäsionsmolekül)
$C_{max}$	maximale Plasmakonzentration
CIU	Chronische idiopathische Urtikaria
CLA	Cutaneous lymphocyte antigen
CSF	Colony stimulating factor
CTL	Cytolytic T lymphocytes/Zytotoxische T-Lymphozyten (CD8+)
CR3	Komplementrezeptor 3
CXCL8	Interleukin-8
DC	Dendritische Zelle
DCL	Descarboxyethoxyloratadin / Desloratadin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECF-A	eosinophilic chemotactic factor of anaphylaxis
ECP	eosinophiles kationisches Protein
ELISA	enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
FOXP3	forkhead family transcription factor FOXP3 (forkhead box p3)
FSC	Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GRE	Glukokortikoid-Respons-Element

H1-Rezeptor	Histamin-1 Rezeptor
HC	Hydrocortison
HLA	humane Leukozytenantigene
HLA-ABC	humanes Leukozytenantigen ABC (MHC-Klasse-I-Molekül)
HLA-DR	humanes Leukozytenantigen DR (MHC-Klasse-II-Molekül)
IC <sub>50</sub>	Inhibitorische Konzentration bei 50%
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-8	Interleukin-8 (CXCL8)
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP-10	Interferon- $\gamma$ -inducible protein 10 (CXCL10)
JACI	Journal of Allergy and Clinical Immunology
KGM	Keratinocyte Growth Medium
LFA-1	lymphocyte function associated antigen-1 (CD11a/CD18)
LOR	Loratadin
LPS	Lipopolysaccharid
LTC <sub>4</sub>	Leukotrien C <sub>4</sub>
Mac-1	macrophage antigen-1 (CD11b/CD18)
MBP	major basic protein
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MIG	Monokine induced by IFN- $\gamma$ (CXCL9)
MIP	Macrophage colony-stimulating factor
NAP-1	Neutrophil-activating protein/peptide 1
NK	Natürliche Killerzelle
NO	Stickstoff
NOD1	nucleotide-binding oligomerization domain protein 1

PAF	Plättchenaktivierender Factor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PI	Propidiumjodid
PK	Primäre Keratinozyten
PMN	Polymorphkernige mononukleäre Neutrophile
RA	Rhinokonjunktivitis allergica (Heuschnupfen)
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed and presumably secreted (CCL5)
RNA	Ribonukleinsäure
rT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SALT	Skin associated lymphoid tissue
SAR	Saisonale allergische Rhinitis
SSC	Seitwärtsstreulicht
STAT6	signal transducer and activator of transcription
$t_{E1/2}$	mittlere Eliminationshalbwertszeit eines Medikamentes
TARC	Thymus and activation-regulated chemokine (CCL17)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T-reg	Regulatorische T-Zellen
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin

# Danksagung

Ich möchte mich bei all denen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Heidrun Behrendt, Leiterin des Zentrums Allergie und Umwelt an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München, möchte ich für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit an ihrem Institut zu forschen und die stete Förderung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Claudia Traidl-Hoffmann für ihre außerordentlich engagierte und uneingeschränkte Unterstützung und Betreuung während aller Phasen dieser Arbeit. Ich danke Ihr für die wertvollen fachlichen Hinweise, ihr wirklich jederzeit offenes Ohr, ihre Geduld mit mir und ihre aufmunternden Worte während meiner gesamten Doktorarbeit. Durch sie wurde diese entscheidend vorangetrieben.

Mein großer Dank gilt den Mitarbeitern des Zentrums Allergie und Umwelt für die freundliche Aufnahme, die Einführung in die Laborarbeit und ihre Unterstützung während derselben. Bei Herrn Dr. Christian Münster bedanke ich mich ganz herzlich für die technische Unterstützung.

Meinen Eltern und Großeltern danke ich für ihren unbedingten Glauben an mich und ihre stetige Unterstützung in jeder Hinsicht.

Herrn Christoph Egge danke ich für seinen mentalen Beistand und seine große Geduld.

# Lebenslauf

Geboren als Tochter von Dr. med. Klaus Münster, Internist, und Dr. med. Gabriele Münster, Dermatologin, am 09.07.1976 in Regensburg. Schulausbildung an der Kreuzschule und am Goethe-Gymnasium in Regensburg. Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Von Oktober 2005 bis März 2006 Anstellung als Assistenzärztin in der Abteilung für Radiologie im Klinikum Freising. Seit April 2006 Anstellung als Assistenzärztin im Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie im Klinikum Ingolstadt.

