

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Ein neues pharmakologisches Screeningverfahren für
neue und bekannte Antiasthmatica und Antiallergika
am ovalbuminsensibilisierten Meerschweinchen in
einem Zweikammerganzkörperplethysmographen**

**Vorgelegt von
Wahid Mahdawi**

Lahidjan/Iran

**München
2005**

Erklärung

Diese Dissertation wurde in Sinne von §12 Abs. 3 der Promotionsordnung vom 05.03.1981 von Prof. Haen betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 02.05.2005

(Unterschrift des Autors)

Dissertation eingereicht am: 06.05.2005

1. Gutachter

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. Haen

2. Gutachter

Prof. Dr. rer. nat. H. Wagner

Mündliche Prüfung am 12.05.2005

**Meiner Frau,
meinen Kindern
und meinen Eltern
gewidmet**

ABKÜRZUNGEN

5-HPETE	5-Hydroxyperoxy-Eicosatetraensäure
5-LO	5-Lipoxygenase
BAL	broncho alveolären Lavage
CA	Compressed Air
CSF	Kolonistimulierende Faktor
ECP	Eosinophil Cationic Protein
EPO	Eosinophil Peroxidase
EPX	Eosinophil Protein X
FEV1	forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde oder Einsekundenkapazität
FLAP	5-Lipoxygenase-aktivierende Protein
HI	Histamin
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INF	Interferone
LT	Leukotrien
LTC4	Leukotrien C4
LT-RA	Leukotrien-Rezeptor-Antagonist
MBP	Major Basic Protein
NK	Natural Killer-Zellen
OA	Ovalbumin
PAF	Plättchen aktivierende Faktor
PCA	Passive Cutaneous Anaphylaxis= Hauttestreaktion vom Soforttyp
PDE	Phosphodiesterase
PEF	Maximalen expiratorischen Flusses

PGD2	Prostaglandin D2
SD	Standardabweichung
SRS-A	Slow-Reacting-Substance of Anaphylaxis
Th	T-Lymphozyten-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TxA	Thromboxan A
$\bar{x} \pm SD$	arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Asthma bronchiale und tierexperimentelle Asthmaforschung</u>	3
2.1. Pathogenese des Asthma bronchiale	3
2.1.1. Asthmatische Frühreaktion	4
2.1.2. Asthmatische Spätreaktion	5
2.1.3. Bronchiale Entzündungsreaktion	6
2.1.4. Bronchiale Hyperreagibilität	9
2.1.5. Allergie-Diagnostik	10
2.2. Experimentelle Allergie- und Asthmaforschung: Meerschweinchen-Mensch	11
2.2.1. Sensibilitätsuntersuchungen	12
2.2.2. Bekannte humane Asthmamittel	15
2.2.2.1. Bronchodilatoren	15
2.2.2.2. Entzündungshemmer	16
2.3. LABTEC Lungenfunktions-Analyse-System	20
2.4. Fragestellung	25

3.	<u>Material und Methoden</u>	26
3.1.	Material	26
3.1.1.	Versuchstiere	26
3.1.2.	Testsubstanzen	26
3.2.	Methode	28
3.2.1.	Applikationsmethoden	28
3.2.1.1.	Orale Applikation	28
3.2.1.2.	Inhalative Verabreichung	28
3.2.1.3.	Intramuskuläre und intraperitoneale Applikation	29
3.2.2.	Sensibilisierung	29
3.2.3.	Prüfung der Sensibilität	30
3.2.3.1.	Ovalbuminprovokation	30
3.2.3.2.	Histaminprovokation	30
3.2.4.	Experimentelle Planung	31
3.2.4.1.	Bestimmung der akuten antiasthmatischen Wirkung	31
3.2.4.2.	Langzeituntersuchung zur Bestimmung der entzündungs- hemmenden antiasthmatischen Wirkung	31
3.2.4.3.	Langzeituntersuchung zur Bestimmung der Sensibilität	32
3.2.5.	Dokumentation und Statistik	32
3.2.5.1.	Grafische Darstellung der CA-Mittelwerte und Standardabweichung	32
3.2.5.2.	Prozentuale Inhibition	33
3.2.5.3.	Statistik	33
4.	<u>Ergebnisse</u>	35
4.1.	Sensibilitätsuntersuchungen	35
4.1.1.	Zeitverlauf einer Bronchokonstriktion nach OA- und HI-Exposition	35

4.1.1.1.	Ovalbuminexposition	35
4.1.1.1.1.	Nach inhalativer Ovalbuminprovokation (0,2% - 5 und 15 sec); Sensibilisierungsmethode 1	35
4.1.1.1.2.	Nach inhalativer Ovalbuminexposition (0,2% - 5 und 15 sec); Sensibilisierungsmethode 2	37
4.1.1.2.	Histaminexposition	38
4.1.1.2.1.	Nach inhalativer Histaminprovokation (0,1% - 30 sec); Sensibilisierungsmethode 1	38
4.1.1.2.2.	Histaminprovokation (0,1% - 50 sec); Sensibilisierungsmethode 1	39
4.1.1.2.3.	Histaminprovokation (0,3% - 30 sec); Sensibilisierungsmethode 1	40
4.1.2.	Optimale Zeit für erste Allergen-Exposition, Resensibilisierung- und Tachyphylaxieeffekt nach wöchentlichem Provokationstest; Sensibilisierungsmethode 2	40
4.1.3.	Saisonabhängigkeit der Sensibilisierungsmethode 2	42
4.1.4.	Saisonabhängigkeit der Sensibilisierungsmethode 1	43
4.1.5.	Der Verlauf der Bronchokonstriktion nach systemischer (i.p.) Sensibilisierungsmethode 2	45
4.1.6.	Empfindlichkeitsverlauf nach systemischer (i.m. und i.p.) Sensibilisierung mit 200 mg Ovalbumin (Methode 1)	46
4.1.7.	Vergleich der bronchokonstriktiven Reaktionsstärke nach a: systemischer (i.m. und i.p.) Sensibilisierung mit 200 mg OA (Methode 1) b: systemischer (i.p.) Sensibilisierung mit 10 µg Ovalbumin und 100 mg Aluminiumhydroxid (Methode 1)	47
4.1.8.	Diskussion über Sensibilitätsuntersuchungen	49
4.2.	Untersuchungen mit bekannten Antiasthmatica	56
4.2.1.	Ovalbuminexposition	56
4.2.1.1.	Bronchodilatoren	56
4.2.1.1.1.	Fenoterol als Vertreter von β-Sympathomimetika	56
4.2.1.1.1.1.	Fenoterol orale Applikation: 1 Stunde vor Ovalbuminprovokation	56

4.2.1.1.1.2.	Fenoterol orale Applikation: Über 2 Tage + 1h prae	57
4.2.1.1.1.3.	Fenoterol inhalative Applikation in Minute 2 oder 12, nach Ovalbuminexposition	58
4.2.1.1.2.	Theophyllin als Vertreter von Methylxantinderivate: orale Applikation	60
4.2.1.1.2.1.	Theophyllin: Einmal Applikation 1 Stunde vor OA-Provokation	60
4.2.1.1.2.2.	Theophyllin: Über 2 Tage + 1h prae	61
4.2.1.2.	Entzündungshemmende Substanzen	62
4.2.1.2.1.	Glukokortikoide	62
4.2.1.2.1.1.	Methylprednisolon: orale Verabreichung	62
4.2.1.2.1.2.	Budesonid: inhalative Applikation	63
4.2.1.2.2.	Antileukotriene (Montelukast)	67
4.2.2.	Histaminprovokation	71
4.2.2.1.	Bronchodilatoren	71
4.2.2.1.1.	Fenoterol	71
4.2.2.1.1.1.	Fenoterol orale Applikation: Einmal Applikation 1 Stunde vor Histaminprovokation	71
4.2.2.1.1.2.	Fenoterol orale Applikation: Über 2 Tage + 1h prae	72
4.2.2.1.1.3.	Fenoterol inhalativ	73
4.2.2.1.2.	Theophyllin oral	74
4.2.2.1.2.1.	Theophyllin oral: 1 Stunde vor Histaminprovokation	74
4.2.2.1.2.2.	Theophyllin oral: Über 2 Tage und 1 Stunde prae	75
4.2.3.	Diskussion über Untersuchung bekannter humaner Asthmamittel in diesem Tiermodell	76
4.2.3.1.	Bronchodilatoren	76
4.2.3.1.1.	Fenoterol (b2-Sympathomimetikum)	76
4.2.3.1.2.	Theophyllin (Methylxantine)	77
4.2.3.2.	Entzündungshemmer	78
4.2.3.2.1.	Glukokortikoide	78
4.2.3.2.2.	Antileukotriene	80
4.2.3.2.2.1.	Montelukast	80

4.3.	Untersuchungen von traditionellen Drogen	84
4.3.1.	Traditionelle Drogen	84
4.3.1.1.	Picrorhiza kurroa	85
4.3.1.2	Wascha (Gummiharz von Dorema ammoniacum D. Don.)	89
4.3.1.2.1.	Wascha (70 mg/kg)	91
4.3.1.2.2.	Wascha (140 mg/kg) kombiniert mit Montelukast	93
4.3.1.3.	Caiophora sepiara	95
4.3.1.4.	Angurate (M. grandiflora, M. cordifolia Domba)	96
4.3.2.	Acetosyringenin	101
4.3.2.1.	Acetosyringenin-Ovalbuminexposition	103
4.3.2.1.1.	Acetosyringenin orale Applikation, 1 Stunde vor OA-Provokation	103
4.3.2.1.2.	Acetosyringenin inhalative Applikation (0,5mg/Tier), 30 Minuten vor OA-Provokation	104
4.3.2.1.3.	Acetosyringenin inhalative Applikation (5mg/Tier), 30 Minuten vor OA-Provokation	105
4.3.2.1.4.	Acetosyringenin inhalative Applikation 1x täglich 5mg/Tier, 3 Wochen-Therapie	106
4.3.2.2.	Acetosyringenin – Histaminprovokation	108
4.3.2.2.1.	Acetosyringenin orale Applikation, 1 Stunde vor HI-Provokation	108
4.3.3.	Diskussion über Untersuchung von Drogen der traditionellen Volksmedizin und Acetosyringenin	109
4.3.3.1.	Drogen der traditionellen Volksmedizin	109
4.3.3.2.	Acetosyringenin	110
5.	<u>Zusammenfassung</u>	112
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	114

1. EINLEITUNG

Obwohl die Asthmaforschung in den letzten 10 Jahren Fortschritte erzielt hat und eine Reihe guter synthetischer Asthmamittel zur Behandlung des obstruktiven und allergischen Asthmas zur Verfügung stehen, weist die medikamentöse Behandlung der Asthmapatienten noch eine Reihe von Mängeln auf, wozu u. a. auch die z. T. erheblichen Nebenwirkungen gehören.

Die Suche nach neuen noch effektiveren und vor allem nebenwirkungsärmeren Antiasthmatica ist daher immer noch eine Herausforderung für die pharmazeutische Industrie und Forschung.

Neue Erkenntnisse in der Asthmaforschung haben dabei von einer Verlagerung der früheren antiobstruktiven Basistherapie des Asthmas zum Einsatz von mehr antientzündlicher Asthmamittel geführt, wobei die rein symptomatische, bronchodilatatorische Behandlung als Ergänzung dienen soll.

Bei der Suche nach neuen Antiasthmatica spielen heute zwar die *in vitro*-Untersuchungen zur Vororientierung, aber auch im Hinblick auf die heute per Gesetz verordnete Einschränkung der Tierversuche, immer noch eine wichtige Rolle. Ersetzen können sie diese aber nicht. Sie sind vor der Anwendung am Menschen in jedem Falle unerlässlich.

Erste Versuche, das *in vivo* Screening von einer größeren Anzahl von synthetischen Arzneistoffen, Naturstoffen oder Pflanzenextrakten für die Zwecke des Industrielaboratoriums zu systematisieren, haben bereits vor 20 Jahren zur Entwicklung der Ganzkörperplethysmographie unter Verwendung von Meerschweinchen geführt (Dorsch und Hess 1992). Bei diesem Tiermodell handelt es sich um ein nicht-invasives, hoch sensitives Verfahren, um die Lungenfunktion von kleinen Versuchstieren zu messen. Erste Versuche mit diesem Gerätetyp haben gezeigt, dass diese Methode große Vorteile gegenüber früheren Methoden besitzt und grundsätzlich für Screening Untersuchungen geeignet zu sein scheint. Wie aber eine in den letzten Jahren von uns durchgeführte Überprüfung der Methode gezeigt hat, waren die Versuchsergebnisse nicht immer reproduzierbar, was vermutlich auf die fehlende Validierung dieses neuen Verfahrens zurückgeführt werden könnte.

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war daher eine Validierung dieses Tiermodells durch Kontrollexperimente mit bereits etablierten Asthmamitteln durchzuführen und zu prüfen, ob und in welchem Maße Ergebnisse des Meerschweinchenmodells auf die Anwendung am Menschen übertragbar waren. Im Einzelnen waren die Bedingungen der Sensibilisierung der Versuchstiere gegen

Hühnereiweiß (Ovalbumin), die optimalen Allergendosen, effektivere Sensibilisierungsmethoden, Art und Dauer der Allergen empfindlichen Phase, eine mögliche Re-Sensibilisierung oder Tachyphylaxie Effekte bei wiederholter Allergenexposition, eine evtl. Saisonabhängigkeit der Sensibilisierung bzw. der allergischen Reaktion bei Meerschweinchen und andere Möglichkeiten z. B. mit Histamin, eine bronchiale Hyperreagibilität bei Meerschweinchen zu provozieren, zu prüfen. Als nächstes war die neue Untersuchungsmethode an bekannten Asthmamitteln zu validieren, was mit den Bronchodilatoren Fenoterol und Theophyllin sowie den Entzündungshemmern Budesonid, Methylprednisolon – Glukokortikoide - und Montelukast, einem Leukotrien-Antagonisten, geschah. Schließlich musste geprüft werden, ob sich die Methode zum Screenen von Pflanzenextrakten bei der Suche nach neuen antiasthmatischen Arzneistoffen eignete. Hierzu wurden Extrakte aus *Picrorhiza kurroa* und Acetosyringenin (ein Acetophenon, das chemisch strukturverwandt zum Pflanzeninhaltsstoff Androsin ist und laut frühere Untersuchungen ausgeprägte antiasthmatische Wirkung besitzt) und 3 Drogen aus der traditionellen iranischen und südamerikanischen Volksmedizin (*Angurate*, *Caiophora sepiara* und Wascha aus *Dorema ammoniacum*) getestet.

2. ASTHMA BRONCHIALE UND TIEREXPERIMENTELLE ASTHMAFORSCHUNG

Das Asthma bronchiale ist eine entzündliche Erkrankung der Atemwege mit Hyperreaktivität der Bronchien gegen vielerlei Stimuli und anfallsweise auftretender Atemwegsobstruktion (Forth et al 1997). Die zugrundeliegende bronchiale Entzündung bestimmt nicht nur die Schwere der jeweiligen Erkrankung, sondern definiert auch den chronischen Verlauf und die Häufigkeit von Exazerbationen. Diese Erkenntnisse haben zu einer Verlagerung der therapeutischen Zielsetzung von der antiobstruktiven auf eine antientzündliche Basistherapie des Asthma bronchiale geführt, die bei Bedarf von einer symptomatischen, bronchodilatatorischen Behandlung ergänzt wird.

2.1. Pathogenese des Asthma bronchiale

Typische Symptome sind Husten und anfallsartige Atemnot, insbesondere nachts und am frühen Morgen, Giemen und glasig-zähes Sputum (Wettengel et al 1994). Asthma bronchiale wird ätiologisch in exogen-allergisches und endogen nicht-allergisches Asthma eingeteilt. Anstrengungs- und analgetikainduziertes Asthma bezeichnen zwei häufige Auslöser von Exazerbationen auf dem Boden eines Vorbestehendes intrinsischen bzw. extrinsischen Asthma (Kroegel et al 1995). Pathologisch-anatomisch ist Asthma bronchiale eine primär von eosinophilen Granulozyten dominierte chronische Entzündung der Bronchien. Entzündungsmediatoren verursachen eine Plasmaexsudation mit Schleimhautödem (Barnes et al 1988). Hinzu kommt ein oft erheblicher Epithelschaden. Pathophysiologisch wichtig ist die bronchiale Hyperreaktivität. Die entzündeten Bronchien reagieren auf eine Vielzahl unspezifischer Stimuli, wie z. B. Methacholin, Histamin, kalte Luft oder Luftinhaltsstoffe mit einer heftigen Bronchokonstriktion (Busse et al 1993). Klinisch typisch für das Asthma bronchiale ist die rasche Bronchienverengung, die zu den Atemnotanfällen führt (Schmidt 1997). Die Schweregrade des Asthma ist für die Anpassung einer optimalen Therapie sehr bedeutsam. Ein gelegentliches Asthma hat, wer höchstens zweimal wöchentlich darunter leidet. Patienten, die

einer dauerhaften Therapie bedürfen, werden von der Deutschen Atemwegsliga in die folgenden Schweregrade eingestuft: Unter einem leichten Asthma leidet, wer öfter als dreimal wöchentlich Asthma hat und dessen morgendliche Peak-Flow-Werte dann nicht unter 60% des Sollwertes abfallen. Beim mittelgradigen Asthma findet man mehrfach täglich Symptome und auch häufig nachts; die morgendlichen Peak-Flow-Werte liegen unter 60% des Sollwertes. Das schwere Asthma ist durch ständige schwere Symptome am Tag und in der Nacht geprägt, die körperliche Belastbarkeit ist deutlich eingeschränkt, die morgendlichen Peak-Flow-Werte liegen immer unter 50% des Sollwertes (Wettengel et al 1994).

Der Verlauf des akuten allergischen Asthma-Anfalls wird nach lungenfunktionellen und pathophysiologischen Gesichtspunkten heute in eine Frühreaktion und eine verzögert auftretende Spätreaktion unterteilt.

2.1.1. Asthmatische Frühreaktion

Die asthmatische Frühreaktion entwickelt sich innerhalb von wenigen Minuten nach Allergen-Exposition und äussert sich lungenfunktionell in einer Obstruktion, die sich innerhalb einer begrenzten Zeit wieder spontan zurückbildet (Busse et al 1993, Bochner et al 1994). Die asthmatische Frühreaktion wird durch einen IgE-abhängigen Mechanismus vermittelt, welcher die Freisetzung zahlreicher Mediatoren induziert, die direkt oder indirekt eine akute Bronchokonstriktion auslösen. Als Effektorzelle ist hierbei die Mastzelle von zentraler Bedeutung (Djukanovic et al 1990).

An der Allergen-Verarbeitung und Induktion der Immunreaktion sind sowohl antigen-präsentierende Zellen als auch T-Lymphozyten beteiligt, die eng miteinander kooperieren. Nach Differenzierung und Proliferation eines allergen-spezifischen T-Zellklones entwickeln sich unter dem Einfluss von Th2-assoziierten Zytokinen aus B-Zellen IgE sezernierende Plasmazellen. Das allergen-spezifische IgE gelangt über die Zirkulation in die Umgebung gewebeständiger Mastzellen und besetzt deren Membranoberfläche (sog. Sensibilisierung). Bei erneuter Allergen-Exposition bindet sich das Allergen direkt an die IgE-tragende sensibilisierte Mastzelle (Kroegel 1997a). Nach Bindung des inhalierten Allergens an die IgE-Rezeptoren der Mastzellen werden von dieser Mediatoren freigesetzt, welche entweder aus Vesikeln durch Degranulierung freigesetzt (Histamin) oder durch Synthese aus Lipidbestandteilen der Zellmembran neu produziert werden (Leukotrien C4 - LTC₄, Prostaglandine D2 - PGD₂) (Galli 1993, Schleimer et

al 1986). Während in den ersten Minuten nach Antigenbindung die Histaminfreisetzung überwiegt (50% Freisetzung innerhalb von 2 Min), zeigt die Freisetzung der Lipidmediatoren LTC₄ und PGD₂ eine langsamere Kinetik mit einer 50%igen Freisetzung von LTC₄ nach 5 bis 10 Minuten (Schleimer et al 1986). PAF (Plättchen aktivierender Faktor) konnte ebenfalls während der asthmatischen Frühreaktion im Plasma von Versuchspersonen nachgewiesen werden (Chan-Yeung et al 1991). Ebenso konnte gezeigt werden, dass PAF mittels eines IgE-abhängigen Mechanismus aus Alveolarmakrophagen und auch aus Mastzellen in der Mucosa freigesetzt wird (Barnes et al 1988, Hosford et al 1990). Histamin, LTC₄ und PGD₂ lösen eine direkte, über spezifische Rezeptoren vermittelte Kontraktion der glatten Muskulatur der Bronchien aus (Underwood et al 1994, Labat et al 1992, White 1990). Weiterhin induzieren Histamin, LTC₄ und PGD₂ eine verstärkte bronchiale Schleimproduktion sowie eine erhöhte kapilläre Permeabilität mit Ödem der Bronchialschleimhaut (Djukanovic 1990, Henderson 1994). PAF ist ebenfalls in der Lage eine Kontraktion der glatten Muskulatur sowie eine erhöhte kapilläre Permeabilität verbunden mit submucösem Ödem zu induzieren (Page 1990, Smith 1991, Cuss et al 1986).