---

## Anhang

- I Übersicht über antiinflammatorische Effekte von Antihistaminika der 2. Generation
- II In-vitro-Effekte von Desloratadin
- III In-vivo-Effekte von Desloratadin
- IV In-vitro-Effekte von Loratadin
- V In-vivo-Effekte von Loratadin
- VI Antiinflammatorische Effekte von Glukokortikoiden



## I Übersicht über antiinflammatorische Effekte von Antihistaminika der 2. Generation

<u>Antihistaminikum</u>	<u>Antiinflammatorischer Effekt</u>	<u>Quelle</u>
Cetirizin Azelastrin	Eosinophileneinwanderung an den Ort der allergischen Entzündung ↓	Ciprandi et al, 1997, JACI Ciprandi et al, 1996, JACI Rédier et al, 1992, JACI Fadel et al, 1990, JACI
Cetirizin	Eosinophilen-Überlebenszeit ↓	Sedgwick et al, 1997, Ann Allergy Asthma Immunol
Cetirizin Terfenadin Azelastrin	Superoxid-Bildung, Chemotaxis von Eosinophilen ↓	Eda et al, 1994, Ann Allergy Okada et al, 1994 Int Arch Allergy Immunol Busse et al, 1989, JACI
Cetirizin Terfenadin Azelastrin	Superoxid-Bildung, Chemotaxis von Neutrophilen ↓	Eda et al, 1994, Ann Allergy Busse et al, 1989, JACI Van Neste et al, 1987, Ann Allergy
Cetirizin Ketotifen Azelastrin	ICAM-1 Expression auf Epithelzellen u. Endothelzellen ↓	Bousquet et al, 1998, Clin Exp Allergy Ciprandi et al, 1996, JACI Miki et al, 1996, Cell Immunol Fasce et al, 1996, Int Arch Allergy Immunol Bagnasco et al, 1995, Allergy
Cetirizin	IL-8 Freisetzung aus Epithelzellen ↓	Arnold et al, 1999, Clin Exp Allergy
Terfenadin Ketotifen	Histaminfreisetzung aus Basophilen ↓, LTC4-Freisetzung aus Mastzellen und Basophilen ↓	Nabe et al, 1991, Allergy Proc Nabe et al, 1989, Clin Exp Allergy Castillo et al, 1986, Allergol Immunopathol
Azelastrin Terfenadin Ketotifen	Interleukin-Produktion durch periphere Lymphozyten im Blut ↓	Konno et al, 1994, Eur J Pharmacol
Cetirizin	MCP-1- und RANTES-Produktion von Keratinocyten ↓	Albanesi et al, 1998 Eur J Pharmacol

## II In-vitro-Effekte von Desloratadin:

<u>Ziel</u>	<u>Stimulus</u>	<u>Effekt von Desloratadin</u>	<u>Konzentration von Desl.</u>	<u>Besonderheit</u>	<u>Quelle</u>
Basophile	Ca-Ionophor, IgE	Histamin ↓	$10^{-7}$ , $10^{-6}$ , $10^{-5}$ , $3 \times 10^{-5}$ , $10^{-4}$ M/l; Inhibierung ab $c=10^{-6}$ , Max. bei $c=3 \times 10^{-5}$		Kleine-Tebbe et al, 1994, JACI
- Humane Basophile - Basophile Leukämiezellen von Ratten	anti-IgE, DNP	Histamin ↓ Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung ↓	$c=2-7 \times 10^{-3}$ M $c=2,5-25 \times 10^{-3}$ M		Berthon et al, 1994, Biochem Pharmacol
Nasales Epithel	Histamin	ICAM ↓ HLA-DR ↓	$c=10^{-5}$ M		Vignola et al, 1995, Allergy
Basophilen-Linie, Mastzell-Linie	PMA, Ca-Ionophor	IL-6, IL-8 ↓	$10^{-5} - 10^{-14}$ M	Vergleich mit Dexamethason ( $c=10^{-6} - 10^{-11}$ M) Zugabe 1 Stunde vor bzw. gleichzeitig mit Stimulans; Präinkubation effektiver	Lippert et al, 1995, Exp Dermatol
Umbilikalvene	Histamin	P-Selektin ↓, IL-6, IL-8 ↓			Molet et al, 1997, Clin Exp All
humane FcεRI <sup>+</sup> Zellen (Basophile, Gewebsmastzellen)	Der p 1-Ag, anti-FcεRI	- Histamin, Tryptase ↓ - LTC <sub>4</sub> , PGD <sub>2</sub> ↓	$3 \times 10^{-6} - 10^{-4}$ M	15 min Präinkubation; Wirkung dosisabhängig	Genovese et al, 1997, Clin Exp All
Respiratorische Epithelzellen	Rhinovirus	ICAM-1 ↓, ICAM-1 mRNA ↓, ICAM-1 Promotor-Aktivierung ↓	$10^{-5} - 10^{-7}$ M	16 Std. Vorinkubation mit Des/Lor, 8 h Stimulation, Effekt dosisabhängig, Des/Lor gleichwertig	Papi et al, 2001, JACI
humane Basophile	IgE-Ak, Ca-Ionophor, IL-3, Phorbol ester	IL-4, IL-13 ↓↓, Histamin, LTC <sub>4</sub> ↓ IL-4 mRNA ↓	$10^{-5} - 10^{-7}$ M	15 min Vorinkubation, 4 Std. Stimulation (LTC <sub>4</sub> , Histamin, IL-4), 20 min Stimulation (IL-3)	Schroeder et al, 2001, Clin Exp Allergy
Bronchialsystem von Mäusen, Asthmodell	Aero-Allergene	IgE-Produktion ↔, bronchiale Entzündung, Hyperreagibilität ↓; T-Zellen: IL-4, -5, -13 ↓		tägl. Gabe während Stimulierung	Bryce et al, 2003, JACI
transfizierte COS-7 Zellen (Nierenzellen afrikan. grüner Affen)	Histamin	NF-κB-Aktivität ↓ Desloratadin stärkste Potenz	$10^{-5} - 10^{-11}$ M	Vergleichssubstanzen: Pyrilamin, Cetirizin, Loratadin, Fexofenadin	Wu et al, 2004, Int Arch Allergy Immunol
humane Mastzelllinie	PMA, Ionomycin	IL-4, -6, -8, GM-CSF, TNF-α ↓; Budesonid >Dexamethason >> Desloratadin	$10^{-6} - 10^{-10}$ M	Vergleichssubstanzen: Budesonid, Dexamethason; Stimulationszeit: 6, 12, 24 Stunden	Zhao et al, 2004, Inflamm Res
Nasale Polypen, Mastzellen, Eosinophile	IgE, Ca-Ionophor	LTC <sub>4</sub> , Tryptase, ECP (Eosinophiles kationisches Protein) ↓	$10^{-6} - 5 \times 10^{-5}$	Präinkubation	Kowalski et al, 2005, Allergy