Die asthmatische Frühreaktion wird normalerweise nach 30 bis 60 Minuten entweder spontan oder aufgrund therapeutischer Intervention aufgehoben.

2.1.2. Asthmatische Spätreaktion

Ohne therapeutische Intervention kommt es in den meisten Fällen 4 bis 6 Stunden nach Allergenexposition zu einer zweiten verzögerten Atemwegsverengung und Entwicklung einer bronchialen Entzündung. Dies hält mehrere Stunden an.

Die asthmatische Spätreaktion geht auf die spezifische, überwiegend von den Th₂-Lymphozyten dirigierte Immunreaktion zurück. Th₂-Lymphozyten, möglicherweise aber auch aktivierte Mastzellen und Makrophagen, vermitteln über die Freisetzung von Zytokinen die Einwanderung und Stimulierung der eosinophilen Granulozyten, die über mehrere Tage bis Wochen bestehen bleibt. Lokal aktivierte bronchiale Eosinophile setzen vor allem zytotoxische basische Proteine (ECP, MBP), Sauerstoffspezies und bioaktive Lipidmediatoren (TxA₂, LTC₄, PAF) frei, die nicht nur für die während der Spätreaktion auftretende zweite (spätere) und länger anhaltende Bronchialobstruktion, sondern auch für eine gesteigerte Mukussekretion, eine mehr oder weniger ausgeprägte Permeabilitätserhöhung des bronchialen Kapillarnetzes und eine Zerstörung des

bronchialen Oberflächenepithels verantwortlich sind (Kroegel 1997a). Parallel zu dieser asthmatischen Spätreaktion entwickelt sich die bronchiale Hyperreagibilität (Busse et al 1993).

2.1.3. Bronchiale Entzündungsreaktion

Die Entzündung ist eine komplexe zelluläre und humorale Gewebeveränderung. Die asthmatische Immunreaktion wird von zwei Grundkomponenten getragen: den Entzündungszellen und den löslichen Signalstoffen oder Mediatoren. Neben der Mastzelle wurden in den letzten Jahren eine Reihe zirkulierender Zellen mit der asthmatischen Entzündung in Verbindung gebracht. Hierzu gehören basophile Granulozyten, Thrombozyten, Lymphozyten und vor allem eosinophile Granulozyten (Kroegel et al 1993). Durch die Entnahme bronchialer Biopsien konnte eine entzündliche Infiltration der Mucosa und Submucosa während der verzögerten asthmatischen Reaktion nachgewiesen werden, wobei im Infiltrat insbesondere eosinophile Granulozyten und mononucleäre Zellen, die als T-Lymphozyten identifiziert wurden, nachgewiesen werden konnten (Azzawi et al 1990, Frew et al 1990).

Eosinophile Granulozyten sind die Haupteffektorzellen, welche zum überwiegenden Teil die pathologischen Erscheinungen der Spätreaktion vermitteln. Die aktivierten Eosinophilen bilden basische Proteine, Sauerstoffspezies und Lipidmediatoren wie LTC₄, PAF, TxA₂ und Prostaglandine (PGD₂, PGF_{2a}). Die enzymatisch aktiven Proteine MBP, ECP, EPO (eosinophil peroxidase), EPX (eosinophil protein X) führen aufgrund ihrer gewebetoxischen Wirkung zu einer direkten Schädigung des bronchialen Flimmerepithels (Robinson et al 1993). Die Freisetzung toxischer Sauerstoffradikale führt ebenfalls zur Zerstörung der Bronchialepithelzellen.

Mastzellen befinden sich vor allem auf äusseren und inneren Körperoberflächen in Bindegewebe und Schleimhäuten von Atemwegen, Augen, Nase und Darm. Mastzellen enthalten in Granula den klassischen Mediator der Allergie, das Histamin, das an das Proteoglykan Heparin gebunden ist. Daneben synthetisieren Mastzellen nach Aktivierung verschiedene Lipidmediatoren, zu denen vor allem das PGD₂, das TxA₂, Leukotrien B₄ und C₄ sowie PAF gehören. Einigen Arbeiten zufolge sind Mastzellen aber auch in der Lage, eine Anzahl von Zytokinen (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α) zu bilden (Rottem und Metcalfe 1995). Die Mastzelle spielt bei der Initiierung der allergischen Frühreaktion eine wesentliche Rolle. Als ortständige Zellen kommen sie bereits kurz nach Exposition mit dem Allergen in Kontakt. Die

allergische Frühreaktion wird deshalb in erster Linie von Mastzellen vermittelt. Gleichzeitig schaffen Mastzellen gemeinsam mit aktivierten Lymphozyten die Voraussetzung für die nachfolgende Infiltration des betroffenen Gewebes während der verzögerten Reaktion durch die Freisetzung bestimmter chemotaktischer Lipide, Proteine und Zytokine (Kroegel 1997a).

Lymphozyten greifen auf verschiedenen Ebenen in die Pathogenese der asthmatischen Entzündung ein. Während B-Lymphozyten nach Differenzierung in Plasmazellen das Immunglobulin E bilden, sind CD4⁺-(Helfer-Zellen) und CD8⁺-(Suppressor-Zellen)-T-Lymphozyten sowohl an der Allergenerkennung als auch an der Regulation des Entzündungsablaufs beteiligt. Im Bronchialgewebe von Asthmatikern oder in der BAL nach endobronchialer Antigenprovokation finden sich charakteristischerweise aktivierte, IL-2-Rezeptor-tragende (IL-2R⁺) T-Lymphozyten (Azzawi et al 1990, Corrigan et al 1988). Aber auch im Blut zeigt sich als Ausdruck einer Lymphozyten-Aktivierung eine Vermehrung von Natural Killer (NK) -Zellen (Timonen und Stenius-Aaranaia 1985). IL-2R⁺-aktivierte T-Lymphozyten produzieren ein Spektrum an Zytokinen, die ihrerseits den Ablauf der asthmatischen Entzündung beeinflussen. Einige Arbeiten deuten darauf hin, dass beim allergischen Asthma die CD4⁺-Lymphozyten vorwiegend zum sogenannten Th2-Subtyp ausdifferenzieren (Robinson et al 1992, Walker et al 1992). Th2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und unterscheiden sich so vom IL-2-, TNF- β - oder IFN- γ -bildenden Th1-Subtyp. Th2-Lymphozyten dürfen über die Freisetzung von IL-4 und IL-5 die Synthese von IgE durch B-Lymphozyten regulieren, gleichzeitig aber auch mittels IL-4 Mastzellen und IL-5 Eosinophile aktivieren (Kroegel et al 1993).

Menschliche Thrombozyten produzieren verschiedene lösliche Faktoren (Platelet-Derived Histamine Releasing Factor, Plättchen-Faktor 4, RANTES oder PAF), die aufgrund ihrer chemotaktischen Eigenschaften bei der Orchestrierung des entzündlichen Infiltrats beteiligt sein könnten. Basophile Granulozyten sind den Mastzellen strukturell und funktionell sehr ähnlich und setzen neben Histamin eine Reihe von unterschiedlichen Lipidmediatoren frei. Sie sind aber Effektorzellen der verzögerten asthmatischen Reaktion. Es wird bestimmten Subpopulationen von Makrophagen eine Funktion im Rahmen der Allergenpräsentation zugeschrieben.

Die oben aufgeführten Entzündungszellen bilden verschiedene Klassen von Mediatoren der asthmatischen Entzündungsreaktion. Hierzu zählen 1. IgE, 2. Histamin, 3. Lipidmediatoren wie Leukotriene, Prostaglandine und PAF, 4. Zytokine wie IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, RANTES, 5. Basische Proteine wie MBP und ECP, 6. Komplementproteine wie C3b und C5a.

7. Neuro-peptide wie Substanz P(SP) und Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP). Einem Teil der Mediatoren kommt eine Rolle bei der Regulation der Entzündungszellen untereinander zu. Ein anderer Teil vermittelt die Aktivierung von Effektorzellen im Bronchialgewebe. Andere wiederum beeinflussen die Kontraktibilität und Reagibilität der Bronchialmuskulatur (Kroegel et al 1993).

Das Immunglobulin E findet sich bei aktiven allergischen Erkrankungen regelmässig im Blut erhöht und stellt als Gesamt-IgE oder allergenspezifisches IgE einen wichtigen Parameter für die Diagnostik dieser Krankheitsgruppe dar. Die pathophysiologische Rolle erstreckt sich auf die Auslösung der allergischen Sofortreaktion und auf die Einleitung der verzögerten allergischen Reaktion. Die IgE-Synthese erfolgt unter Zusammenspiel von Makrophagen, B- und T-Lymphozyten. Histamin ist in den Granula von Mastzellen und Basophilen gespeichert. Seine Wirkung wird durch Bindung entweder an sogenannte H1- oder H2-Rezeptoren vermittelt. Die Aktivierung von H1-Rezeptoren führt direkt zu den klassischen entzündlichen Veränderungen, zu den charakteristischen Symptomen der asthmatischen Sofortreaktion, wie gesteigerte Gefäßpermeabilität mit Ausbildung eines Gewebsödems und Kontraktion glatter Muskulatur.

Einige der potentesten Mediatoren beim Asthma bronchiale entstehen beim Abbau ungesättigter Arachidonsäure durch die 5-Lipoxygenase zu Leukotriene und durch Zyklooxygenase zu Prostanoiden. Cysteinylleukotriene LTC₄, LTD₄ und LTE₄ entwickeln eine anhaltende Kontraktion glatter Muskelzellen, fördern Mukussekretion und verursachen Epithelödem. LTB₄ ist ein chemotaktischer Faktor. Unter der Bezeichnung Prostanoide werden die verschiedenen Prostaglandine (PG), das Prostazyklin (PGI₂) und die Thromboxane (Tx) zusammengefasst. Viele Prostanoide, synthetisiert durch gewebeständige Mastzellen, finden sich neben Histamin bereits 10 Minuten nach Antigenprovokation im Bronchoalveolarraum (Liu et al 1990). Aber auch während der Spätreaktion werden bestimmte Prostanoide, wenn auch in geringen Mengen, durch Eosinophile, Thrombozyten und möglicherweise Makrophagen gebildet. PGF_{2a}, PGD₂ und das Thromboxan A₂ induzieren eine Bronchokonstriktion und verstärken die cholinerge synaptische Signalübertragung. PGI₂ und PGE₂ gelten als potente Vasodilatoren, die in Gegenwart von LTB₄ die Gefäßpermeabilität erhöhen und ein Bronchialödem verursachen (Barnes et al 1988a). PGI₂, PGD₂, PGF_{2a} sowie TxA₂ verstärken die Produktion und Freisetzung von Mukus aus Drüsenzellen des Bronchialsystems. Der PAF hat potente biologische Effekte auf verschiedene Gewebe und Entzündungszellen. Er wird aus Membranphospholipiden unter der Wirkung einer Phospholipase A₂ und einer Acetyltransferase in Eosinophilen,

Neutrophilen, Makrophagen, Thrombozyten und Mastzellen gebildet. PAF besitzt nicht nur eine potente chemotaktische Wirkung auf Eosinophile, sondern aktiviert auch alle übrigen Funktionen dieser Zelle (Kroegel 1992). Zytokine werden von mononukleären Zellen, Mastzellen und Eosinophilen gebildet. Neben ihrer Bedeutung im Rahmen der Hämatopoese werden Zytokine heute als Modulatoren der allergischen Entzündung angesehen (Owen 1991). Sie regulieren nicht nur die Funktion von Lymphozyten, wie beispielsweise die Synthese von Immunglobulinen, sondern präaktivieren und stimulieren auch reife Entzündungszellen im Blut und im Gewebe. Ein charakteristisches Muster von Zytokinen (IL-1, IL-4, IL-5, IL-8, TNF- α und GM-CSF) lässt sich im Blut und Bronchoalveolarraum von Asthmatikern direkt oder indirekt nachweisen (Brown et al 1991, Roche et al 1989, Wirchow et al 1993). Obwohl die übergeordnete biologische Wirkung der basischen Proteine MBP, ECP und EPO, die Zerstörung des respiratorischen Epithels darstellt, können sie jedoch auch andere Entzündungszellen wie Neutrophile, Mastzellen und Thrombozyten stimulieren. Zudem wird ihnen eine Rolle bei der Ausbildung der bronchialen Hyperreagibilität zugeschrieben (Gleich et al 1993). Die Bestimmung basischer Proteine des Eosinophilen in Sputum, Serum oder der BAL-Flüssigkeit wird zur Diagnostik asthmatischer Erkrankungen herangezogen. Den Komplementproteinen wird eine pro-entzündliche Wirkung zugeschrieben. Nach Kontakt von C5a mit eosinophilen Granulozyten führt das Protein u. a. zur Chemotaxis, Degranulation und Freisetzung von Lipid-Mediatoren (Kroegel 1997a). Die Neuropeptide beeinflussen den Muskeltonus von Bronchien und Lungengefäßen und erhöhen die bronchiale Mukussekretion. Substanz P besitzt proinflammatorische Eigenschaften und ist so direkt an den entzündlichen Vorgängen beteiligt. VIP zeigt starke bronchodilatatorische Eigenschaften. Dieses Peptid trägt zu einer erhöhten bronchialen Reagibilität bei (Kroegel et al 1993).

2.1.4. Bronchiale Hyperreagibilität

Bei der bronchialen Hyperreagibilität (BHR) handelt es sich prinzipiell um eine „Sensibilisierung“ der Atemwege, als deren Folge sich ihre pathophysiologische Reaktionsbereitschaft vom ursprünglichen Allergen auf ein Spektrum unspezifischer Reize ausweitet. Zu diesen Irritantien zählen Belastung im Rahmen physischer Aktivitäten, Hyperventilation, feucht-kalte Luft, Haarspray, Rauch oder bestimmte chemische Mediatoren,

wie z. B. Histamin, Metacholin bzw. Carbachol (Kroegel 1997b). Diese nach inhalativer Allergenexposition auftretende verstärkte bronchokonstriktorische Reaktion auf eine Vielzahl unspezifischer Stimuli ist chronisch-rezidierend und teils tagelang persistierend. Diese erhöhte Reaktionsbereitschaft des Bronchialsystems gilt als universelle Veränderung bei Asthmatikern und bildet einen diagnostischen Baustein im Rahmen der Diagnosefindung bei obstruktiven Erkrankungen (Juniper et al 1981). Trotz ihrer engen Assoziation mit dem Asthma ist die bronchiale Hyperreagibilität nicht für diese Erkrankung spezifisch. Eine gesteigerte bronchiale Hyperreagibilität wird z. B. bei Nachkommen von Asthmatikern ebenso wie bei nicht-asthmatisch Erkrankten beobachtet, zu denen Patienten mit zystischer Fibrose und chronischer Bronchitis gehören. Darüber hinaus kann eine Anzahl verschiedener Stimuli eine passagere Sensibilisierung der Atemwege verursachen. Hierzu gehören Ozon, Stickstoffdioxid und vor allem virale Pathogene, wie z. B. Influenza- und Parainfluenza-Viren. Die virale bronchiale Hyperreagibilität kann zu einem klinisch verzögert verlaufenden respiratorischen Infekt mit über Wochen anhaltendem Husten beitragen. Die Gabe eines inhalativen Corticosteroids kann in diesen Fällen nützlich sein (Kroegel 1997b).

2.1.5. Allergie-Diagnostik

Die Allergie-Diagnostik gliedert sich in allgemeine und spezielle diagnostische Kriterien. Während die allgemeine Diagnostik sich mit Anamnese, körperlichem Untersuchungsbefund und Eosinophilenzählung oder Bestimmung des ECP-Spiegels im Serum oder Sputum beschäftigt, umfasst die spezifische Diagnostik allergischer Erkrankungen zunächst die Durchführung des standardisierten Hauttests (Prick-Test), dann den Nachweis einer erhöhten Serumkonzentration des allergen-spezifischen IgE. Selbstmessungen des maximalen expiratorischen Flusses (PEF) mittels eines Peak-Flow-Meters ist eine weitere Untersuchung (Haen und Uhl 1996). Durch Spirometrie oder Ganzkörperplethysmographie lässt sich eine obstruktive Ventilationsstörung ermitteln (Petro und Konitzko 1990). Die Lungenfunktion ist bei asymptomatischen Personen nicht selten normal. Aus diesem Grund gehört dann die Erfassung einer bronchialen Hyperreagibilität zu einem weiteren diagnostischen Schritt. Hierbei wird Histamin oder ein Acetylcholin-Derivat (Carbachol, Methacholin) in ansteigender Konzentration inhaliert und bestimmte Lungenfunktionsparameter nach jeder Dosis gemessen (Crapo 1994). Manchmal wird

eine spezifische Provokation mit dem vermuteten Allergen unter strenger Kontrolle erforderlich. Prinzipiell wird hierbei die Atemwegsobstruktion nach Inhalation ansteigender Konzentrationen eines definierten Allergens ermittelt (Kroegel 1997a). Die grundsätzliche Möglichkeit der pulmonalen Provokation eines Asthmatikers mit ϕ_n für ihn vermuteten relevanten Allergenen hat vor allem den Zweck, das krankheitsverursachende Allergen eindeutig zu identifizieren. Nur so kann durch eine eventuell mögliche Allergenkenz oder durch eine gezielte Desensibilisierungsbehandlung die Krankheit geheilt werden. Sie ist unerlässlich zur Klärung der Frage, welche klinische Bedeutung eine, auf dem Boden eines positiven Hauttests und erhöhter spezifischer IgE-Konzentrationen im Blut nachgewiesene Sensibilisierung tatsächlich besitzt (Kroegel 1997a).

2.2. Experimentelle Allergie- und Asthmaforschung: Meerschweinchen-Mensch

Asthmaanfälle, die experimentell durch die Einatmung eines Antigen-Aerosols erzeugt werden, können einerseits als Testmethode für den asthmatischen Effekt von Allergenen und anderen Substanzen dienen, andererseits aber auch als Test für die Wirksamkeit asthmaprotektiver oder therapeutischer Massnahmen (Herxheimer 1956). In der Allergie- und Asthmaforschung spielen empfindliche Tiermodelle eine entscheidende Rolle. Neben Meerschweinchen werden weitere Tierarten wie Maus, Ratte, Schaf, Hund, Hase und Affen bei Untersuchungen über allergisches Asthma eingesetzt. Meerschweinchen werden allgemein als ein Modell für das menschliche Asthma bronchiale verwendet, da es viele Ähnlichkeiten zwischen beiden Spezies gibt, insbesondere in der Reaktion gegen viele kontrahierende und relaxierende Substanzen (Popa et al 1973), in der Histologie der Lunge von antigen-sensibilisierten Meerschweinchen und der Lunge von Asthmatikern (Kallos und Kallos 1984), in der sofortigen und verzögerten bronchialen Obstruktion (Ijima et al 1987, Hutson et al 1988), in der bronchialen Eosinophilie (Aoki et al 1988, Dunn et al 1988), in der bronchialen Reaktion gegen Allergene bei sensibilisierten Tieren oder Menschen und im Auftreten bronchialer Hyperreagibilität (Aoki et al 1988, Daffonchio et al 1989).

Andererseits gibt es immer noch kein Tiermodell für menschliches Asthma, das allgemein akzeptiert wird (Heuer et al 1996). Die Entwicklung relevanter Tiermodelle kann zur Klärung der Pathogenese der Atemwegskrankheiten beitragen. Die Verwendung von Tiermodellen für die Erforschung von Atemwegsallergien bei Menschen ist problematisch, dennoch können oft wichtige Einblicke in Mechanismus und mögliche therapeutische Modalitäten gewonnen werden (Renz et al 1992).

Alle Ergebnisse dieser Arbeit werden experimentell in einem Meerschweinchenmodell erarbeitet. Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Humanmedizin ist nicht selbstverständlich. Ob die Ergebnisse von tierexperimentellen Asthmauntersuchungen mit Meerschweinchen auf Untersuchungen in der Humanmedizin übertragbar sind, und wenn überhaupt, dann inwieweit, könnte auf verschiedene Weise untersucht werden:

- 1) Physiologie des Bronchialsystems der beiden Spezies miteinander vergleichen.
- 2) Immunsystem, immunologische Reaktion und Sensibilisierungsverhalten der beiden Spezies vergleichen.
- 3) Die Wirkung bekannter humaner Asthmamittel auf Meerschweinchen und Menschen vergleichen.

Diese Arbeit befasst sich mit Sensibilitätsuntersuchungen am Meerschweinchen und beschäftigt sich weiterhin mit der Wirkung humaner Asthmamittel auf Meerschweinchen.

2.2.1. Sensibilitätsuntersuchungen

Neuere Definitionen des Asthma bronchiale beruhen auf der pathophysiologischen Grundlage der Erkrankung, einer immunologischen Entzündung der Mukosa, die sich klinisch durch Hyperreagibilität und anfallsweiser Atemwegsobstruktion bemerkbar macht (Nolte 1991). Die Ursache der asthmatischen Entzündungsreaktion ist nicht in allen Details geklärt. Für eine Reihe eindeutiger Fälle - saisonales Asthma durch Pollen, allergisches Berufsasthma - ist offensichtlich, dass allergische Ursachen dominieren können (Schulze-Weringhaus 1993). Aus mehreren Untersuchungen ergibt sich, dass allergische Faktoren maßgeblich für den Schweregrad von Hyperreagibilität und Asthma sind (Schulze-Weringhaus 1993). Je ausgeprägter

Sensibilisierungen und je zahlreicher Expositionen gegen Inhalationsallergene sind bzw. je höher das Gesamt-IgE ist, desto stärker bzw. häufiger sind Hyperreagibilität und Asthma (Cockcroft und Hargreave 1989).