### III In-vivo-Effekte von Desloratadin

<u>Ziel</u>	<u>Stimulus</u>	<u>Effekt von Desloratadin</u>	<u>Effekt des Vergleichpräparats</u>	<u>Quelle</u>
>Abschwellende Wirkung bei Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis		>Nasale Obstruktion ↓ >1xtgl. Applikation >Wirksamkeit bereits nach 1h		Bachert et al, 2001, Allergy
>Einfluss auf SAR und begleitendes Asthma bronchiale		>SAR-Symptomatik ↓ >Bedarf an β2-Sympathomimetika ↓ >Besserung der Asthmasymptomatik		Baena-Cagnani, 2001, Allergy
>Therapie der CIU				Ring et al, 2001, Allergy
>Therapie der CIU		>5 mg, 1 x tgl. verbessert Symptome der CIU	>Placebo: geringere Wirksamkeit	Ring et al, 2001, Int J Dermatol
>Patienten mit intermittierender allergischer Rhinitis (IAR)		>Besserung der nasalen Obstruktion >5 mg, 1 x tgl.	>Placebo: geringere Wirksamkeit	Nayak et al, 2001, Allergy
>subjektive und objektive Messung der nasalen Obstruktion bei der SAR		> 5 mg, 1 x tgl. morgens >gleichwertige Wirkung der Antihistaminika	Fexofenadin (180 mg), Placebo	Wilson et al, 2002, Clin Exp Allergy
>Einfluss auf Rhinorrhoe bei der allergische Rhinitis	Allergen	>Schleimsekretion ↓ >Plasmaexsudation ↓		Greiff et al, 2002, Ann Allergy Asthma Immunol
>Patienten mit allergischer Rhinitis aufgr. Gräserpollen	Allergen	5 mg 1x tgl. morgens >Nasale Obstruktion ↓ >Symptome ↓	Placebo	Horak et al, 2002, JACI
>Patienten mit SAR		>Wirkung über 24 Stunden >Dosierung: 2,5; 5; 7,5; 10; 20 mg >gleiche Wirksamkeit ab 5 mg >Symptome ↓	Placebo	Salmunet al, 2002, BMC Family Practice
>Patienten mit SAR		>5 mg 1 x tgl. >nasale Obstruktion optimal ↓ bei Kombinationstherapie mit Pseudoephedrin >Des u. Pseudoephedrin gleichwertig	Pseudoephedrin	Schenkel et al, 2002, Allergy Asthma Proc.
>Wirkung auf Quaddelbildung, Juckreiz der Haut	Histamin	>5 mg >Levocetirizin überlegen	Levocetirizin (5 mg), Placebo	Denham et al, 2003, Inflamm Res
>Behandlung der perennialen allergischen Rhinitis		>5 mg 1 x tgl. >Symptome ↓	Placebo	Simons et al, 2003, JACI
>Umstieg von Loratadin auf anderes Antihistaminikum aufgr. Unzufriedenheit		>subjektive Zufriedenheit Desloratadin > Fexofenadin	Loratadin, Fexofenadin	Glass et al, 2003, BMC Family Practice
>Patienten mit atopischem Asthma	AMP (12 Std. vor Behandlung)	>5 mg >Atemwegs-Hyperreagibilität ↓ >kein Unterschied in der Wirksamkeit der Antihistaminika	Fexofenadin (180 mg), Levocetirizin (5 mg), Placebo	Lee et al, 2003, JACI
>Behandlung der CIU		>5 mg 1 x tgl. >Symptome ↓	Placebo	Monroe et al, 2003, J Am Acad Dermatol
>Wirkungen einer Einzeldosis Desloratadin und Levocetirizin in Nase und Haut über 24 Std. bei SAR	Histamin	>Wirkungen vergleichbar >Levocetirizin wirkt schneller, besser auf Quaddelbildung	>Levocetirizin:	Passalacqua et al, 2004, Int Arch All Immunol
>Vergleich einer morgendlichen mit einer abendlichen Gabe		>kein Unterschied hinsichtlich der Applikationszeit		Haye et al, 2005, Clin Mol Allergy

## IV In-vitro-Effekte von Loratadin

<u>Ziel</u>	<u>Stimulus</u>	<u>Effekt von Loratadin</u>	<u>Konzentration von Loratadin</u>	<u>Besonderheit</u>	<u>Quelle</u>
Mastzellen aus Rattenperitoneum	-Con A -Ca-Ionophor	- Histamin ↓	μmolar	mikromolare Konzentrationen von Loratadin	Kreutner 1987
MC9-Zellen	- Con A	- Histamin ↓ - LTC <sub>4</sub> ↓	μmolar		
menschl. Lunge	-Antigen - Ionophor	Leukotrienfreisetzung ↓	$10^{-6} - 2 \times 10^{-5}$ M	Histaminfreisetzung bleibt unbeeinflusst	Temple 1988
humane Eosinophile	PAF	- Minderung der Chemotaxis und O <sub>2</sub> -Bildung	20 o. 40 mg oral	kein Einfluß auf PAF-induzierte ECP-Freisetzung	Eda 1993
- Makrophagen aus Rattenperitoneum - menschl. Thrombozyten		- cytosol. Ca <sup>2+</sup> ↑		Ca <sup>2+</sup> ↑ durch physiol. Aktivatoren (PAF, ADP), somit wird Zellaktivierung inhibiert	Letari 1994
humane Basophile	-anti-IgE -FMLP -Ca-Ionophor	- Blockade der Histaminfreisetzung aus Basophilen	$1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-7}$ M	50% Hemmkonzentration zwischen 24 und 30 μM Loratadin	Miadonna 1994
- Humane Basophile - Basophile Leukämiezellen von Ratten	-anti-IgE -DNP	- Histamin ↓ - Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung ↓	$c=2-7 \times 10^{-3}$ M $c=2,5-25 \times 10^{-3}$ M		Berthon et al, 1994, Biochem Pharmacol
Nasales Epithel	Histamin	- ICAM ↓ - HLA-DR ↓	$10^{-5}$ M (rel. hoch)	gleichzeitige Zugabe von Lor/Des und Histamin (keine Präinkubation)	Vignola 1995
Endothelzellen aus humaner Umbilikalvene (HUVEC)	Histamin	P-Selektin ↓ (L>D), IL-6, IL-8 ↓ (D>L)	$10^{-5}$ M - $10^{-10}$ M; wirksamste $c=10^{-5} - 10^{-8}$ M (Lor); $10^{-5} - 10^{-12}$ M (Des); Wirksamkeit dosisabhängig	1 h Präinkubation mit Loratadin; P-Selektin; 3 h Präinkubation: Zytokine; 10 min Stimulation: P-Selektin Expression; 24 h Stimulation: Zytokinsekretion; Desloratadin potenter als Loratadin; Bestätigung auf RNA-Ebene (IL-8): 3 h Vorinkubation mit Antihistaminika; 4 h Stimulation mit Histamin; Desloratadin weniger wirksam als Loratadin	Molet et al, 1997 Clin Exp All
humane FcεRI <sup>+</sup> Zellen (Basophile, Gewebsmastzellen)	- Der p 1-Ag - anti-FcεRI	- Histamin, Tryptase ↓ - LTC <sub>4</sub> , PGD <sub>2</sub> ↓	$3 \times 10^{-6} - 10^{-4}$ M; maximale Wirkung bei $10^{-4}$ M (Lor/Des)	15 min Präinkubation; Wirkung dosis-abhängig	Genovese et al 1997; Clin Exp All
Humane Epithelzellen der Atemwege (HAEC), Neutrophile	- Ca-Ionophor - TNF-α	- LTB <sub>4</sub> -Produktion durch Neutrophile ↓	$0,25 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-5}$ M		Amsellem 1998
humane leukämische Mastzellen und Basophile	-PMA -Ca-Ionophor	- Zytokinsekretion (TNF-α>IL-8>IL-6>IL-3) ↓	$10^{-5} - 10^{-14}$ M (maximale Suppression durch Lor bei $c=10^{-9}$ M)	Vergleich mit Dexamethason; 24 Std. Stim.zeit; Wirkung dosisabhängig; kein Effekt auf Ca-Fluss	Lippert et al, 2000; Exp Dermatol
Respiratorische Epithelzellen	Rhinovirus	ICAM-1 ↓, ICAM-1 mRNA ↓, ICAM-1 Promotor-Aktivierung ↓	$10^{-5} - 10^{-7}$ M	16 Std. Vorinkubation mit Des/Lor, 8 Std. Stimulation, Effekt dosisabhängig, Des/Lor gleichwertig	Papi et al; 2001; JACI

## V In-vivo-Effekte von Loratadin

<u>Ziel</u>	<u>Stimulus</u>	<u>Effekt von Loratadin</u>	<u>Konzentration von Loratadin</u>	<u>Besonderheit</u>	<u>Quelle</u>
- Meerschweinchen-lunge	- Histamin	- Bronchospasmus ↓	- 10 mg/kg KG p.o.	- Vergleich mit Terfenadin: bessere Wirkung von Loratadin	Kreutner et al, 1987, Allergy
- menschl. Nase	- Gräserpollen	- Symptome ↓ - PGD2 ↓, Histamin ↓	- 10 mg	- orale Vorbehandlung mit Loratadin, dann intranasale Allergen-Stimulation	Bousquet et al, 1988, JACI
- menschl. Nase	- Methacholin - Allergen	- Histamin ↓ - allerg. Sofortsymptomatik ↓ (durch Allergen)	- 10 mg	- keine Wirkung auf Methacholin-induzierte nasale Sekretion	Andersson, et al, 1991, Allergy
-Nasale Epithelzellen		ICAM-1 ↓, Eosinophilen-Migration ↓, ECP, EPO, Histamin ↓	- 10 mg /d	- Vergleich mit Cetirizin (10 mg/d) - kein Unterschied zwischen den Medikamenten	Ciprandi, 1997