Asthmatische Bronchokonstriktion bei Meerschweinchen:

In der Pathogenese des menschlichen Asthma spielt die IgE-vermittelte Reaktion die Hauptrolle. Bei Meerschweinchen ist dagegen IgG wichtiger Antikörper bei asthmatischen Reaktionen (Ovary et al 1963, Parish 1970, Riedel et al 1988). Man kann aber mit geeigneten Sensibilisierungsmethoden neben IgG auch IgE induzieren (Andersson 1980). Im ersten Teil dieser Arbeit wurden in unserem Tiermodell Untersuchungen über Sensibilisierungsverhalten, Allergie und Immunreaktion von Meerschweinchen durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Sensibilisierung der Tiere mit OA vorgenommen, um variable obstruktive und immunologische Reaktionen hervorzurufen. Die Sensibilisierung mit einer hohen Dosis Ovalbumin ohne Adsorbens ist die klassische Methode, die vor allem die Bildung von IgG-Antikörper induziert (Ovary 1963, Parish 1970). In dieser Arbeit wurde 200 mg OA gelöst in 0,8 ml physiologischer Kochsalzlösung i.m. und i.p. injiziert (Sensibilisierungsmethode 1). Die zweite Methode ist die Sensibilisierung mit einer niedrigen Dosis OA mit Adsorbens z.B. Aluminiumhydroxid, die außer IgG noch IgE-Antikörper hervorruft (Andersson 1980a). In der vorliegenden Arbeit wurde die Sensibilisierung mit 10 µg OA suspendiert in 100 mg Aluminiumhydroxid mit 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung i.p. vorgenommen (Sensibilisierungsmethode 2). Aluminiumhydroxid funktioniert als ein Adsorbtionsmittel für Antigen (Ovalbumin). Durch die verzögerte Abgabe des Antigens wird eine verstärkte Antikörperbildung erreicht (Mutschler 2001). Der Zusatz eines Adsorbtionsmittels führt offenbar zu erheblichen Unterschieden bei der Sensibilisierung.

Die Frage, welche dieser zwei Methoden eine deutlichere und/oder dauerhaftere Sensibilisierung hervorruft, und weitere Einflüsse dieser Methoden auf die Sensibilität, werden ein Teil unserer Untersuchungen sein. Es wird bei der Sensibilisierung der Meerschweinchen auch Siliciumdioxid und Bordetella pertussis als Adsorbat eingesetzt (Heuer et al 1996). Bei Mäusen ist die allergische Reaktion von IgE dominiert und deshalb verzichtet man hier auf Adsorbat. (Renz et al 1992, DuBois et al 1989, Moseley et al 1988).

Außer anfänglicher systemischer Sensibilisierung der Tiere werden sie experimentell bedingt 1x wöchentlich mit inhalativem Ovalbumin exponiert. Ob dies zur Resensibilisierung führt, sieht man in den Ergebnissen der durchgeführten Versuche, die später beschrieben werden.

In dieser Arbeit wurde zur aktiven Sensibilisierung der Meerschweinchen immer Hühnereiweiß (Ovalbumin) als Antigen eingesetzt, da die Allergenwirkung von Ovalbumin wohlbekannt ist. Das kleine Molekül wird leicht durch die Mucos-Membran resorbiert. Andererseits ist Ovalbumin groß genug, dass es als Immunogen funktioniert (King 1966, Riedel et al 1988).

Es wurde in einigen Untersuchungen mit Meerschweinchen eine passive Sensibilisierung vorgenommen (Suda et al 1992, Geist et al 1995). Passive Sensibilisierung erfolgte durch Injektion von Antiovalbumin Serum. Dieses antikörperhaltige Serum stammte von Meerschweinchen, die vorher mit OA als Antigen sensibilisiert worden waren. In dieser Arbeit wurde die aktive Sensibilisierung - die oft angewandte Sensibilisierungsmethode - bevorzugt, da diese dem natürlichen Weg der Sensibilisierung näher liegt. Bei der aktiven Sensibilisierung wurde OA als Antigen und Allergen durch Injektion - intramuskulär und/oder intraperitoneal - am Tier verabreicht. Daraufhin bildete das Tier selbst Antiovalbumin Antikörper (IgG, IgE). Nach der inhalativen Provokation des passiv oder aktiv sensibilisierten Tieres kam es zur allergischen Antikörper-Antigen-Reaktion.

Es gibt für die Allergenprovokation eine Dosischwelle. Bei den vorliegenden Versuchsbedingungen und Sensibilisierungsmethoden sind bei Vernebelung durch höhere Dosen als 0,2%ige OA-Lösung die Tiere gefährdet und bei niedrigeren Dosen als 0,2%, z.B. 0,1%ige OA-Lösung, ist keine ausreichende allergische Reaktion zu sehen, so dass man zwischen Kontroll- und Verumgruppe keinen deutlichen Unterschied der Reaktionsstärke sieht. Um die Anaphylaxie (überstarke und lebensgefährliche allergische Sofortreaktion) zu verhindern, haben andere Arbeitsgruppen eine hohe Dosis Antihistamin (z.B. Mepyramine) eingesetzt (Andersson 1980b, Heuer et al 1996), da die Sofortreaktion vor allem histaminvermittelt ist. In unserem Fall wurde darauf verzichtet, da einerseits hier eine Dosischwelle gefunden wurde, so dass die anaphylaktoide Reaktion (akute allergische Allgemeinreaktion) vermieden werden konnte, andererseits die allergische Sofortreaktion ohne jeglichen Einfluss fremder Faktoren untersucht werden sollte.

Die Sensibilitätsuntersuchung über mehrere Wochen diente dazu:

1. Art und Dauer der sensiblen Phase bei Meerschweinchen zu erforschen.

2. Effektivere Sensibilisierungsmethoden und eine optimale Allergendosis zu finden, um eine deutliche und über längere Zeit anhaltende bronchiale Reaktion gegen Allergene produzieren zu können.
3. Die mögliche Resensibilisierung oder einen Tachyphylaxieeffekt bei wöchentlicher inhalativer Ovalbuminexposition (spezifische Allergen-Provokation) zu dokumentieren.
4. Die eventuelle Saisonabhängigkeit der Sensibilität und allergische Reaktion bei Meerschweinchen zu untersuchen.
5. Die bronchiale Hyperreagibilität bei Meerschweinchen durch Histamin-Provokation in Betracht zu ziehen.

2.2.2. Bekannte humane Asthmamittel

Im Zweikammerganzkörperplethysmographen nach Dorsch und Hess kann bei sensibilisierten Meerschweinchen die antiasthmatische Wirkung von Pharmaka sowohl nach oraler, parenteraler, als auch inhalativer Applikation getestet werden (Haen et al 1999).

Substanzen zur Behandlung des Asthma bronchiale lassen sich nach ihrer überwiegenden pharmakologischen Wirkung in 1. symptomatische oder bronchodilatatorische und 2. kausale oder antientzündliche Stoffe unterteilen. Der Wirkungseintritt der Bronchodilatoren erfolgt vergleichsweise rasch, so dass sie sich zur Behandlung der akuten Exazerbation allergischer Erkrankungen eignen. Ihre pharmakologischen Effekte sind jedoch auf wenige Stunden zeitlich begrenzt, und ein eindeutiger antientzündlicher Effekt besteht nicht oder ist von untergeordneter Bedeutung. Zur Gruppe der Bronchodilatoren gehören β_2 -Sympathomimetika, Anticholinergika und Phosphodiesteraseinhibitoren.

2.2.2.1. Bronchodilatoren:

β_2 -Sympathomimetika sind die effektivsten bekannten Bronchodilatoren (Haen 1999, Tattersfield 1992, Ukena und Sybrecht 1993). Dabei wird der Tonus von Bronchien und Trachea einmal durch direkten Angriff an der glatten Muskulatur gesenkt, daneben indirekt über eine Hemmung der cholinergen Transmission. Kurzwirksame inhalative β_2 -Sympathomimetika sind Mittel der Wahl zur bedarfsorientierten Symptomkontrolle. Langwirksame inhalative β_2 -

Sympathomimetika (Formeterol und Salmeterol) mit einer Wirkdauer von 9-12 Stunden und β_2 -Sympathomimetika zur systemischen Anwendung mit Wirkdauer von 4-6 Stunden sind zur Prophylaxe des Asthmaanfalls angezeigt; wobei die langwirksamen β_2 -Mimetika mit 9-12 stündiger Wirkdauer viel praktischer sind (Haen 2001). Im Gegensatz zu einer Mono-Dauertherapie mit β -Sympathomimetika kann die kontinuierliche Zugabe eines Bronchodilatators – Formeterol, Salmeterol oder Theophyllin - den Effekt einer entzündungshemmenden Therapie mit Glukokortikoiden weiter verstärken, ohne dass dies auf einer eigenen entzündungshemmenden Wirkung des Bronchodilatators beruhen muss (Haen 2001).

Theophyllin ist ein mittelstarker Bronchodilatator und wird seit 80 Jahren in der Behandlung des Asthma genutzt. Neben der direkten Erweiterung der glatten Muskulatur der Bronchien soll Theophyllin den mukoziliären Schleimtransport und die Atmung durch erhöhte Effizienz der Zwerchfellkontraktion verbessern (Aubier und Barnes 1995). Es wird auch eine zusätzliche entzündungshemmende und immunmodulierende Wirkung von Theophyllin diskutiert (Haen 1999, Aubier und Barnes 1995, Banner et al 1995, Djukanovic et al 1995). Theophyllin zeigt kaum eine protektive Wirkung gegenüber der durch Histamin und Eicosanoide ausgelösten Sofortreaktion (Martin 1997). Im Hinblick auf die geringe therapeutische Breite und die vielfältigen Neben- und Wechselwirkungen wird Theophyllin nach aktuellen Empfehlungen der Atemwegsliga (Wettengel et al 1994) erst dann eingesetzt, wenn die topische Anwendung von Glukokortikoide als Basismedikation und β_2 -Sympathomimetika als Bedarfsmedikation keine befriedigende Asthma-Kontrolle mehr erlauben. Retardiertes Theophyllin ist Mittel der Wahl zur Prophylaxe des nächtlichen Asthma (alternativ langwirksame bzw. retardierte orale β_2 -Sympathomimetika) (Haen 1995, Haen 2001).

2.2.2.2. Entzündungshemmer:

Im Gegensatz zu symptomatischen Substanzen besitzen antiinflammatorische Medikamente keinen unmittelbaren bronchodilatatorischen Effekt und eignen sich somit nicht zur Notfallbehandlung asthmatischer Erkrankungen. Ihre Wirkung beeinflusst jedoch die der asthmatischen Entzündung zugrundeliegenden Prozesse und somit Verlauf und Schwere der chronisch-asthmatischen Erkrankung. Zur Gruppe antientzündlicher Medikamente gehören v. a. Glukokortikosteroide aber auch Mastzellstabilisatoren wie DNCG und Nedocromilnatrium und

Hemmstoffe von Entzündungsmediatoren wie Antileukotriene, Anti-IgE-Antikörper, Antihistaminika und PAF-Antagonisten. Antihistaminika haben sich wegen zu geringer Wirkungsstärke bei der Therapie chronisch-obstruktiver Atemwegserkrankungen nicht bewährt; die Entwicklung von PAF-Antagonisten wurde vorerst wegen zu geringer Wirkungsstärke eingestellt (Haen 2000).

Glukokortikoide sind seit Anfang der 90er Jahre zum zentralen Behandlungsprinzip des Asthma geworden, da seither das Konzept einer entzündungshemmenden Medikation die dauerhafte Bronchodilatation der Atemwege abgelöst hat (Haen 2001). Sie sind ab Stufe 2 des Asthma bronchiale unentbehrlich. Kortikosteroide gelten als die wirksamsten derzeit verfügbaren antientzündlichen Medikamente zur Behandlung des Asthma bronchiale. Ihre pharmakologische Wirksamkeit erstreckt sich auf verschiedene Ebenen der asthmatischen Entzündung, die sowohl pathophysiologische, humorale als auch zelluläre Mechanismen einschließt (Kroegel et al 1995). Glukokortikoide unterdrücken nahezu sämtliche in der Wand der Atemwege ablaufenden Entzündungsreaktionen, indem sie die Proliferation, Differenzierung, Migration und Aktivierung der Entzündungszellen sowie die Bildung von Prostaglandinen, Leukotrienen und PAF hemmen. Durch diese Effekte verringern Glukokortikoide auch die bronchiale Hyperreaktivität. (Mutschler 2001).

Inhalative Kortikosteroide gelten seit Anfang der 90er Jahre als antientzündliche Medikation der ersten Wahl bei stabilem mildem bis moderatem Asthma (Haahtela et al 1994, Toogood 1990). Ihre große therapeutische Breite erklärt sich aus dem Verhältnis von hoher lokaler Wirkung und sehr hoher glukokortikoider Potenz bei geringer systemischer Wirksamkeit, die 1. auf die geringe Resorption und 2. eine vergleichsweise relativ schnelle Elimination aus dem Körper zurückgeht (Haen 2001). Die Wirkung topischer Glukokortikoide ist in der Regel im Verlauf einer Woche objektivierbar, während das Maximum ihrer Wirkung frühestens nach 3-4 Wochen erreicht wird (Ukena und Sybrecht 1993). Inhalative Kortikoide weisen eine deutlich bessere Verträglichkeit auf, das Spektrum und der Schweregrad der unerwünschten Effekte ist deutlich geringer als bei systemischer Gabe (Haen 2001).

Der längere Einsatz **systemischer Glukokortikoide** sollte aufgrund der Nebenwirkungen auf schwere Verlaufsformen des Asthma bronchiale oder akute Exazerbationen beschränkt bleiben. Die systemischen Glukokortikoide sollen ein- bis zweimal täglich appliziert werden. Der Wirkungseintritt beträgt bei oraler Gabe 5-8 Stunden und parenteral 4-6 Stunden (Haen und Uhl

1996). Der klinische Erfolg tritt üblicherweise innerhalb von 3-4 Tagen nach Therapiebeginn ein, in Einzelfällen jedoch auch erst nach 1 Woche (Ukena und Sybrecht 1993).

Antileukotriene sind seit einigen Jahren zugelassen. Leukotriene sind Metabolite der Membranlipide. Durch das Enzym Phospholipase A2 wird aus Phospholipiden der Zellmembran Arachidonsäure freigesetzt. Die Arachidonsäure kann innerhalb der Zelle über zwei Stoffwechselwege metabolisiert werden: Durch die Zyklooxygenase kommt es zur Bildung von Prostaglandinen und Tromboxanen, durch die 5-Lipoxygenase (5-LO) kommt es in Verbindung mit dem 5-LO-aktivierenden Protein (FLAP) zur Bildung von Leukotrienen. Dabei entsteht zunächst aus der Arachidonsäure das instabile Zwischenprodukt 5-HPETE und anschließend das Epoxid Leukotrien A4. Das instabile LTA4 kann entweder zu LTB4 hydrolysiert werden oder durch den Einbau eines Glutathionrestes zu LTC4 umgewandelt werden. LTC4 wird extrazellulär in LTD4 umgewandelt und schließlich entsteht durch eine Dipeptidase das stabile LTE4 (Magnussen et al 1997).

Die Cysteinyl-Leukotriene LTC4, LTD4, LTE4 finden sich in erhöhter Konzentration im Blut (Okubo et al 1987), in der BAL (Lam et al 1988, Wardlaw et al 1989, Pliss et al 1990) und im Urin (Drazen et al 1992, Kumlin et al 1992, Kikawa et al 1992) von Patienten mit Asthma bronchiale. In vitro und ex vivo bewirken Cysteinyl-Leukotriene folgende Effekte, die für die Pathogenese des Asthma bronchiale von Bedeutung sind: Kontraktion der Atemwege (Jones et al 1982, Samhoun et al 1984), Zunahme der Mukossekretion (Coles et al 1983, Marom et al 1982), Ausbildung eines Schleimhautödems durch Plasmaexsudation (Evans et al 1989) und Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Piancentini und Kaliner 1991), Chemotaxis auf eosinophile Granulozyten (Laitinen et al, Spada et al 1994), Proliferation der glatten Atemwegsmuskulatur (Panettieri et al 1996, Wang et al 1993), Kontraktion der pulmonalen Arterien (Gorenne et al 1996).

Grundsätzlich lassen sich 3 Substanzgruppen, welche in den Leukotrienstoffwechsel eingreifen, unterscheiden: 5-Lipoxygenase-aktivierende Protein-Antagonisten (FLAP-Antagonisten), 5-Lipoxygenase-Inhibitoren (5-LO-Inhibitoren) und Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten (LT-RA). Während FLAP-Antagonisten indirekt und 5-LO-Inhibitoren direkt die enzymatische Aktivität der 5-Lipoxygenase hemmen und damit die Synthese von allen Leukotrienen blockieren, richten sich die Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten nur gegen die Cysteinyl-Leukotrien-(LTC4, LTD4, LTE4)-Rezeptoren (Magnussen et al 1997). Man unterscheidet grundsätzlich zwischen den Rezeptoren für LTB4 und den Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptoren, von denen zwei Subtypen

bekannt sind: CysLT1-Rezeptor und CysLT2-Rezeptor. Die momentan bekannten Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten richten sich gegen die durch LTC₄, LTD₄ und LTE₄ aktivierten CysLT1-Rezeptoren auf der glatten Bronchialmuskulatur. CysLT2-Rezeptoren finden sich vorwiegend an pulmonalen Gefäßmuskelzellen. Als Hauptproduzenten der Cysteinyl-Leukotriene sind die eosinophilen Granulozyten und die Mastzellen anzusehen.

Die Antileukotriene führen nach Einzelgabe und Verabreichung über einen längeren Zeitraum im Vergleich zu den Placebo behandelten Kontrollen zur Verbesserung lungenfunktioneller Parameter (FEV₁) nach Provokation mit Allergenen, Analgetika, körperlicher Anstrengung oder anderen Substanzen. Nach Allergen-Exposition erstreckte sich die bronchodilatatorische Wirkung der Antileukotriene neben der Frühreaktion auch auf die asthmatische Spätreaktion (Kroegel et al 1997). Neben Bronchodilatation zeigen Antileukotriene antientzündliche Effekte. Die selektive Blockade des LTD₄-Rezeptors führt zu einem antientzündlichen Effekt. In klinischen Phase-III-Studien an Erwachsenen und Kindern kam es unter Montelukast im Vergleich zu Placebo zu einer Senkung der Eosinophilenzahl im peripheren Blut. Darüber hinaus wurde auch eine Senkung der Eosinophilenzahl im Sputum nachgewiesen (Reiss 1997). 5-LO-Inhibitoren wirken atemwegentzündungshemmend, indem sie die Eosinophilenzahl im Blut und BAL vermindern.

Leukotrien-Rezeptorantagonisten und Leukotrien-Syntheseinhibitoren führen zur Abnahme der bronchialen Hyperreagibilität. Weiterhin reduzieren die Antileukotriene den Bedarf an β -Sympathomimetika. Weniger Exazerbationen unter der Behandlung führt zur Einsparung von Kortikosteroiden. Von besonderem Interesse ist, dass die Wirkung der Leukotrienantagonisten additiv zur Wirkung von β -Agonisten und inhalativen bzw. systemischen Glukokortikosteroiden auftritt (Kroegel 1997a).

Die Antileukotriene stellen eine Bereicherung in der Therapie des Asthma bronchiale dar. Bei der Behandlung von Patienten mit ASS-Intoleranz sind die Antileukotriene jedem bisher bekannten Medikament überlegen (Magnussen et al 1997). Nach den bisher vorliegenden Erfahrungen könnte der Einsatz von Antileukotriene sowohl bei der Behandlung des leichten und mittelgradigen Asthma sinnvoll sein.

Es wurde versucht, im Rahmen dieser Arbeit je einen Vertreter von allen Gruppen der bekannten Asthmamitteln im Meerschweinchenmodell zu testen. Damit wollte man folgendes prüfen, beziehungsweise erreichen:

- Validierung dieses Tiermodells
- Positive Kontrollexperimente; Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Meerschweinchenuntersuchungen und besonders aus unserem konkreten Tiermodell auf die Humanmedizin.
- Untersuchungen neuer pflanzlicher potentieller Asthmamittel.

2.3. LABTEC Lungenfunktions-Analyse-System (Zweikammerganzkörperplethysmograph)

Die Versuchstiere wurden mit dem Zweikammerganzkörperplethysmographen nach Dorsch und Hess „LABTEC Lungenfunktions-Analyse-System bei Kleintieren“ (Dorsch und Hess 1992) durchgeführt. Vor einigen Jahren wurden bereits eine Reihe von Untersuchungen mit einem Prototyp dieses Gerätes durchgeführt, bei dem z.T. noch eine Handauswertung der Messdaten nötig war (Riedel et al 1988; Dorsch und Wagner 1991). Heute ist das Gerät automatisiert, die Messung wird automatisch ausgewertet und der Messwert in einer computerverarbeitbaren Weise elektronisch gespeichert oder aber als Papiausdruck ausgegeben (Haen et al 1999). Der Versuchsaufbau entspricht dem Prinzip eines volumenkonstanten Plethysmographen, da nicht die Volumenänderungen registriert, sondern die in einer starren, luftdicht abgeschlossenen Kammer auftretenden Druckschwankungen gemessen werden (Mattys 1972). Es handelt sich hierbei um ein hochsensitives System, um die Lungenfunktion an kleinen Versuchstieren zu messen. Parallel durchgeführte systemische und lokale immunologische Untersuchungen haben die Ergebnisse dieser Methode bestätigt (Riedel et al 1988). Hier wurden nach SO₂-Exposition und inhalativer Ovalbuminsensibilisierung in 7 Ovalbuminprovokationstests an jedem zweiten Tag die CA-Werte im Zweikammerganzkörperplethysmograph nach Dorsch bestimmt. Parallel nach jeder Ovalbuminprovokation wurden in Serum und BAL der Verumgruppe (mit SO₂-Belastung) und der Kontrollgruppe (ohne SO₂-Belastung) Antikörper gegen Ovalbumin und zwar Gesamt IgG und IgG1 gemessen. Immunologische Parameter bestätigen die Lungenfunktionsmessungen (Riedel et al 1988). Die Verumgruppe zeigte nach OA-Exposition eine signifikante

Bronchokonstriktion (67%). Parallel war bei der Verumgruppe eine signifikante Steigerung der OA-spezifischen Antikörper in Serum und BAL im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen. Beide Untersuchungsmethoden zeigen übereinstimmend, dass die Belastung mit niedriger (0.1 ppm) und mittlerer (4.3 ppm) Konzentration von SO₂ die lokale allergische Reaktion bei Meerschweinchen erleichtern (Riedel et al 1988).

Die Methode mit dem Zweikammerganzkörperplethysmographen erlaubt eine wiederholte nicht invasive Messung am wachen, nicht narkotisierten Versuchstier. Es gibt drei Doppelkammern, die gleichzeitig betrieben werden können. Die Tiere sitzen in einem Schlitten. Zwei Stäbe beiderseits des Halses halten den Kopf in der richtigen Position. Der Schlitten wird in die

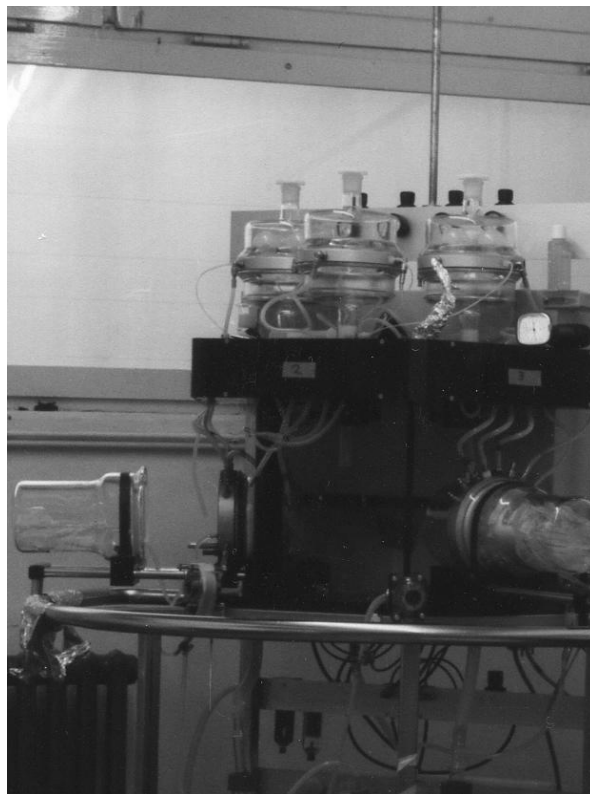


Abb. 1: Zweikammerganzkörperplethysmograph

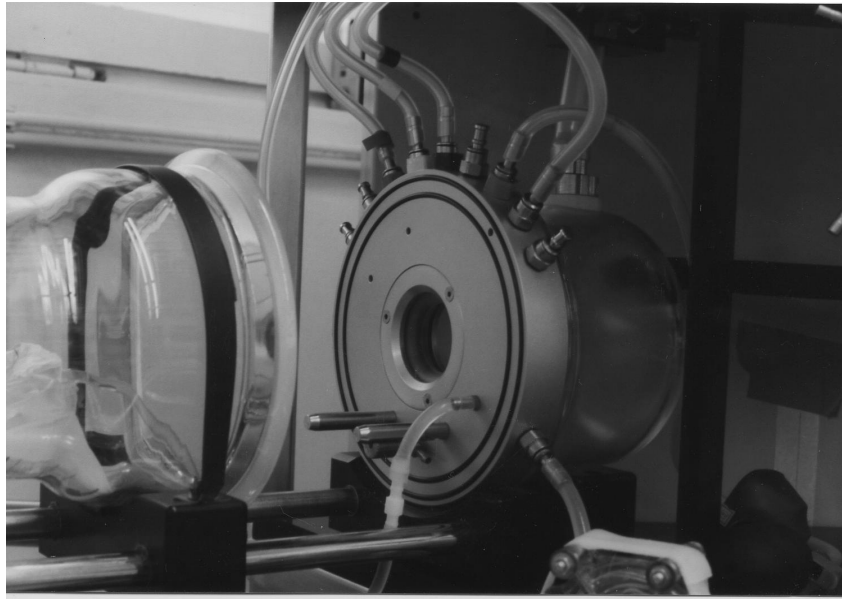


Abb. 2: Kopf- und Körperkammer und multifunktionaler Flansch

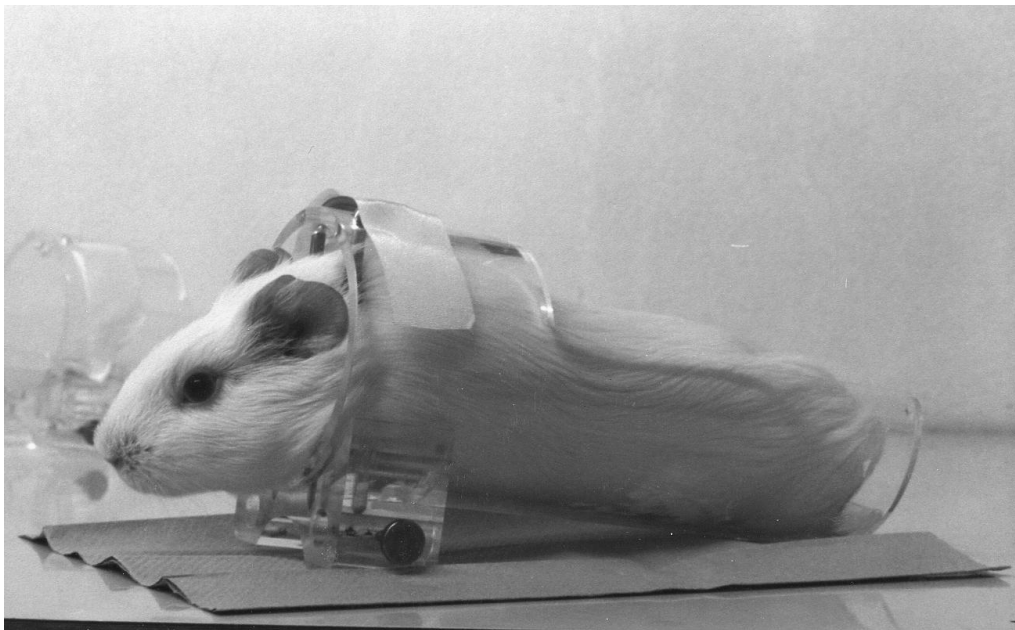


Abb. 3: Meerschweinchen in Schlitten

Körperkammer des Gerätes plaziert. Das Verbindungselement der beiden Hauptkammern, der Kopf- und Körperkammer, ist ein multifunktionaler Flansch. Der Flansch befindet sich zusammen mit den beiden Teilkammern verschiebbar auf einem Grundgestell mit zwei

Gleitschienen. Er ist so konstruiert, dass mittels Vakuumtechnik ein hermetisch dichtes Verbinden, aber auch schnelles Lösen der Kammern möglich ist. Eine aufblasbare Manschette, die in der zentralen Bohrung des Flansches eingelassen ist, dient dazu, die beiden Kammern voneinander getrennt und dicht zu halten. Die Kopfkammer kann separat mit einem Aerosol beschickt werden. Für jeden Plethysmograph ist eine Vernebelungsvorrichtung angebracht, welche die Kopfkammer gleichzeitig mit drei verschiedenen Provokations-, Verum- und Placebolösungen von einer Tröpfchengröße zwischen 3-5 μm beliefern kann.

Die atemabhängigen Druckänderungen werden mittels Druckmessern registriert. Die Volumenänderungen werden mit Hilfe des Boyle-Mariotte'schen Gesetzes aus Druckänderungen umgerechnet. Alle Signale aus Druck- und Volumenänderungen werden digitalisiert. Eine spezielle Software ermöglicht es, die Resultate aus den Rohdaten in Tabellen und Graphiken darzustellen. Die Volumenänderungen, die beim Atemvorgang des Tieres in beiden Kammern entstehen, werden graphisch in einem zweidimensionalen Diagramm dargestellt. Sie ergeben eine Kurve, durch deren inspiratorischen und expiratorischen Wendepunkt jeweils eine 45° Linie gezogen wird. Der vertikale Abstand zwischen den beiden Linien gibt dasjenige Luftvolumen wieder, welches intrahorokal komprimiert werden muss, um die bronchiale Obstruktion zu überwinden. Dieser Parameter wird als „Compressed Air“ bezeichnet. Die Lungenfunktionsvariable ist ein geeignetes Mass für die Schwere einer Bronchokonstriktion (Dorsch et al 1983). Neben dem Compressed Air-Wert können vom Gerät die Atemfrequenz, der Atemwegswiderstand und das thorakale Gasvolumen bestimmt werden (Haen et al 1999). Das „LABTEC Lungenfunktions-Analyse-System“ kann bei Dr. Benno Hess, Fa. Meßtechnik, Melatener Str. 89a in 52074 Aachen, bestellt werden.

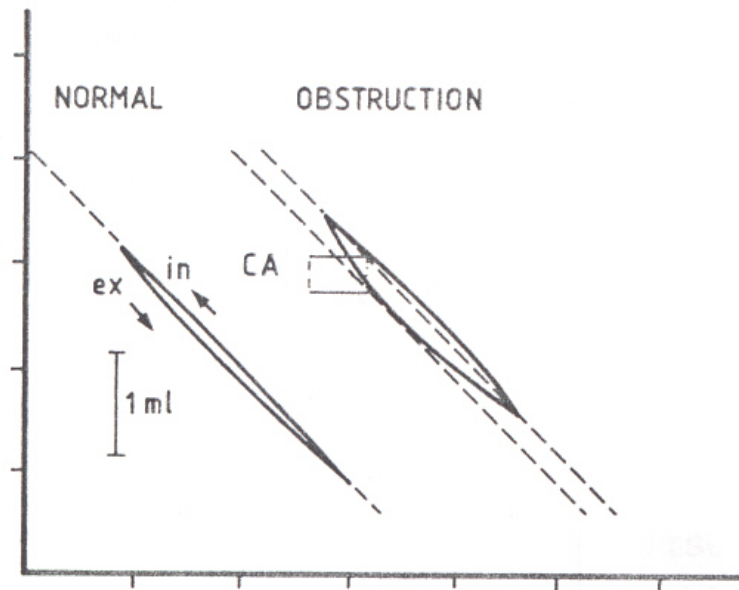


Abb. 4: CA-Atemschleife bei normaler Atmung (links)
 und bei einem Asthmaanfall (rechts);
 Horizontalachse: Volumen Kopfkammer
 Vertikalachse: Volumen Körperkammer

2.4. Fragestellung

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war, eine **Validierung der von Dorsch-Hess entwickelten Ganzkörper-Plethysmographie** am Meerschweinchen. Im Einzelnen war unser Ziel:

1. die **Überprüfung der Ovalbuminsensibilisierung beim Meerschweinchen**: die optimale Allergendosen, effektivere Sensibilisierungsmethoden, Art und Dauer der Allergen empfindlichen Phase, eine mögliche Re-Sensibilisierung oder Tachyphylaxie Effekt bei wiederholter Allergenexposition, eine evtl. Saisonabhängigkeit der Sensibilisierung bzw. der allergischen Reaktion bei Meerschweinchen und die Prüfung anderer Möglichkeiten z. B. mit Histamin eine bronchiale Hyperreagibilität bei Meerschweinchen zu erfassen.
2. die **Validierung dieses Tiermodells durch Kontrollexperimente** mit etablierten Asthmamitteln, die auch Anhaltspunkte für die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Meerschweinchen-Modell auf die Humanuntersuchung liefern sollen,
3. die **Untersuchung der antientzündlichen Wirkung einiger Drogen** aus der Volksmedizin mit unterschiedlicher Herkunft nach Langzeitapplikation und die Untersuchung der **antiasthmatischen Wirkung von Acetophenonen (z.B. Acetosyringenin)**.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Dunkin Hartley Meerschweinchen im Alter von ca. 2 Wochen, Gewicht ca. 150 g bis 250 g, von der Tierzuchtanlage Charles River in Kisslegg verwendet. 2 Tage nach ihrem Eintreffen im Tierstall wurden sie mit Ovalbuminlösung je nach der ausgewählten Methode sensibilisiert. 2 Wochen später, am Anfang des Versuches, wogen sie zwischen 350 g und 400 g. Nachher haben sie wöchentlich 50g - 80 g zugenommen. Die Tiere wurden im 12 Stunden dunkel-hell Zyklus in Käfigen auf Streu gehalten.

Für die Untersuchungen auf antiasthmatische Wirkung wurden immer 15 Tiere bestellt. Die Anzahl der Verum- und Kontrolltiere war möglichst gleich. Bei den Sensibilitätsuntersuchungen war die Anzahl der Tiere unterschiedlich. Die genaue Anzahl (n) in jeder Gruppe wird in jedem Versuch angegeben. Nach Ende der Versuche kamen die Tiere in ein anderes Labor.

3.1.2. Testsubstanzen

- Fenoterol: Fenoterol Hydrobromid Böhringer, Ingelheim
gelöst in physiologischer Kochsalzlösung

- Theophyllin: Bronchoparat® Ampullen, Wirkstoff: Theophyllin-
Natriumglycinat, Klingepharma, München

- Methylprednisolon: Urbason® soluble forte 1000 Hoechst, Frankfurt
gelöst in physiologischer Kochsalzlösung
- Budesonid: Pulmicort® 1,0 mg/2 ml Suspension, Astra Wedel
verdünnt mit Lösungsmittel von Pulmicort
- Montelukast: Montelukast-Natrium, MSD, Haar
gelöst in 40%igem Ethanol in physiologischer Kochsalzlösung
- Aluminiumhydroxid: Aluminiumhydroxydatum colloidal DAB10/ph.Eur, Caelo GmbH,
Hilden, suspendiert in physiologischer Kochsalzlösung
- Ovalbumin: Ovalbumin Grad III Sigma, Deisenhofen
gelöst in physiologischer Kochsalzlösung
- Histamin: Histamine Dihydrochloride, Sigma, Deisenhofen
gelöst in physiologischer Kochsalzlösung
- *Picrorhiza kurroa*: Ethylacetat-Fraktion hergestellt im Institut für Pharmazeutische Biologie der
LMU München (Dr. A. Müller); bei der Applikation gelöst in 20%igem
Ethanol in physiologischer Kochsalzlösung
- Wascha: (Gummiharz von *Dorema ammoniacum* D. Don.)
Traditionelle Droge aus Iran, suspendiert in 20%igem Ethanol in
physiologischer Kochsalzlösung
- *Caiophora sepiaria*: Methanolextrakt hergestellt im Institut für Pharmazeutische Biologie
der LMU München (Dr. A. Müller); gelöst in 20%igem Ethanol in
physiologischer Kochsalzlösung

- Angurate: (*Mentzelia grandiflora*, *Mentzelia cordifolia* Domba)
Methanolextrakt hergestellt im Institut für Pharmazeutische Biologie der LMU München (Dr. A. Müller); gelöst in 20%igem Ethanol in physiologischer Kochsalzlösung
- Acetosyringenin: 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon, Aldrich-Chemie, Steinheim
gelöst in 20%igem Ethanol in physiologischer Kochsalzlösung

3.2. Methoden

3.2.1. Applikationsmethoden

3.2.1.1. Orale Applikation

Fenoterol, Theophyllin, Methylprednisolon und Pflanzenextrakte wurden oral verabreicht. Hierfür wurden die Lösungen aus Wirksubstanzen und Pflanzenextrakten vorsichtig geschlündelt, damit alles von den Tieren eingenommen wird. Die orale Applikation war einmal eine Stunde vor der Allergen-Exposition, bzw. über 2Tage (3x täglich, über den Tag verteilt) und am 3. Tag 1x eine Stunde vor dem Provokationstest. Bei den Langzeituntersuchungen wurde mindestens 3 Wochen lang 1x täglich morgens oral appliziert.

3.2.1.2. Inhalative Verabreichung

Fenoterol und Budesonid und Provokationssubstanzen wie Ovalbumin und Histamin wurden inhalativ appliziert. Mit Hilfe der Vernebelungsvorrichtung des Plethysmographes wurden die Lösungen aus diesen Substanzen in die Kopfkammer, und damit in die Atemluft der Tiere

gebracht. Die inhalative Applikation erfolgte genauso wie die orale Verabreichung, nach einmaliger, 3-tägiger bzw. 3-wöchiger Therapie.

3.2.1.3. Intramuskuläre und intraperitoneale Applikation

Zur Sensibilisierung der Tiere wurde die Lösung des Ovalbumin in isotonischer Kochsalzlösung intramuskulär und/oder intraperitoneal verabreicht.

3.2.2. Sensibilisierung

Es wurden zwei unterschiedliche Methoden zur aktiven Sensibilisierung durchgeführt. Bei beiden Methoden wurden die Tiere 2 Tage nach Eintreffen im Tierstall mit Ovalbumin sensibilisiert.

Sensibilisierungsmethode 1 (ohne Adsorbtionsmittel): Nach der 1. Methode wurden die Tiere mit jeweils 200 mg Ovalbumin, gelöst in 0,8 ml physiologischer Kochsalzlösung (Konz. = 25%), durch intramuskuläre und intraperitoneale Injektion von je 0,4 ml sensibilisiert.

Sensibilisierungsmethode 2 (mit Adsorbtionsmittel): Nach der 2. Methode wurde jedem Tier 10 µg Ovalbumin und 100 mg Aluminiumhydroxid, suspendiert in 0,5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung, intraperitoneal verabreicht.

Zwei Wochen nach der Sensibilisierung reagierten die Tiere auf Ovalbuminprovokation in der Atemluft mit einer Bronchokonstriktion. Tiere die in diesem Sensibilitätstest nicht reagierten, wurden ausgemustert. Dies kam nur selten vor.

3.2.3. Prüfung der Sensibilität

3.2.3.1. Ovalbuminprovokation

14 Tage nach der Sensibilisierung reagierten die Tiere auf Ovalbumin in der Atemluft mit einer Bronchokonstriktion. Zur Bestimmung dieser Bronchokonstriktion wurden die Tiere im Ganzkörperplethysmographen 5 Sekunden der Vernebelung einer 0,2%igen Ovalbuminlösung in physiologischer Kochsalzlösung exponiert. Bis zur Minute 2 nach Beginn der Exposition wurde alle 30 Sekunden, danach bis zur Minute 8 jede Minute, die bei der Expiration im Brustraum der Tiere gefangene Luft (CA-Wert) bestimmt. Zur Minute 10 wurden die Tiere erneut für 15 Sekunden lang der vernebelten Ovalbuminlösung exponiert und anschließend der CA-Wert bis zur Minute 12 alle 30 Sekunden und bis zur Minute 18 jede Minute bestimmt.

Bei gefährdeten Tieren wurde während der Allergenexposition eine inhalative Fenoterolgabe als Rettungsmaßnahme vorgenommen. Hier wurde 0,013%ige Fenoterollösung in physiologischer Kochsalzlösung für 30 Sekunden vernebelt.

3.2.3.2. Histaminprovokation

Zur Bestimmung der Reaktion auf Histamin in der Atemluft wurden die Tiere für 30 Sekunden lang der Vernebelung einer 0,1%igen Histaminlösung in physiologischer Kochsalzlösung exponiert. Bis zur Minute 10 nach Beginn der Inhalation wurde der CA-Wert alle 30 Sekunden bestimmt.

3.2.4. Experimentelle Planung

Wenn eine Sofortwirkung oder eine nur kurz anhaltende Wirkung erwartet wurde, wurde ein Überkreuz-Protokoll (Cross over) angewendet. Wenn die Untersuchung über mehrere Tage und Wochen (vor allem bei entzündungshemmender Wirkung) dauern musste, war ein Protokoll für Langzeituntersuchung nötig.