## VI Antiinflammatorische Effekte von Glukokortikoiden

Ziel	Stimulus	Eingesetztes Glukokortikoid	Effekt	Konzentration	Besonderheit	Quelle
Endothelzellen	LPS	Dexamethason Cortisol Tetrahydrocortisol (THC, $10^{-5}$ M)	ELAM-1, ICAM-1 ↓, ELAM-1 mRNA ↓ THC kein Einfluss	$IC50 < 10^{-9}$ M (Dex), $10^{-5}$ M (Cort)		Cronstein, et al, 1992, Proc Natl Acad Sci
Humane Fibroblasten	TNF	Dexamethason	GM-CSF, NAP-1/ IL-8, IL-6 ↓, RNA ↓	$10^{-6}$ M	48 Stunden Stimulation	Tobler et al, 1992, Blood
Nasale Mucosa (Verhinderung von Früh- und Spätphasenantwort)	lokales Allergen	Fluticason-Propionat (FP)	Zellen, die IL-4 mRNA exprimieren ↓, CD25+-Zellen ↓ (T-Zellen, Eosinophile)	200 µg	6 Wochen Vorbehandlung, topische Anwendung als Spray, in-vivo Studie bei SAR-Patienten	Masuyama et al, 1994, Immunology
Basophilen-Linie, Mastzell-Linie	PMA, Ca-Ionophor	Dexamethason	IL-6, IL-8 ↓	$10^{-6} - 10^{-11}$ M	Vergleich mit Desloratadin ( $c = 10^{-5} - 10^{-14}$ M) Zugabe 1 Stunde vor bzw. gleichzeitig mit Stimulans; Präinkubation effektiver; 24 Std. Stimulationszeit	Lippert et al, 1995, Exp Dermatol
Nasale Sekretion auf Allergenreiz	lokales Allergen	Beclomethason Dipropionat (BDP)	Symptome ↓, Zytokinfreisetzung: IL-1β, MIP-1α, GM-CSF, IL-8 ↓, RANTES ↓↓	168 µg/d	1 Woche Vorbehandlung; in-vivo Studie, topische Anwendung (Spray)	Sim et al, 1995, Am Respir Crit Care Med
humane Mastzelllinie (HMC-1)	PMA, Ca-Ionophor	- 4 verschiedene	Zytokinfreisetzung ↓: IL-1 β, IL-3, IL-8, TNF-α ↓	$10^{-5} - 10^{-9}$ M	24 Std. Stimulationszeit	Lippert et al, 1996, Skin Pharmacol
humane Epithelzelllinie	IFN-γ (500 U/ml)	Budesonid	ICAM-1, CD29 (basal/stim.) ↓, sICAM-1 ↓ (nur basal)	$10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}$ M/l	24 Std. Stimulation, Effekt dosisabhängig	Paolieri et al, 1997, Allergy
humane bronchiale Epithelzellen	TNF-α	Fluticason Propionat (FP), Beclomethason Dipropionat (BDP), Hydrocortison (HC)	RANTES ↓ (nur FP, $10^{-6} - 10^{-4}$ M), sICAM-1 ↓ (s=soluble) (alle, BDP, HC $10^{-4}$ M), FP > BDP/HC	$0 - 10^{-4}$ M	24 Std. Stimulation ohne Vorinkubation,	Wang et al, 1997, Eur Respir J
Endothelzelllinie	IL-1β, TNF-α	Dexamethason	ICAM-1 ↓	$10^{-9}$ M	Vorinkubation	Wheller et al, 1997, Eur J Pharmacol
Keratinocyten	IFN-γ (100-500 U/ml)	Hydrocortison	ICAM-1, s-ICAM-1 ↑ ( $10^{-7}$ M), HLA-DR ↓, IL-8, GM-CSF ↓, kein Einfluss auf MHC I/CD40/RANTES/ MCP-1	$10^{-12} - 10^{-7}$ M	Vergleichssubstanz: Cetirizin	Albanesi et al, 1998,
Epithelzellen, respiratorische	Rhinovirus	systemische: Hydrocortison (HC), Dexamethason (DM) topische: Mometason Furoat (MF)	ICAM-1 ↓, (alle gleich) ICAM-1 mRNA (nur MF) Promotor-Aktivierung ↓ (nur MF)	$10^{-10} - 10^{-11}$ M/l (IC50)	16 Std. Vorbehandlung, 16 Std. Infektion	Papi et al, 2000,
humane Mastzelllinie	PMA, Ionomycin	Budesonid, Dexamethason	IL-4, -6, -8, GM-CSF, TNF-α ↓ Budesonid > Dexamethason >> Desloratadin	$10^{-6} - 10^{-10}$ M	Vergleichssubstanz: Desloratadin; Stimulationszeit: 6, 12, 24 Stunden	Zhao et al, 2004, Inflamm Res