3.2.4.1. Bestimmung der akuten antiasthmatischen Wirkung

Die Versuche mit Bronchodilatoren erfolgten anhand eines Überkreuz-Protokolls. Jede Tiergruppe von 15 sensiblen Tieren wurde nach dem Zufallsprinzip in zwei Untergruppen eingeteilt. Die Verumgruppe erhielt die Testsubstanz, während die Kontrollgruppe lediglich das Lösungsmittel erhielt. 4 bis 7 Tage nach dem 1. Allergenprovokationstest wurden die Versuchsreihen wiederholt, wobei diesmal die ehemalige Kontrollgruppe die Testsubstanz erhielt und die ehemalige Verumgruppe zur Kontrollgruppe wurde.

Nach dieser Methode wurden Versuche mit Einmal-Applikation von Wirksubstanz 1 Stunde vor Allergenexposition oder Versuche über 3 Tage, nämlich 3x tägliche Applikation mit der letzten Gabe wieder 1 Stunde vor Allergenprovokation (3 Tage Therapie) vorgenommen.

3.2.4.2. Langzeituntersuchung zur Bestimmung der entzündungshemmenden antiasthmatischen Wirkung

Das zweite Versuchsprotokoll wurde vor allem für entzündungshemmende Substanzen genutzt, wo eine längere Versuchsdauer (mind. 3 Wochen) nötig war. Die Tiere wurden nach dem Sensibilitätstest in zwei Gruppen eingeteilt, so dass beide Gruppen durchschnittlich ungefähr gleiche Reaktionsstärke zeigten. An die Verumgruppe wurden mindestens 3 Wochen lang 1x täglich Testsubstanzen appliziert und an die Kontrollgruppe wurde in gleicher Weise das Lösungsmittel verabreicht. Bei beiden Gruppen wurde einmal wöchentlich die Sensibilität auf inhalative OA-Provokation bestimmt.

3.2.4.3. Langzeituntersuchung zur Bestimmung der Sensibilität

Bei der Sensibilitätsuntersuchung wurden, je nach konkretem Versuchsplan, gleiche Tiergruppen nach der Sensibilisierung unbehandelt über längere Zeit untersucht. Es wurde 1x wöchentlich nach inhalativer OA-Exposition die bronchokonstriktorische Reaktionsstärke gemessen.

3.2.5. Dokumentation und Statistik

3.2.5.1. Grafische Darstellung der CA-Mittelwerte und Standardabweichung

Die gemessenen CA-Werte für Kontroll- und Verumtiere wurden in Tabellen eingetragen. Aus den Werten wurden deren Mittelwert und Standardabweichung für die jeweilige Messzeit (0. bis 18. Minute) errechnet. Die grafische Darstellung für einzelne Versuche zeigt den zeitlichen Verlauf der CA-Werte in Mittelwert.

Zur grafischen Darstellung der Versuche über mehrere Wochen wurde zuerst für jedes Tier die Fläche unter der CA/Zeit-Kurve für den entsprechenden Messtag errechnet. Danach wurde der Mittelwert der AUC-Werte der Kontroll- und Verumgruppe für jeden Messtag errechnet und grafisch dargestellt.

3.2.5.2. Prozentuale Inhibition

Die prozentuale Hemmung der Bronchialobstruktion wird als Maß der asthmaprotektiven Wirksamkeit herangezogen. Als errechnete Größe gibt sie den Grad der Hemmwirkung einzelner Substanzen an (Dorsch, Wagner, Bayer 1989).

Es wurden zunächst die Mittelwerte der AUC von Kontroll- und Verumgruppe für den entsprechenden Messtag bestimmt. Zur Berechnung der prozentualen Inhibition wird der Mittelwert der AUC von der Kontrollgruppe gleich 100 % und der Mittelwert der AUC von der Verumgruppe gleich x % gesetzt und über einen Dreisatz berechnet. Die prozentuale Inhibition ergibt sich durch Subtraktion des x %-Wertes vom 100 %-Wert.

$$PI=100[1-MW(AUCV)/MW(AUCK)]$$

3.2.5.3. Statistik

Bei den Versuchen mit Kontroll- und Verumgruppen wurden zuerst für den bestimmten Messtag bei jedem Tier die Fläche unter der CA-/Zeit-Kurve für jedes kleine Zeitintervall berechnet. Zum Beispiel für das Tier K1:

(in Minute 3 : CA = 0,67) und (in Minute 2 : CA = 0,22)

$$AUC \text{ in Minute 3} = (0,67 + 0,22)/2 \times (3-2)$$

Dann wurde für jedes Tier die Summe der AUC-Werte über die gesamte Messzeit (0. bis 18. Minute) berechnet. Diese AUC-Werte für jedes Tier und jeweiligen Messtag wurden dann mit entsprechenden statistischen Methoden miteinander verglichen.

Mit Hilfe statistischer Tests wird geprüft, ob eine Hypothese über die Grundgesamtheit anhand der Daten der Stichprobe bestätigt wird oder nicht. Bei Zweistichprobentests unterscheidet man zwischen verbundenen/gepaarten und unverbundenen/ungepaarten Stichproben.

Gepaarte Stichproben liegen vor, wenn es zu jedem Wert aus der einen Stichprobe genau einen Wert der anderen Probe gibt, mit dem er inhaltlich ein Paar bildet. Bei ungepaarten Stichproben sind sowohl die Daten innerhalb einer Stichprobe als auch die Daten aus zwei Stichproben unabhängig voneinander.

Dementsprechend wurden bei Überkreuz-Protokollen für den Vergleich zwischen Verum und Kontrolle der t-Test nach Student für gepaarte Daten und bei Langzeituntersuchungen der t-Test für ungepaarte Daten verwendet. Ein Unterschied wurde als statistisch signifikant bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 0,05 betrug ($p < 0,05$). Die statistischen Methoden wurden aus Sachs (1984) entnommen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Sensibilitätsuntersuchungen

4.1.1. Zeitverlauf einer einzigen Bronchokonstriktion nach Ovalbumin- und Histamin-Exposition (Sensibilisierungsmethoden 1 oder 2)

4.1.1.1 Ovalbuminexposition

4.1.1.1.1 Nach inhalativer Ovalbuminprovokation (0,2% - 5 und 15 sec) – Sensibilisierungsmethode 1

CA-Wert steigt ab der 2. Minute über 0,1 ml und zwischen der 2.- 4. Minute nach der ersten Ovalbuminprovokation (5 sec) wird der CA-Maximalwert (1,5-2,5 ml) erreicht. Danach fällt der CA-Wert kontinuierlich ab und nach 8 Minuten ist er wieder nahe der Ausgangswerte. Dieser Prozess wiederholt sich nach der zweiten sich anschließenden Provokation (15 sec) auf die gleiche Art und Weise; nur mit dem Unterschied, dass der Maximalwert um die Hälfte höher liegt als bei der ersten Reaktion. Insgesamt fällt die 2. Reaktion stärker als die 1. Reaktion aus. Die einzelnen Tiere, die bereits nach der 1. Provokation sehr stark reagieren, zeigen keine stärkere 2. Reaktion mehr (s. Abb. 5).

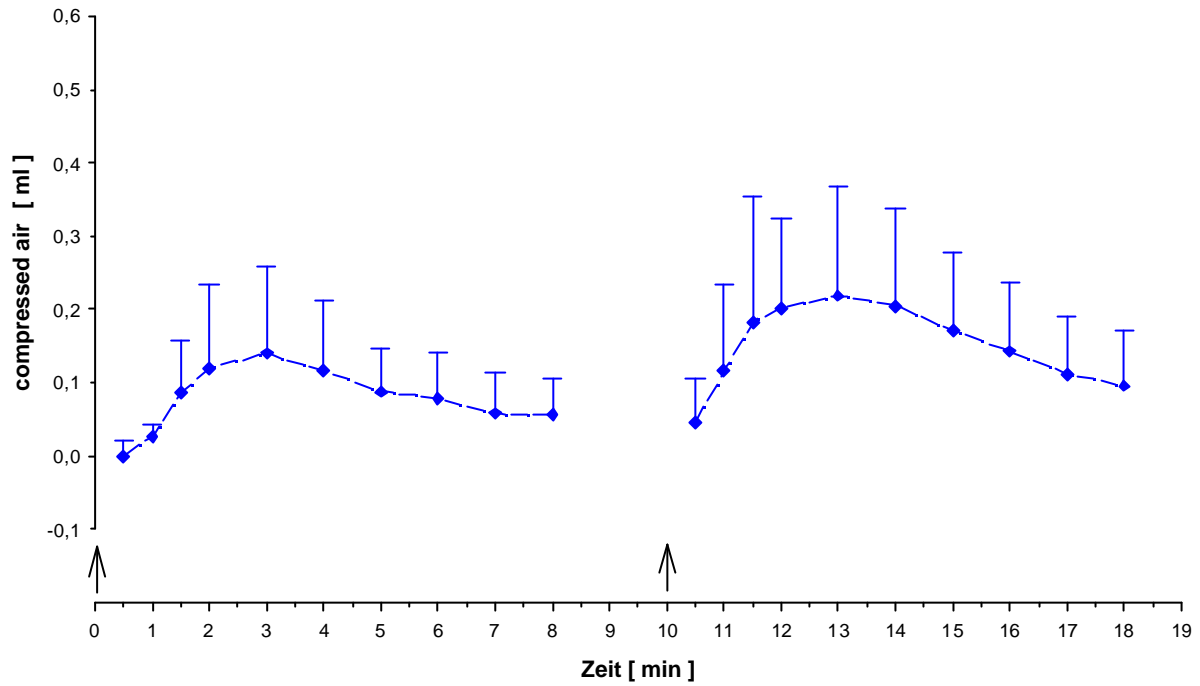


Abb. 5: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedruckt in CA) nach inhalativer Provokation mit Ovalbumin (als spezifisches Allergen); die Tiere sind systemisch (i.m. und i.p.) mit 200 mg Ovalbumin (ohne Adsorbentien) sensibilisiert; n = 16 , ($\bar{x} \pm SD$)

4.1.1.1.2. Nach inhalativer Ovalbuminexposition (0,2% - 5 und 15 sec) – Sensibilisierungsmethode 2

Der Zeitverlauf der allergischen Reaktion nach der 1. und 2. Ovalbuminexposition (als spezifisches Antigen) ist genau der gleiche wie bei den Tieren, die mit der Methode 1 sensibilisiert worden sind. Der auffallende Unterschied besteht in einer deutlich stärkeren bronchokonstriktorischen Reaktion dieser Gruppe (s. Abb. 6).

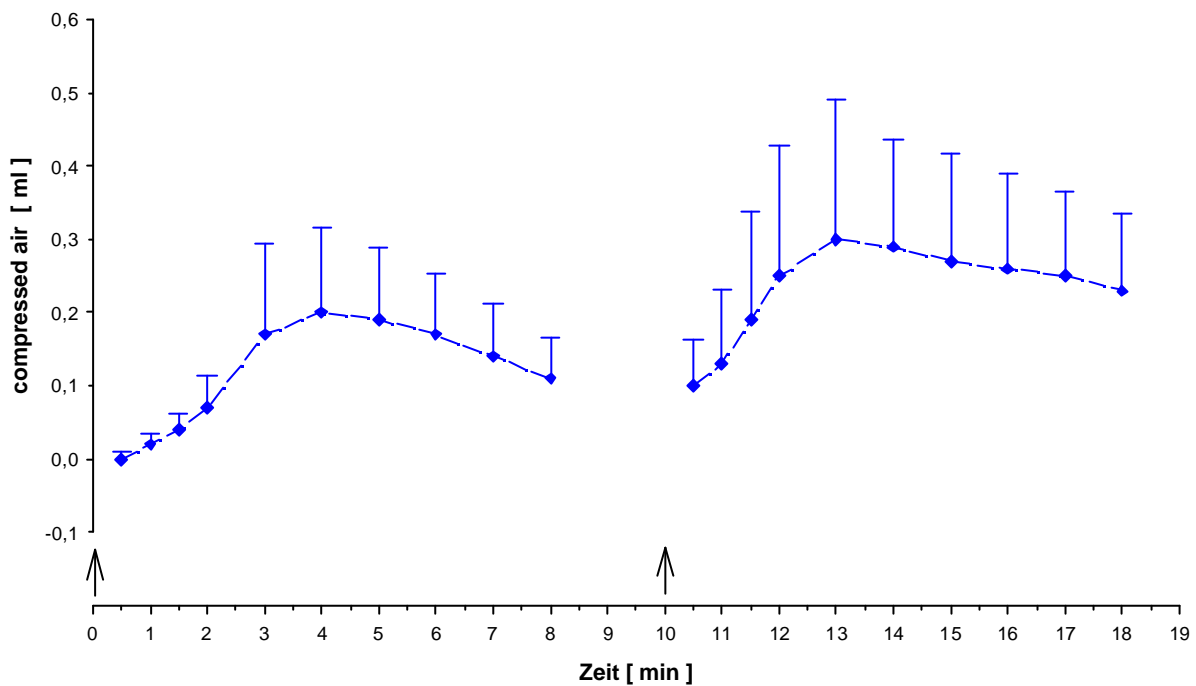


Abb.6: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedruckt in CA) nach inhalativer Provokation mit Ovalbumin (als spezifisches Allergen); die Tiere sind systemisch (i.m. und i.p.) mit 10 µg Ovalbumin und 100 mg Aluminiumhydroxid sensibilisiert; n=20, ($\bar{x} \pm SD$)

4.1.1.2. Histaminexposition

4.1.1.2.1. Nach inhalativer Histaminprovokation (0,1% - 30 sec) – Sensibilisierungsmethode 1

Die Reaktion von Ovalbumin-sensibilisierten Tieren nach Provokation mit 0,1%igem Histamin für 30 Sekunden fällt stärker aus, als bei den anderen Gruppen, die oben besprochen wurden. Der Maximalwert von 0,74 ml sinkt aber auch schneller wieder ab. Im Vergleich zu ovalbuminexponierten Tieren zeigen die Tiere nach der Provokation mit Histamin geringere individuelle Unterschiede (s. Abb. 7).

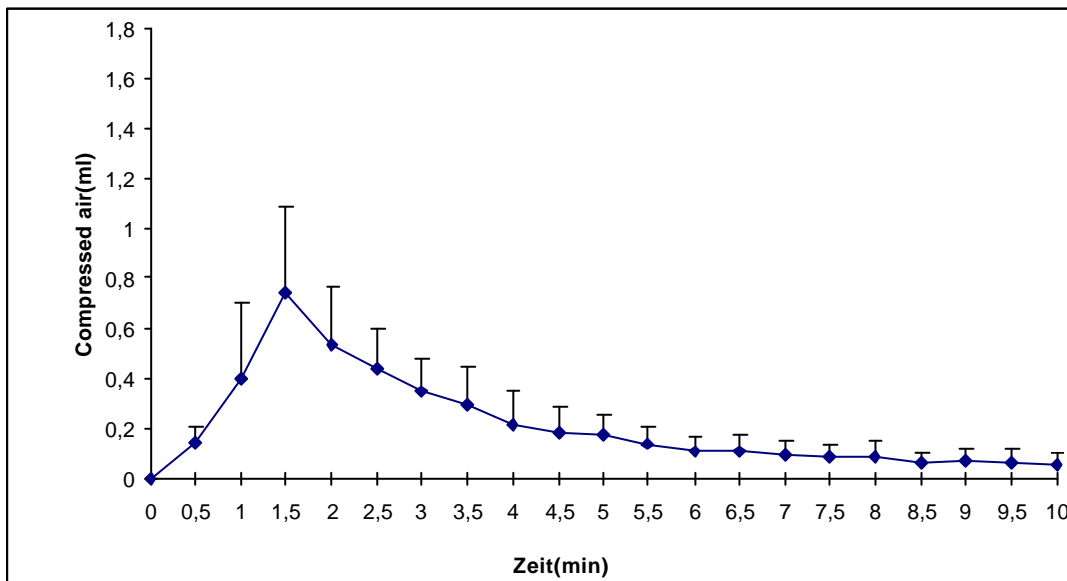


Abb. 7: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach inhalativer Provokation mit 0,1%-iger Histaminlösung (1x30 sec in Min 0); die Tiere sind systemisch (i.m. und i.p.) mit 200 mg Ovalbumin sensibilisiert; n=7, ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

4.1.1.2.2. Histaminprovokation (0,1% - 50 sec) – Sensibilisierungsmethode 1

Die Tiere weisen hier eine schwächere Reaktion auf als bei der Provokation mit 0,1%igem Histamin für 30 Sekunden (s. Abb. 8).

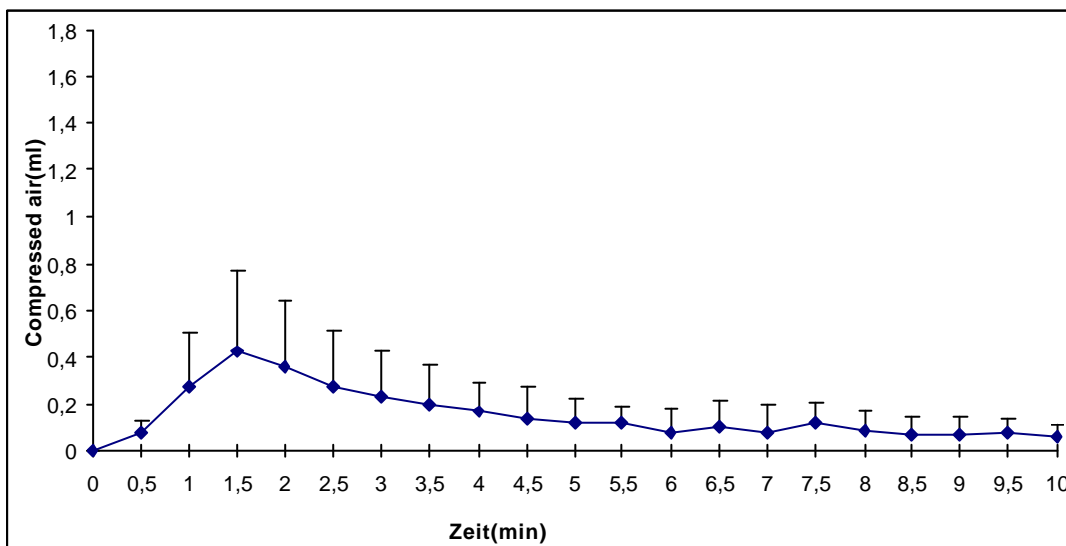


Abb. 8: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach inhalativer Provokation mit 0,1%-iger Histaminlösung (1x50 sec in Minute 0); die Tiere sind systemisch (i.m. und i.p.) mit 200 mg Ovalbumin sensibilisiert; n=5, ($\bar{x} \pm \text{SD}$)

4.1.1.2.3. Histaminprovokation (0,3% - 30 sec) – Sensibilisierungsmethode 1

Die Bronchokonstriktion der Tiere nach Exposition mit einer höheren Histaminkonzentration ist am stärksten, obwohl die Provokationszeit gleich oder kürzer war (vgl. Abb. 13 und) (s. Abb. 9).

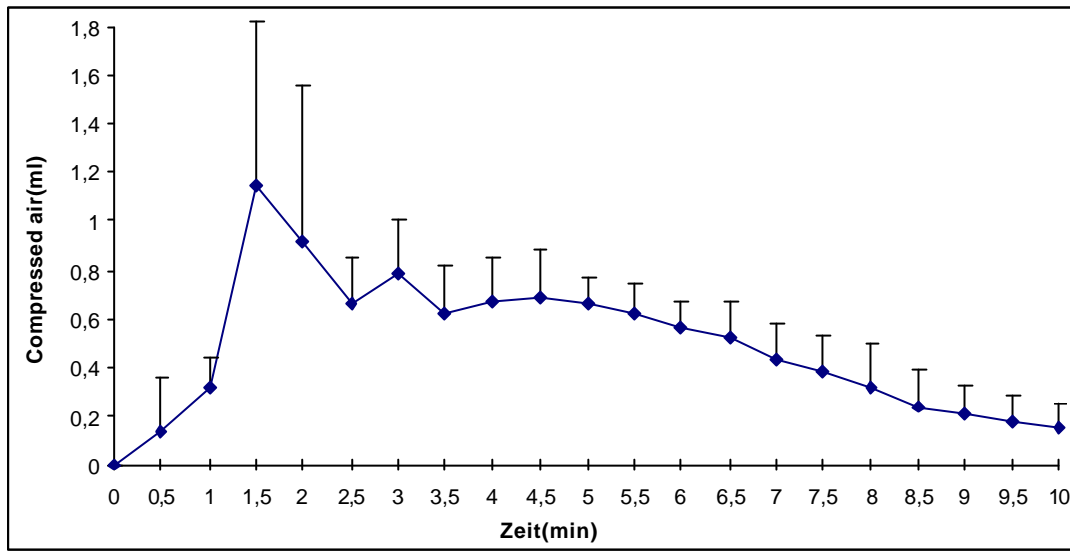


Abb. 9: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach inhalativer Provokation mit 0,3%-iger Histaminlösung (1x30 sec in Min 0); die Tiere sind mit Methode 1 sensibilisiert; n=7 , ($\bar{x} \pm SD$)

4.1.2. Optimale Zeit für die erste Allergen-Exposition, Resensibilisierung - und Tachyphylaxieeffekt nach wöchentlichem Provokationstest - Sensibilisierung mit 10 μ g Ovalbumin plus 100 mg Aluminiumhydroxid (Methode 2)

Um die stärkste allergische Reaktion nach der Sensibilisierungsmethode 2 beim 1. Ovalbuminexpositionstest zu beobachten, wurden bei 4 Tiergruppen jeweils in der 2., 3., 4. oder 5. Woche nach der Sensibilisierung erste Ovalbuminprovokationstests durchgeführt. Die stärkste

obstruktive Reaktion wird bei der Gruppe 3 beobachtet, wo die 1. OA-Exposition erst 4 Wochen nach der Sensibilisierung stattfand.

Der Vergleich zwischen Gruppe 1, die ab der 2. Woche nach der Sensibilisierung 1x wöchentlich mit inhalativem Ovalbumin exponiert wurde, mit der Reaktion der drei weiteren Gruppen zeigt bei wöchentlicher Wiederbelastung mit Ovalbumin keine Resensibilisierung oder Reaktionsverstärkung aber auch keinen Tachyphylaxieeffekt (s. Tab. 1 und Abb. 10).

	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 35
Gruppe: 1 (R)	1,91±0,64	2,62±1,52	2,89±1,02	2,91±1,72
Gruppe: 2 (B)	Nicht provoziert	1,70±0,92	3,49±1,87	3,88±2,10
Gruppe: 3 (G)	Nicht provoziert	nicht provoziert	4,30±0,69	4,92±1,15
Gruppe: 4 (S)	Nicht provoziert	nicht provoziert	nicht provoziert	3,93±1,06

Tab. 1: Vergleich der Reaktionsstärke bei 1. und wiederholtem Provokationstest nach 1 bis 4 Wochen nach der Sensibilisierung (AUC(MW)±SD).

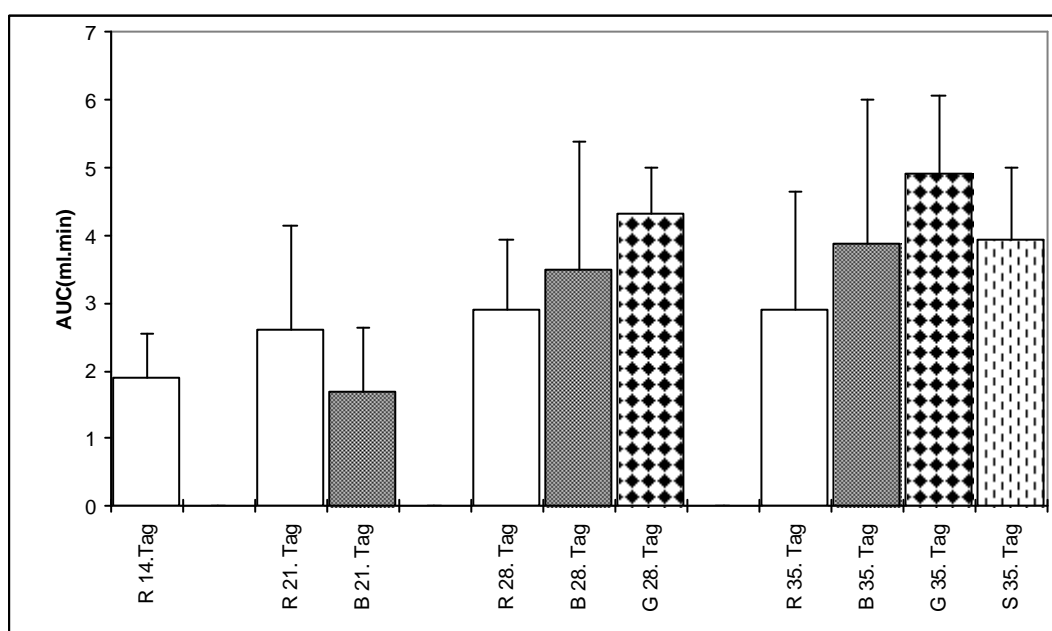


Abb. 10: Sensibilitätsverlauf nach Sensibilisierungsmethode 2; Tiere in 4 Gruppen (R,B,G,S) eingeteilt; OA-Provokationstest bei Gr. R (weiße Säulen): 14. u. 21. u. 28. u. 35. Tag; Gr. B (schwarze Säulen): 21. u. 28. u. 35. Tag; Gr. G (Säulen mit schwarzen Punkten): 28. u. 35. Tag und Gr. S (graue Säulen) 35. Tag nach der Sensibilisierung; nR=nB=nG=nS=6, (AUC(MW) ± SD)

4.1.3. Saisonabhängigkeit der Sensibilisierung mit 10 µg Ovalbumin und 100 mg Aluminiumhydroxid (Methode 2)

Ein saisonabhängiger Vergleich der Reaktionsvermögen der Tiere, die mit der Methode 2 sensibilisiert sind, wird hier untersucht. Die Tiere sind in 4 Gruppen eingeteilt. Sie wurden in folgenden Zeiten untersucht: 1. Gruppe in den Monaten Mai, Juni, Juli, die 2. Gruppe im August/September, die 3. Gruppe im Oktober/November und die 4. Gruppe im Dezember/Januar. Alle Gruppen wurden 14, 21, 28 und 35 Tage nach der Sensibilisierung mit 0,2%igem OA inhalativ exponiert (s. Tab. 2, Abb. 11).

Es wird zwar nach 14 Tagen eine unterschiedliche Reaktionsstärke zwischen den verschiedenen Gruppen beobachtet, aber wenn man die Tests nach 21, 28 und 35 Tage mitberücksichtigt, werden im allgemeinen keine saisonabhängigen Unterschiede beobachtet.

	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 35
Monate 5, 6, 7	2,01±1,27	2,83±1,31	3,20±1,43	3,59±1,61
Monate 8, 9	1,55±1,10	3,09±1,12	2,91±1,45	2,58±1,51
Monate 10, 11	3,02±0,80	3,46±1,10	2,80±1,44	1,90±0,46
Monate 12, 1	1,91±0,64	2,62±1,53	2,90±1,03	2,91±1,73

Tab. 2: Saisonabhängigkeit der Reaktionsvermögen nach der Sensibilisierungsmethode 2, Provokationstest in verschiedenen Jahreszeiten (AUC(MW)±SD)

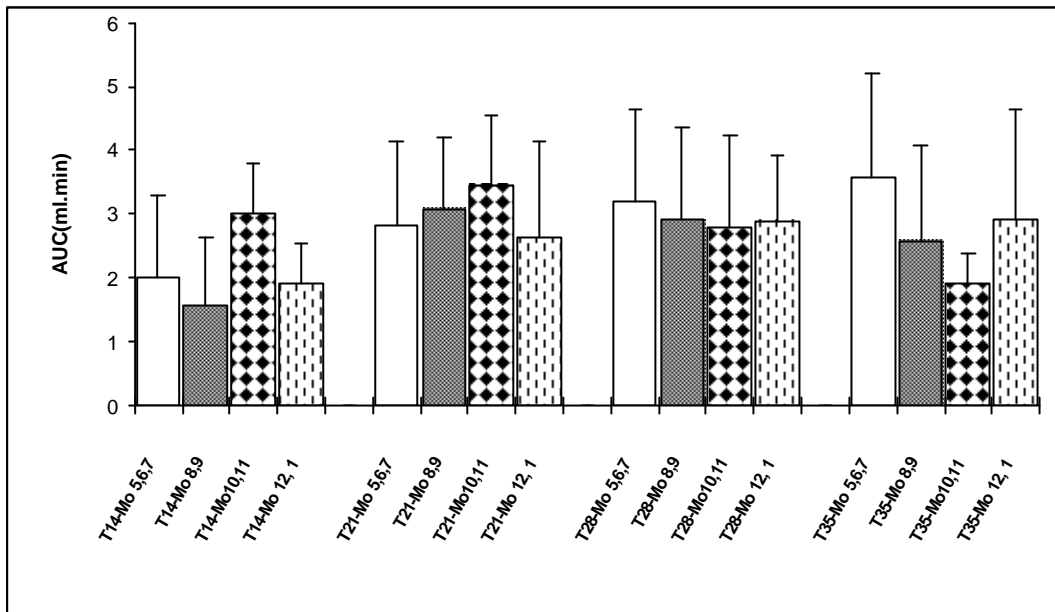


Abb. 11: Saisonabhängiger Vergleich der Reaktionsvermögen; Tiere in 4 Gruppen eingeteilt. 1. Gruppe (weiße Säulen): Monate Mai, Juni, Juli (Mo 5,6,7); 2. Gruppe (schwarze Säulen): August/September (Mo 8,9); 3. Gruppe (Säulen mit schwarzen Punkten): Oktober/November (Mo 10,11); 4. Gruppe (graue Säulen): Dezember/Januar (Mo 12,1); alle Tiere systemisch (i.p.) mit 10 µg OA + 100 mg Al(OH)₃ sensibilisiert; OA-Provokationstest 14 u. 21 u. 28 u. 35 Tage nach der Sensibilisierung; n(Gr1)=18-15, n(Gr2)=7, n(Gr3)=14-10, n(Gr4)=6 (AUC(MW) ±SD)

4.1.4. Saisonabhängigkeit der Sensibilisierung mit 200 mg Ovalbumin (Methode 1)

Das saisonabhängige Reaktionsvermögen der Tiere, die mit 200 mg Ovalbumin sensibilisiert sind, wird verglichen. Die Sensibilisierung und der Ovalbuminprovokationstest 14 Tage da nach fanden in den Monaten Februar, März, Juni, Juli und Oktober statt. Dabei stellte sich heraus, dass die Jahreszeit des Versuches auch nach der Sensibilisierungsmethode 1 keinen Einfluss auf die

Reaktionsstärke der Meerschweinchen nach Ovalbuminexposition hat (s. Tab. 3 u. Abb. 12).

	Monat 2	Monat 3	Monat 6	Monat 7	Monat 10
Tag 14	1,55±0,81	1,78±0,91	1,90±0,84	1,79±1,24	2,22±1,27

Tab. 3: Saisonabhängigkeit der Reaktionsstärke nach Sensibilisierung mit 200 mg OA, Provokationstest zu verschiedenen Jahreszeiten (AUC(MW)±SD)

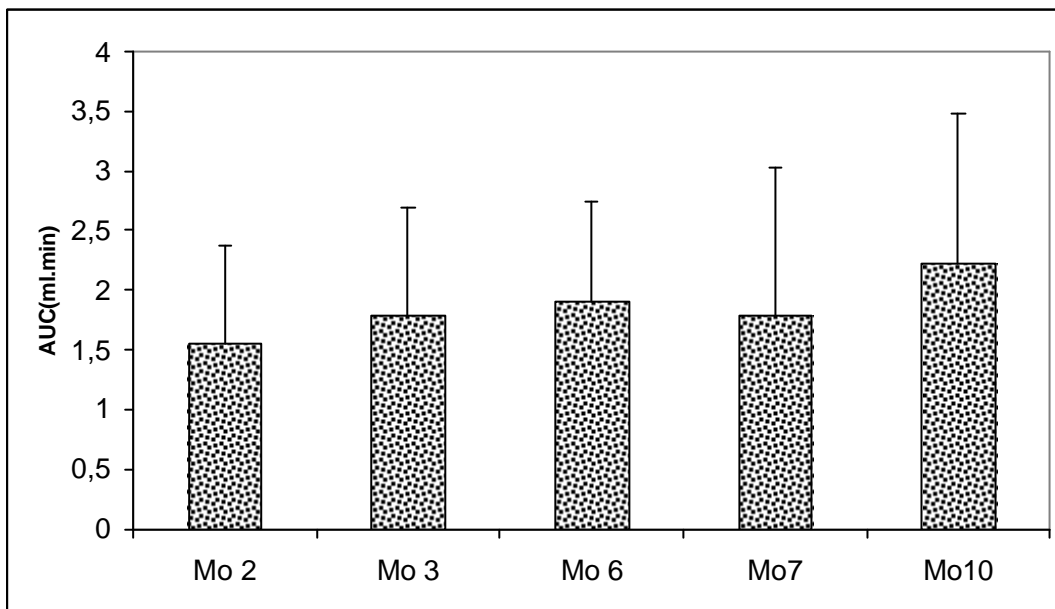


Abb. 12: Saisonabhängiger Sensibilitätsvergleich; Tiere in 5 Gruppen eingeteilt. 1. Gruppe Monat Februar(2); 2. Gruppe Monat März(3); 3. Gruppe Monat Juni(6); 4. Gruppe Monat Juli(7); 5. Gruppe Monat Oktober(10) untersucht; Alle Tiere systemisch (i.m. und i.p.) mit 200 mg OA sensibilisiert; OA-Provokationstest 14 Tage nach der Sensibilisierung; n(Gr1)=15, n(Gr2)=9, N(Gr3)=15, n(Gr4)=15, n(Gr5)=10 (AUC(MW)±SD)

4.1.5. Der Verlauf der Bronchokonstriktion nach systemischer (i.p.) Sensibilisierung mit 10 µg Ovalbumin und 100 mg Aluminiumhydroxid (Methode 2)

Die Tiere wurden 2 bis 11 Wochen nach der Sensibilisierung wöchentlich 1x einem Ovalbumin-Expositionstest mit 0,2%iger Ovalbuminlösung unterzogen. Die Abb. 13 zeigt, dass bei Meerschweinchen ein deutlicher Anstieg der Reaktionsstärke bis 3 Wochen nach Sensibilisierung zu sehen ist. Die Woche darauf, d.h. nach 4 Wochen, reagieren die Tiere mit einer sehr leichten Abnahme der Bronchokonstriktion. Nach 5 Wochen ist die Empfindlichkeit deutlich abgesunken und nach 6 Wochen ist wieder ein ausgeprägter Anstieg der obstruktiven Reaktion zu beobachten. Dieser Zyklus wiederholt sich noch zweimal. Alles in allem sind ein ausgeprägter Anstieg des Reaktionsvermögens nach 3, 6 und 9 Wochen und ein deutlicher Abfall der Reaktionsstärke nach 5, 8 und 11 Wochen zu sehen. Insgesamt bleibt die Sensibilität aber über die gesamten 11 Wochen mit CA-Mittelwerten größer als 0,1 ml erhalten (s. Tab. 4 und Abb. 13).

	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 35	Tag 42	Tag 49	Tag 56	Tag 63	Tag 70	Tag 77
AUC	2,29	3,10	3,01	2,20	4,25	3,72	2,97	3,57	3,25	2,51
(MW)	±1,21	±1,20	±1,40	±1,55	±1,70	±1,73	±2,01	±2,08	±2,16	±2,04

Tab. 4: Der Verlauf der Bronchokonstriktion als CA-Mittelwerte nach der Sensibilisierungsmethode 2, n=39 bis 18, (AUC(MW)±SD)

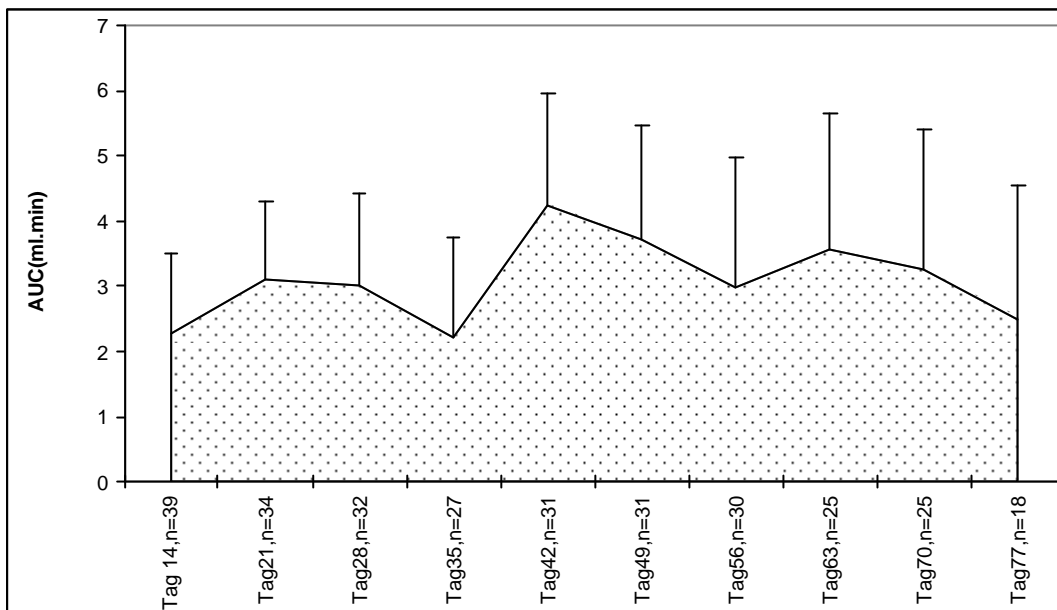


Abb. 13: Sensibilitätsverlauf nach systemischer (i.p.) Sensibilisierung mit 10 µg Ovalbumin plus 100 mg Aluminiumhydroxid, suspendiert in 0,5 ml isotonischer Kochsalzlösung; (AUC(MW) ± SD)

4.1.6. Empfindlichkeitsverlauf nach systemischer (i.m. und i.p.) Sensibilisierung mit 200 mg Ovalbumin (Methode 1)

Die Tiere wurden 2 bis 6 Wochen nach der Sensibilisierung wöchentlich 1x mit Vernebelung einer 0,2%igen Ovalbuminlösung in der Atemluft provoziert. In Abb. 14 ist ein deutlicher Anstieg der Reaktionsstärke nach 3 Wochen zu sehen. Nach 4 Wochen sieht man aber einen noch deutlicheren Abfall der bronchokonstriktiven Reaktion. Nach 5 Wochen und mehr sinkt die Reaktionsstärke kontinuierlich ab (s. Tab. 5 und Abb. 14).

	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 35	Tag 42
AUC(MW)	1,74±0,88	2,30±0,71	1,56±0,71	1,40±1,01	1,10±0,79

Tab. 5: Der Verlauf der Bronchokonstriktion in AUC-Mittelwerte nach systemischer Sensibilisierung (i.m. und i.p.) mit 200 mg Ovalbumin, n=8, (AUC(MW)±SD)

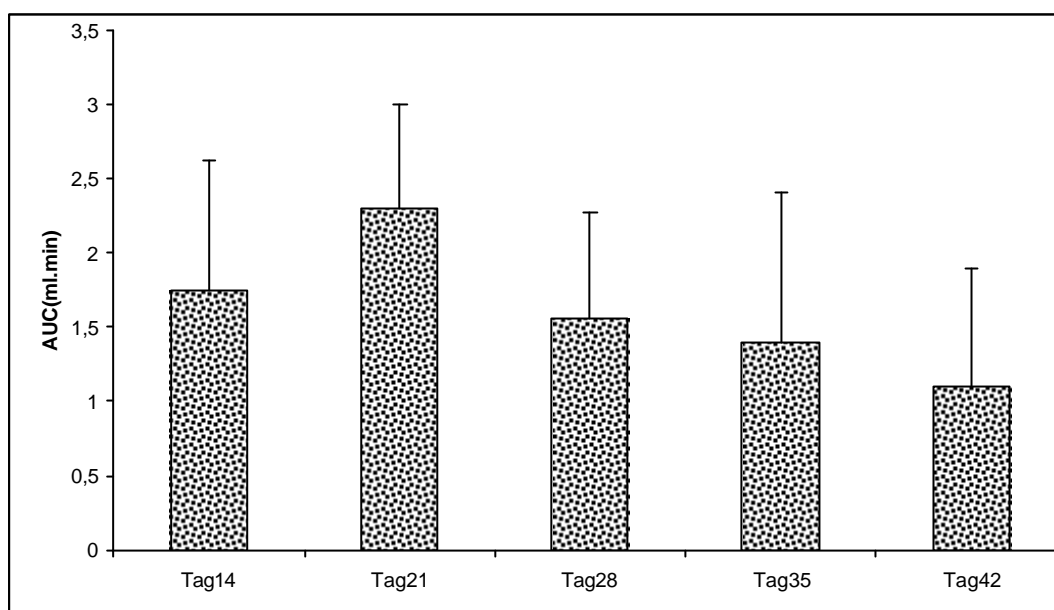


Abb. 14: Sensibilitätsverlauf nach systemischer (i.m. und i.p.) Sensibilisierung mit 200 mg Ovalbumin; n=8, Ovalbuminprovokation (0,2%); n=8; (AUC(MW) \pm SD)

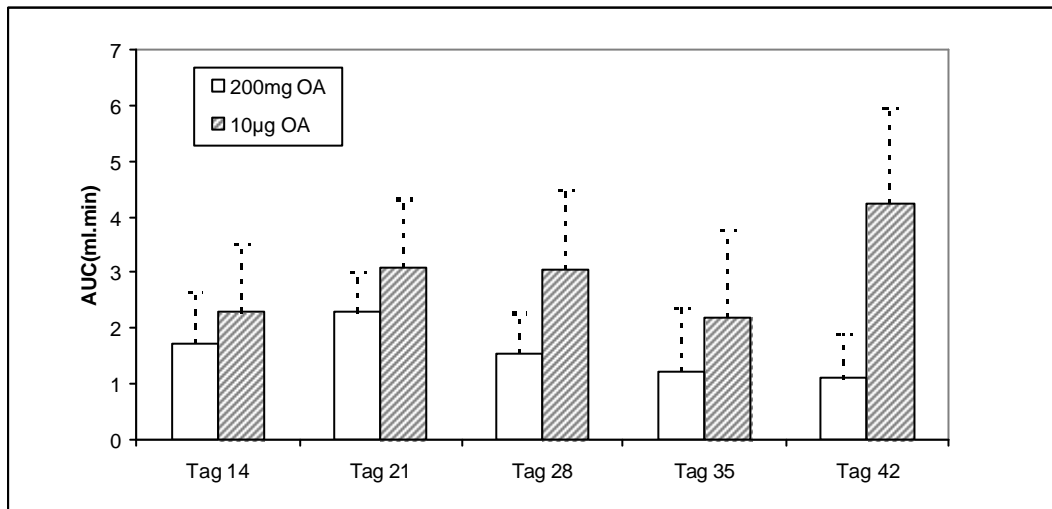
4.1.7. Vergleich der Bronchokonstriktion nach
a: systemischer (i.m. und i.p.) Sensibilisierung mit 200 mg Ovalbumin
(Methode 1)
b: systemischer (i.p.) Sensibilisierung mit 10 μ g Ovalbumin und 100 mg
Aluminiumhydroxid (Methode 2)

Wenn die wöchentlich gemessenen Bronchokonstriktionen nach den beiden verschiedenen Sensibilisierungsmethoden (Kapitel 4.1.5 und 4.1.6) miteinander verglichen werden, sieht man eine deutlich überlegene, stärkere allergische Reaktion nach der Sensibilisierungsmethode 2. Eine mit 23,9% nicht signifikant stärkere Reaktion 2 Wochen nach der Sensibilisierung, bis 49% nach 4 Wochen und 74% nach 6 Wochen signifikant stärkere asthmatische Reaktion ist durch die Sensibilisierungsmethode 2 im Vergleich zur Sensibilisierungsmethode 1 entstanden. Alle prozentualen Unterschiede der Reaktionen und ihre statistische Signifikanz für die jeweilige Messzeit sind in Abbildung 14 angegeben. Es wurde der Mittelwert der AUC von der Tiergruppe

„sensibilisiert nach Methode 2“ gleich 100% und von der anderen Tiergruppe gleich x% gesetzt. Die prozentuale Differenz ergibt sich durch Subtraktion des x%-Wertes vom 100%-Wert.

Sensibilisierung mit:	Tag 14	Tag 21	Tag 28	Tag 35	Tag 42
10 µg OA + Al(OH) ₃	2,29±1,21	3,1±1,2	3,05±1,4	2,2±1,55	4,25±1,69
200 mg OA	1,74±0,88	2,3±0,71	1,56±0,71	1,23±1,12	1,1±0,79

Tab. 6: Unterschiedliche Reaktionsstärke nach der Sensibilisierung mit 10 µg OA oder 200 mg OA (AUC(MW) ± SD) [Diese Daten sind aus der Tabellen 4 und 5]



Tag	14	21	28	35	42
Signif.-Niveau p<0,05	n. signif	signifikant	signifikant	n. signif	signifikant
Differenz (%)	23,9	25,9	49,0	44,1	74,0

Abb. 15: Vergleich des Sensibilitätsverlaufes nach a: Sensibilisierungsmethode 1 und b: Sensibilisierungsmethode 2 ; OA-Provokation (0,2%); (na=8, nb=27 bis 39); (AUC(MW)±SD)

4.1.8. Diskussion über Sensibilitätsuntersuchungen

I- Zeitverlauf der Bronchokonstriktion nach OA- und HI-Exposition

Der Zeitverlauf der allergischen Sofortreaktion nach Inhalation spezifischer Provokationssubstanzen wie Ovalbumin und die Erfassung bronchialer Hyperreagibilität nach Exposition mit unspezifischen Provokationsmitteln, wie Histamin oder ein Acetylcholin-Derivat, kann zur Klärung grundlegender Mechanismen dienen. Die Reaktion auf Ovalbumin führt durch Entleerung der Histaminspeicher zu einer von der individuellen Sensibilisierung der Tiere abhängigen allergischen Reaktion. Dies erklärt die größere individuelle Streubreite nach Ovalbuminexposition im Vergleich zur Provokation mit Histamin, die unter Umgehung der endogenen Histaminspeicher zur direkten, dosisabhängigen Stimulation der Histaminrezeptoren führt (Haen et al 1999).

-Ovalbuminprovokation (*Sensibilisierungsmethode 1 und 2*)

Bei der OA-Exposition 14 Tage nach der Sensibilisierung mit Aluminiumhydroxid als Adsorbens und niedriger Dosis Ovalbumin (*10 µg OA und 100 mg Aluminiumhydroxid - Methode 2*), wo laut Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen außer IgG noch IgE bei Meerschweinchen induziert wird (Andersson 1980a), ist **ein höherer Maximalwert für CA (0,3 ml) erreicht als bei der Sensibilisierungsmethode 1** d.h. ohne Adsorbens und mit 200 mg Ovalbumin (Maximalwert für CA=0,22 ml), wo nur IgG bei Meerschweinchen induziert wird (Andersson 1980a). **Insgesamt fällt die asthmatische bronchokonstruktionsreaktion auch bei Sensibilisierungsmethode 2 stärker aus** (siehe 4.1.1.1.1 und 4.1.1.1.2). **Eine stärker induzierte asthmatische Reaktion ist besser für Allergie- und Asthmauntersuchungen im Meerschweinchenmodell, da hier der Unterschied zwischen Kontroll- und Verumgruppe besser zu beobachten ist.** So erscheint auf den ersten Blick die *Sensibilisierungsmethode 2* als **besser geeignet, da hier außer Induktion einer starken asthmatischen Reaktion zusätzlich zu IgG noch IgE-Antikörper induziert werden**. Der IgE-Antikörper besitzt bei humaner allergischer Reaktion die bestimmende Funktion. Die Dauer der sensiblen Phase ist bei

Langzeituntersuchungen sehr bedeutsam. Das wurde in anderen Versuchen in dieser Arbeit untersucht und wird an anderer Stelle besprochen (siehe 4.1.8. IV).

-Histaminprovokation (*Sensibilisierungsmethode I*)

Die Erfassung bronchialer Hyperreagibilität durch Histaminprovokation (unspezifische Provokation) ist in der Humanmedizin ein weiterer diagnostischer Schritt (Kroegel 1997a). **Bei der Histaminexposition (0,1% - 30 sec) erscheint die maximale Bronchokonstriktion schneller (in der 1,5. - 2. Minute nach der Provokation) als bei OA-Exposition (in der 2. - 4. Minute)**, klingt aber auch schneller wieder ab (siehe 4.1.1.2.1.). Das ist übereinstimmend mit dem vorher erwähnten **Wirkmechanismus** von Ovalbumin- und Histaminexposition, da Histamin **direkt an Histaminrezeptoren** zur Wirkung kommt während durch Allergen (OA)-Belastung **erst endogenes Histamin freigesetzt** werden muss.

Bei Histaminprovokation zeigt der Vergleich zwischen verschiedenen Histaminkonzentrationen und Vernebelungszeiten, dass eine längere Vernebelungszeit (50sec) nicht stärker provozierend wirkt, da dieses beigemischte Histamin in der Atemluft dem Tier nicht lange zur Verfügung bleibt. Bei Vernebelung **einer höheren Konzentration von Histamin (0,3%)** in kurzer Zeit kann das Tier aber in weniger Zeit mehr Histamin einatmen und dementsprechend **stärker reagieren** (siehe 4.1.1.2.1. bis 4.1.1.2.3.).

II- Optimale Zeit für Allergen-Exposition, Resensibilisierung - und Allergentachyphylaxieeffekt (Sensibilisierungsmethoden 1 und 2)

A- Optimale Zeit für Allergen-Exposition:

Bei der *Sensibilisierungsmethode 2* ist die **stärkste allergische Reaktion** beim Provokationstest **erst 4 Wochen nach der Sensibilisierung** zu sehen (siehe 4.1.2). So sollte man bei der Sensibilisierung mit 10 µg OA in 100 mg Aluminiumhydroxid am Meerschweinchen den ersten Provokationstest erst 4 Wochen nach der Sensibilisierung durchführen, damit man eine größtmögliche asthmatische Reaktion beobachten kann, und somit der Reaktionsunterschied zwischen Kontroll- und Verumgruppe besser zu sehen ist. Dies sollte bei Cross-Over- und anderen **Kurzzeituntersuchungen** berücksichtigt werden. Bei der Langzeituntersuchung wird

trotzdem 2 Wochen nach der Sensibilisierung mit dem ersten Provokationstest angefangen, da später die größeren Tiere eine größere Individualität zeigen und nach mehreren Wochen Untersuchungsdauer alle Tiere schwach reagieren. Bei einer schwachen Reaktion ist der Unterschied zwischen Kontroll- und Verumgruppe sehr schlecht zu beobachten. Übrigens werden bei Langzeituntersuchungen die ganz großen Tiere irgendwann nicht mehr in den Plethysmographen reinpassen. Wirtschaftlich gesehen ist es natürlich günstiger, mehrere Untersuchungen mit einer Tiercharge durchführen zu können. Aus dieser Sicht sollten die Tiere so früh wie möglich in Untersuchungen eingesetzt werden. Ein vorzeitiges Abwägen der verschiedenen Faktoren in unterschiedlichen Situationen ist daher zu empfehlen.

B – Resensibilisierungseffekt:

Im Versuch 4.1.2 bei der *Sensibilisierungsmethode 2* wird der Resensibilisierungseffekt oder die Reaktionsverstärkung bei wiederholter OA-Provokation untersucht. Hier wird die allergische Reaktion von einer Tiergruppe (erste Gruppe), die ab der 2. Woche nach der Sensibilisierung 1x wöchentlich mit inhalativem OA exponiert wird, mit der Reaktion dreier weiterer Gruppen verglichen, die zum ersten mal ab der 3., 4. und 5. Woche und bis zur 5. Woche nach der Sensibilisierung 1x wöchentlich mit OA provoziert werden. Die erste Gruppe zeigt in der 3., 4. und 5. Woche, d.h. bei Wiederbelastung mit OA, zwar eine immer stärkere Reaktion aber immer noch schwächer als die anderen Gruppen, die erst ab der 3., 4. und 5. Woche mit OA exponiert werden. Es scheint also **keinen Resensibilisierungseffekt oder keine Verstärkung des Reaktionsvermögens bei wöchentlich wiederholter OA-Provokation** zu geben, wenn die Tiere mit 10 µg OA in 100 mg Aluminiumhydroxid sensibilisiert werden.

Nach Sensibilisierung mit der *Methode 1* d. h. systemischer (i.m. und i.p.) Sensibilisierung mit 200 mg Ovalbumin ohne Adsorbens (siehe 4.1.6) zeigen die Tiere eine ständige Abnahme der Reaktionsstärke, trotz wöchentlicher inhalativer OA-Exposition. Hier ist also **auch keine Resensibilisierung** oder Reaktionsverstärkung zu sehen.

Der Resensibilisierungseffekt oder die Reaktionsverstärkung scheint **allergendosisabhängig** zu sein. Die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben ergeben, dass bei Sensibilisierung mit 10 µg Ovalbumin und Adsorbens eine „booster“ Injektion von Ovalbumin keine signifikante Reaktionsverstärkung hervorgerufen hat. Bei Sensibilisierung mit 0,5 µg Ovalbumin plus Adsorbens ist die Situation anders. Hier haben die Untersuchungen zuerst keine Bronchokonstriktion gezeigt; aber nach einer Booster-Injektion von 0,5 µg Ovalbumin war eine

Steigerung der allergischen Reaktion eine Woche später nach intravenöser Provokation zu sehen (Andersson 1981).

Die inhalative Wiederbelastung mit einem Allergen, z.B. OA, ist für Langzeituntersuchungen bei jedem Allergenexpositionstest im Plethysmographen unvermeidbar. Die Frage ist, welche Rolle die wiederholte Allergenbelastung bei der Entwicklung der allergischen Reaktion spielt. Unsere Versuche haben gezeigt, dass bei der Sensibilisierung mit 10 µg OA in 100 mg Aluminiumhydroxid (Methode 2) und bei der Sensibilisierung mit 200 mg Ovalbumin (Methode 1) die **experimentbedingte wöchentliche inhalative Wiederbelastung mit OA auf die Reaktionsstärke der Tiere keinen großen Einfluss hat und keine Resensibilisierung hervorruft.**

C – Allergentachyphylaxieeffekt:

Wenn die wiederholte Allergenexposition in kürzeren Zeitabständen stattfindet, um eine allergische asthmatische Reaktion zu beobachten, sah man in folgenden in vitro- und in vivo-Untersuchungen das Phänomen der Allergentachyphylaxie. Allergentachyphylaxie heißt Reduktion und/oder Ausbleiben der allergischen Reaktion nach kurz aufeinander folgenden Allergenbelastungen. Dieser Selbstschutzmechanismus wird dadurch erklärt, dass das gesamte endogene Histamin nach mehrmaliger Allergenexposition ausgeschüttet ist, und kein Histamin mehr zur Vermittlung der weiteren allergischen Sofortreaktion zur Verfügung steht.

In vitro wurde an der isolierten Trachealmuskulatur verschiedener Labortiere Allergentachyphylaxie beobachtet (Andersson et al 1979, Harris et al 1980, Ono et al 1979, Orehek et al 1979). OA-sensibilisierte Meerschweinchen zeigten bei in vivo-Untersuchungen im Ganzkörperplethysmographen unter wiederholter OA-Provokation zum Zeitpunkt 0, 10, 20, 60 und 70 Minuten einen Tachyphylaxieeffekt, so dass die Inhalation zum Zeitpunkt 60 und 70 Minuten kaum noch asthmatische Reaktionen hervorrief. Dies ist ein aktiver Selbstschutzmechanismus, der durch Prostaglandine der E-Gruppe vermittelt wird (Dorsch et al 1983, Dorsch und Frey 1981). Wenn alle zwei Tage ein Ovalbuminprovokationstest und insgesamt sieben Tests an Meerschweinchen durchgeführt wurde, sah man ab dem vierten OA-Expositionstest eine Reduktion der obstruktiven Reaktion und Allergentachyphylaxieeffekt (Riedel et al 1988).

Der Versuch 4.1.2 zeigt bei *Sensibilisierungsmethode 2* außerdem, dass **wöchentlich wiederholte OA-Exposition keinen Tachyphylaxieeffekt** hervorruft, da hier keine ausbleibende

obstruktive Reaktion bei Wiederbelastung mit OA beobachtet wird. **Bei Cross-Over-Untersuchungen** in dieser Arbeit wurden die Tiere **alle 3 bis 4 Tage wieder mit OA exponiert**. Hier haben wir auch **keinen Tachyphylaxieeffekt** beobachtet.

Zusammengefasst ist eine Pause von 3 bis 7 Tagen Zeit genug bis zur nächsten Wiederbelastung, damit dieser Selbstschutzmechanismus wieder ausfällt. Der Allergentachyphylaxieeffekt kommt bei kurz aufeinander folgender OA-Exposition vor, jedoch erst bei der 4. oder 5. Allergenbelastung und nicht gleich beim 2. oder 3. Test.

Bei Allergenbelastung in zeitlich geringen Abständen wird das **gesamte endogene Histamin ausgeschüttet** und bei der letzten Allergenbelastung gibt es **kein gespeichertes Histamin mehr, um eine allergische Sofortreaktion zu vermitteln**, was den Tachyphylaxieeffekt erklären könnte. Innerhalb 4 bis 7 Tage kann das Histamin neu gebildet werden. Deshalb ist nach dieser Zeit wieder eine normale histamin-vermittelte Sofortreaktion zu beobachten.

III- Saisonabhängigkeit der Sensibilität bei der Sensibilisierung mit 10µg OA (Methode 2) oder mit 200mg OA (Methode 1)

Beim Menschen spielt eine saisonabhängige allergische Reaktion, verursacht durch aerogene Allergene - vor allem Pollen, eine sehr große Rolle. Die wichtigsten humanen Allergen-Träger in Mitteleuropa sind im Frühjahr Hasel, Erle und Birke, dann andere Bäume und schließlich von Mai bis Juli die verschiedenen Gräser und danach noch bis September die Kräuter wie Spitzwegerich, Beifuss etc. (Ring 1995).

Ob die Sensibilität der Meerschweinchen, die in unserer Versuchsbedingung gehalten werden, von einer saisonalen Veränderung der aerogenen Allergene beeinflusst werden, kann an Hand unserer Daten beurteilt werden. Dafür wurden die Versuche zusammengeführt, die mit den jeweiligen Sensibilisierungsmethoden über das Jahr verteilt stattfanden. Bei der **Sensibilisierungsmethode 2** wurden die Untersuchungen in vier Gruppen nach den folgenden Monaten gruppiert: 1. Gruppe: Mai-Juli, 2. Gruppe: August-September, 3. Gruppe: Oktober-November und 4. Gruppe: Dezember-Januar (siehe 4.1.3). Das Fehlen des saisonalen Einflusses auf das allergische Reaktionsvermögen der Tiere von der 2. bis 5. Woche nach der Sensibilisierung könnte damit begründet werden, dass eine saisonabhängige allergische Reaktion bei Meerschweinchen gar nicht oder nicht so ausgeprägt wie beim Menschen vorkommt. Um den

Einfluss der Sensibilisierungsmethode klar zu stellen, wurde diese Untersuchung auch mit der **Sensibilisierungsmethode 1** durchgeführt (siehe 4.1.4). Hier blieb auch der saisonale Einfluss auf das Reaktionsvermögen der Tiere zwei Wochen nach der Sensibilisierung aus. Sensibilisierung und Provokationstests fanden in den Monaten Februar, März, Juni, Juli und Oktober statt. Das gibt zu bedenken, dass die Sensibilisierungsmethoden weniger Einfluss auf das Ausbleiben der saisonalen Veränderung der allergischen Reaktion haben könnte. Der Grund dafür soll mehr in unterschiedlichen immunologischen Reaktionen zwischen Mensch und Meerschweinchen gesucht werden. Die Tatsache, dass bei einer asthmatischen Sofortreaktion beim Menschen IgE der einzig wichtige Antikörper ist und bei Meerschweinchen IgG oft die Hauptrolle spielt, wobei IgE nur mit einer geeigneten Sensibilisierungsmethode noch dazu induziert werden kann, könnte eine entscheidende Bedeutung finden. Außerdem muss man nur klar stellen, dass unsere Tiere nicht im direkten Kontakt mit der Natur gehalten worden sind. Wären die Tiere im Freien gehalten worden, hätte man vielleicht mindestens teilweise andere Ergebnisse gesehen.

IV- Sensibilitätsverlauf bei der Sensibilisierung mit 10µg OA (Methode 2) und 200 mg OA (Methode 1)

Um die antientzündliche Wirkung der Asthmamittel in einem in vivo Meerschweinchenmodell zu untersuchen und vergleichbare Ergebnisse mit der Humanmedizin zu erreichen, muss man den Bedingungen der Humanmedizin, z. B. Dauermedikation, nahe kommen, d. h. die Versuche müssen über mehrere Wochen und Monate laufen. Es werden dann aber sensible Meerschweinchen gebraucht, die über mehrere Wochen eine allergische Asthmareaktion zeigten. Es wird also eine Sensibilisierungsmethode benötigt, die eine ausgeprägte sensible Phase über mehrere Wochen ermöglicht. Unsere Untersuchungen über den Zeitverlauf der allergischen Sofortreaktion (s. 4.1.1.1) haben gezeigt, dass die Sensibilisierung mit der Methode 2 eine stärkere Sensibilität der Tiere bewirkt als die Sensibilisierung mit der Methode 1. Es wurden Versuche (s. 4.1.5) über elf Wochen organisiert, um den Verlauf der sensiblen Phase zu untersuchen. **Bei der Sensibilisierungsmethode 1** (s. Abb. 14) **fällt das Reaktionsvermögen ständig ab** und fünf Wochen nach der Sensibilisierung ist keine asthmatische Reaktion mehr zu sehen. Bei der **Sensibilisierungsmethode 2** zeigten die Tiere aber **eine starke asthmatische**

Reaktion über die gesamte Untersuchungszeit (11 Wochen), bis die Tiere nicht mehr in den Plethysmographen reinpassten (s. Abb. 13). Der Vergleich zwischen beiden Sensibilisierungsmethoden innerhalb sechs Wochen zeigt eine Differenz des Reaktionsvermögens von 23,9% bis 74%, die zu den meisten Messzeitpunkten auch statistisch signifikant ist (siehe 4.1.7). Eine stärkere asthmatische Reaktion ist besser geeignet für Untersuchungen von Asthmamittel im Meerschweinchenmodell, da die allergische Reaktion der Verum- und Kontrollgruppe deutlicher zu differenzieren ist. Die Prüfungen mit der Methode der Hauttestreaktion vom Soforttyp (Passive Cutaneous Anaphylaxis – PCA) zeigen, dass die immunisierten Tiere mit einer niedrigen Dosis Ovalbumin und Aluminiumhydroxid IgE und IgG1 Antikörper produzieren, während im Serum von Tieren, die mit größeren Mengen Ovalbumin ohne Adsorbens sensibilisiert wurden, nur IgG1 beobachtet werden konnte (Andersson 1980a). Die Erklärung für die starke und dauerhafte Sensibilisierung mit 10 µg Ovalbumin und 100 mg Aluminiumhydroxid liegt also in den zusätzlich induzierten IgE-Antikörper. Bei Meerschweinchen ist das IgG der wichtigere Antikörper bei asthmatischen Reaktionen (Ovary et al 1963, Parish 1970, Riedel et al 1988); da IgG bei jeder asthmatischen Reaktion induziert wird, während IgE nur in bestimmten Fällen dazu produziert wird. Eine IgE-vermittelte allergische Reaktion bei Meerschweinchen kommt der humanen allergischen Reaktion näher und ist damit für die Humanmedizin viel interessanter. Zusammenfassend gesagt hat die **Sensibilisierung mit einer niedrigeren Dosis Ovalbumin und einem Adsorptionsmittel** (10 µg OA und 100 mg Aluminiumhydroxid) **folgende Vorteile** im Vergleich zur Sensibilisierung mit der hohen Dosis Ovalbumin (200 mg OA):

Sie ruft eine deutlichere asthmatische Reaktion hervor.

Die sensible Phase ist bei der Methode dauerhafter.

Die Methode induziert eine IgE-vermittelte allergische Reaktion wie beim Menschen

4.2. Untersuchungen mit bekannten Antiasthmatika

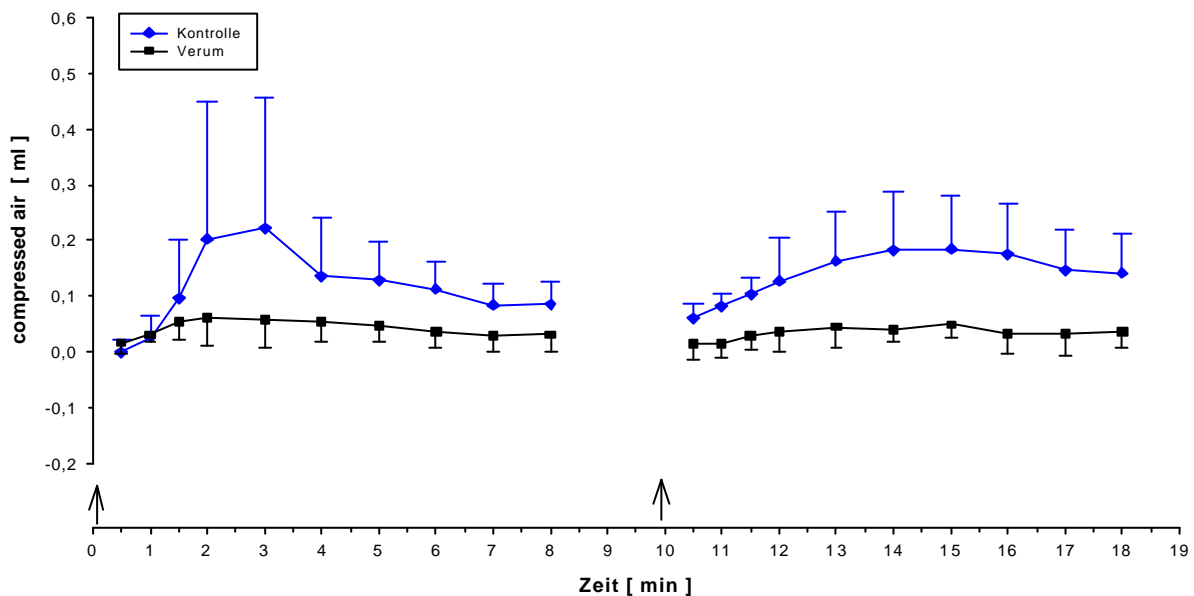
4.2.1. Ovalbuminexposition

4.2.1.1. Bronchodilatoren

4.2.1.1.1. Fenoterol als Vertreter der β -Sympathomimetika

4.2.1.1.1.1. Fenoterol orale Applikation: 1 Stunde vor Ovalbuminprovokation

Nach einmaliger oraler Applikation von **10 mg/kg Fenoterol** ist eine signifikante 68,4%ige Hemmung der Bronchokonstriktion zu sehen (siehe Abbildung 16). Die Tiere waren nach Methode 1 sensibilisiert.

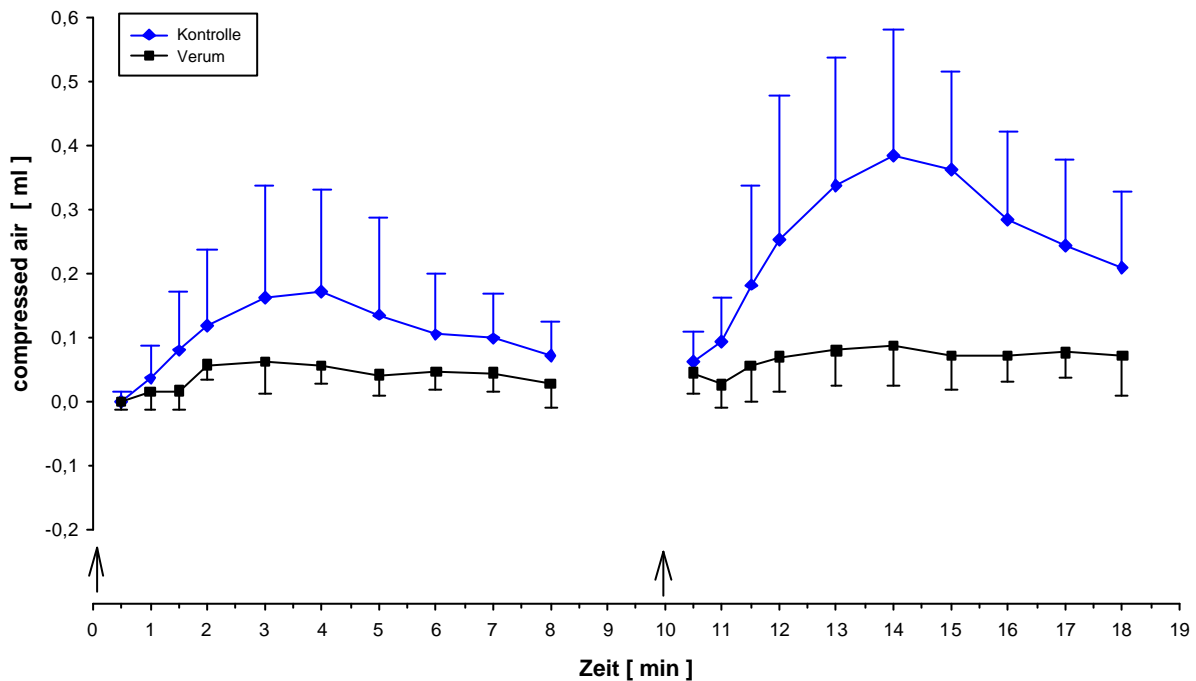


Signifikanzniveau $p < 0,05$	Signifikant
Prozentuale Hemmung	68,4

Abb. 16: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach einmaliger oraler Applikation von 10mg/kg Fenoterol eine Stunde vor OA-Provokation (0,2%); n=11; ($\bar{x} \pm SD$)

4.2.1.1.1.2. Fenoterol orale Applikation: Über 2 Tage + 1h Prae

Die orale Verabreichung von 10 mg/kg Fenoterol wurde auch über zwei Tage dreimal täglich und am dritten Tag 1 Stunde vor dem Provokationstest vorgenommen. Die asthmaprotektive Wirkung (70,9%) von Fenoterol war auch hier statistisch signifikant (siehe Abbildung 17). Die Tiere waren nach Methode 1 sensibilisiert.

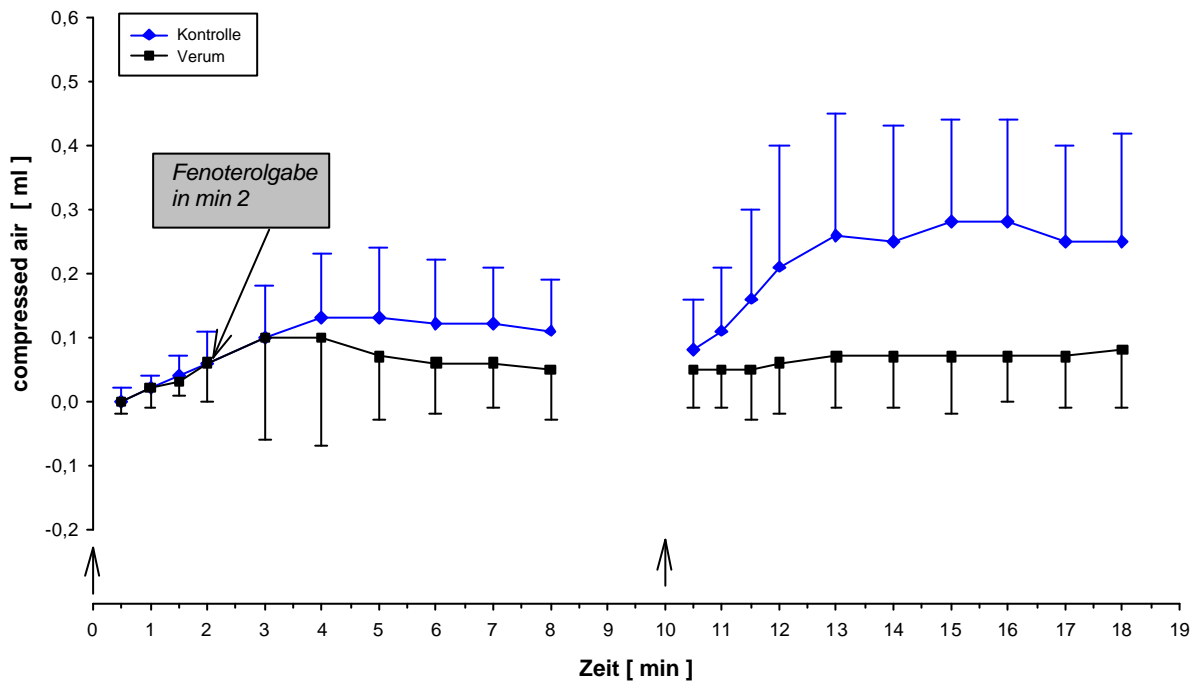


Signifikanzniveau $p < 0,05$	signifikant
Prozentuale Hemmung	70,9

Abb. 17: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedruckt in CA) nach oraler Verabreichung von 10mg/kg Fenoterol über 2 Tage (3x täglich) und am 3. Tag eine Stunde vor OA-Provokation (0,2%); n=11; ($\bar{x} \pm SD$)

4.2.1.1.1.3. Fenoterol - inhalative Applikation in Minute 2 und 12 nach Ovalbumin-Exposition

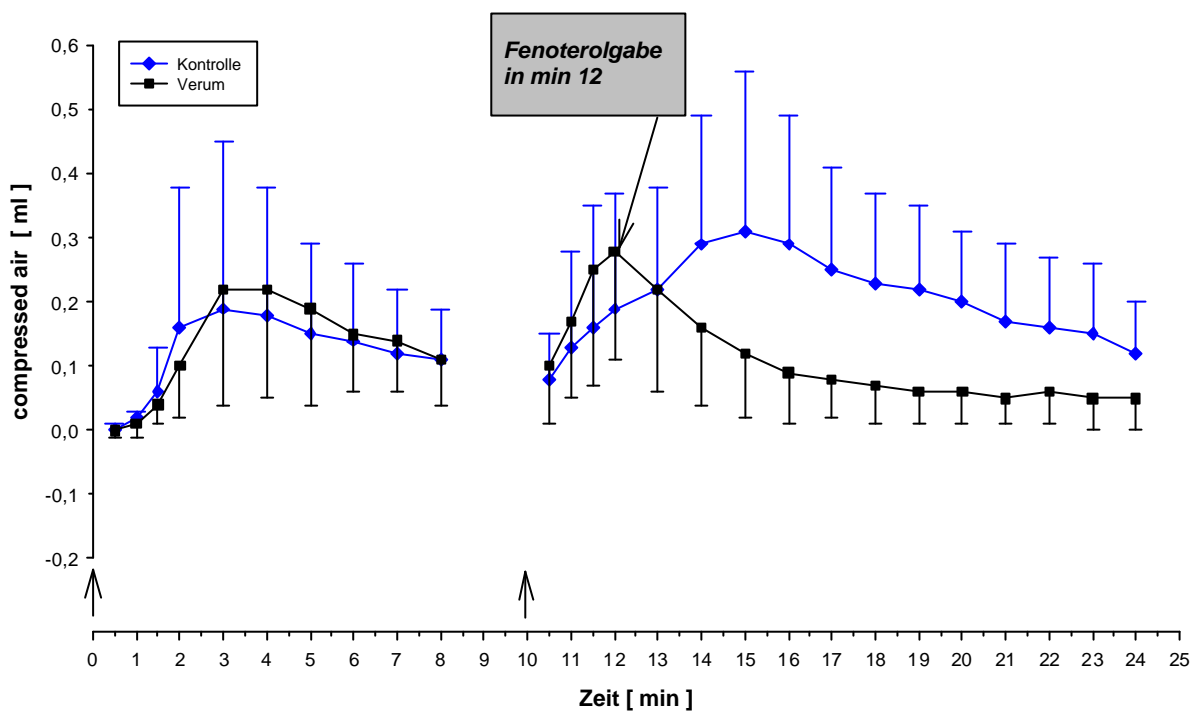
Nach der Vernebelung von Fenoterol (**0,013% für 30 sec, entspricht ca. 32 µg**) in der 2. Minute blieb der Anstieg der CA-Werte aus. Eine signifikante Wirkung mit 59,9% Inhibition der Bronchokonstriktion ist zu sehen (siehe Abbildung 18). (Sensibilisierungsmethode 2)



Signifikanzniveau $p < 0,05$	signifikant
Prozentuale Hemmung	59,9

Abb. 18: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach der Vernebelung von Fenoterol (1x 30 sec entspricht ca. 32 µg/kg) in der 2. Minute nach OA-Provokation (0,2%); n=11; ($\bar{x} \pm SD$)

Die inhalative Verabreichung von Fenoterol (**0,013% für 15 sec, entspricht ca. 16 µg**) in der 12. Minute zeigt, dass trotz gleich starker Reaktion von der Kontroll- und Verumgruppe bis dahin binnen 30 Sekunden eine signifikante Hemmung (55,3%) der Bronchokonstriktion auftritt. Berechnet wurde für die Zeit nach Fenoterolgabe, d.h. Minute 13 bis 24 (siehe Abbildung 19). (Sensibilisierungsmethode 2)



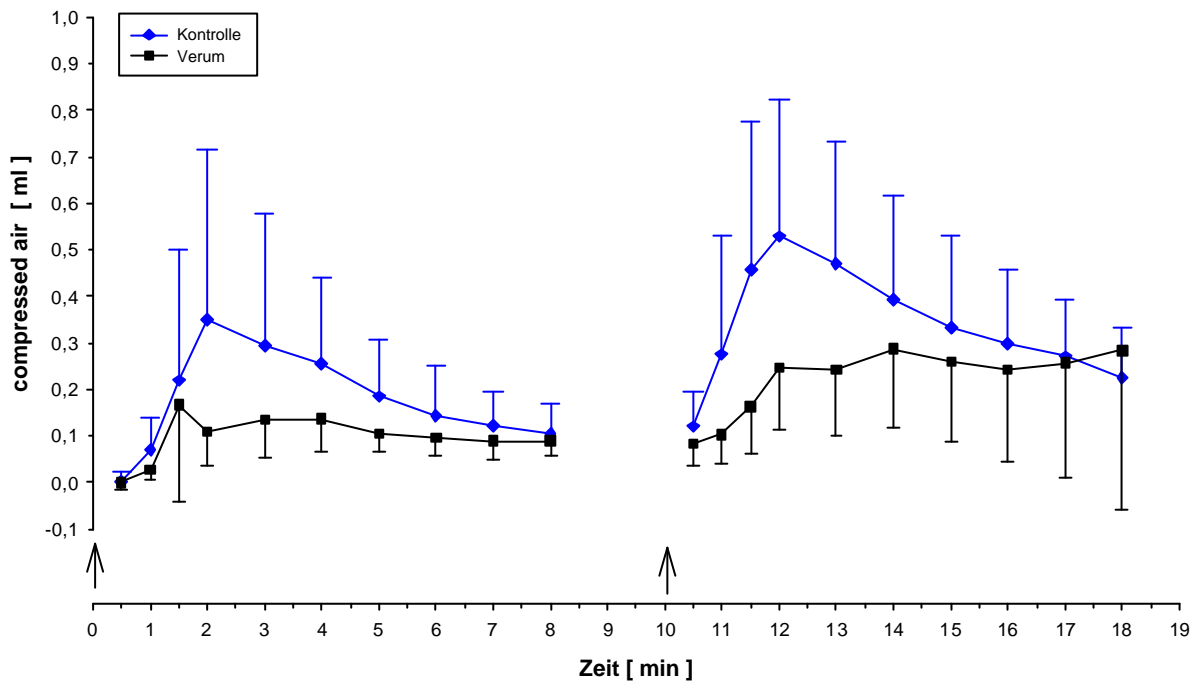
Signifikanzniveau $p < 0,05$	signifikant
Prozentuale Hemmung	55,3

Abb. 19: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach der Vernebelung von Fenoterol (1x 15 sec entspricht ca. 16 µg/kg) in der 12. Minute nach OA-Provokation (0,2%); n=10; ($\bar{x} \pm SD$)

4.2.1.1.2. Theophyllin als Vertreter von Methylxantinderivaten - orale Applikation

4.2.1.1.2.1. Theophyllin : Einmal Applikation 1 Stunde vor OA-Provokation

Theophyllin zeigt nach einmaliger oraler Applikation einer Dosis von **10 mg/kg Körpergewicht** eine signifikante Reduktion der bronchialen Obstruktion von 39,1% (siehe Abbildung 20). (Sensibilisierungsmethode 1)

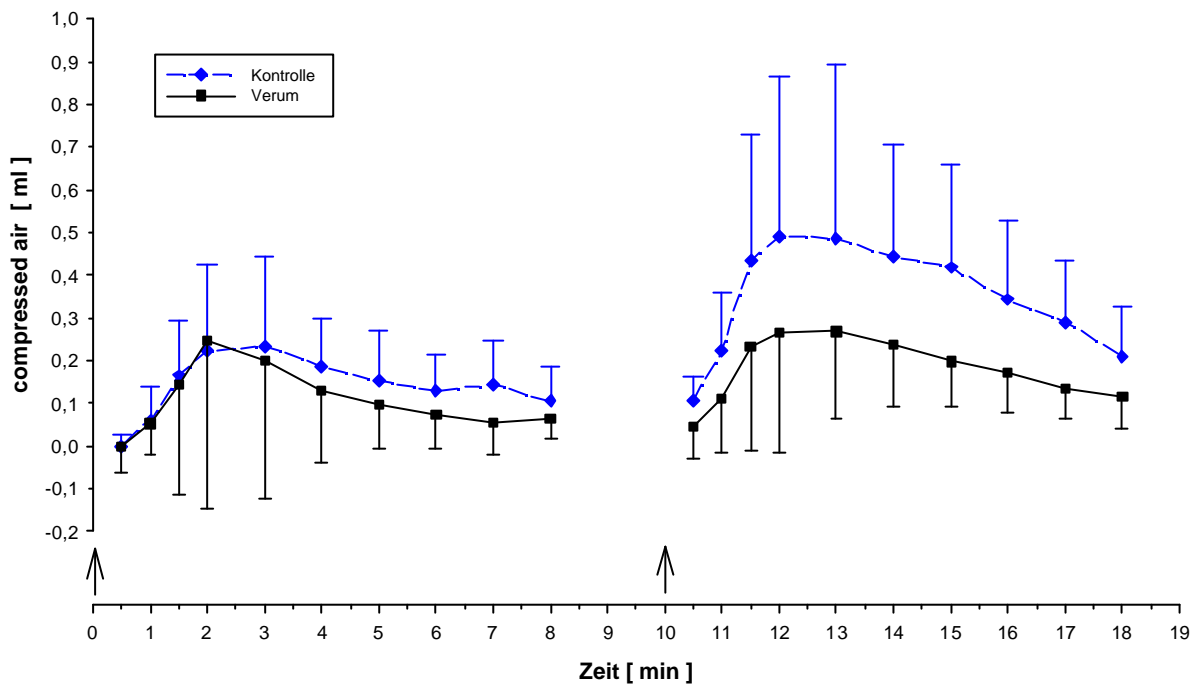


Signifikanzniveau $p < 0,05$	signifikant
Prozentuale Hemmung	39,1

Abb. 20: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach einmaliger oraler Applikation von 10mg/kg Theophyllin eine Stunde vor OA-Provokation (0,2%); n=10;

4.2.1.1.2.2. Theophyllin: Über 2 Tage und 1 h Prae

Nach oraler Vorbehandlung über 2 Tage + 1h Prae mit einer Dosis von 10 mg/kg Theophyllin war auch eine signifikante Inhibition (37%) der Bronchokonstriktion zu sehen (siehe Abbildung 21). (Sensibilisierungsmethode 1)



Signifikanzniveau $p < 0,05$	signifikant
Prozentuale Hemmung	37

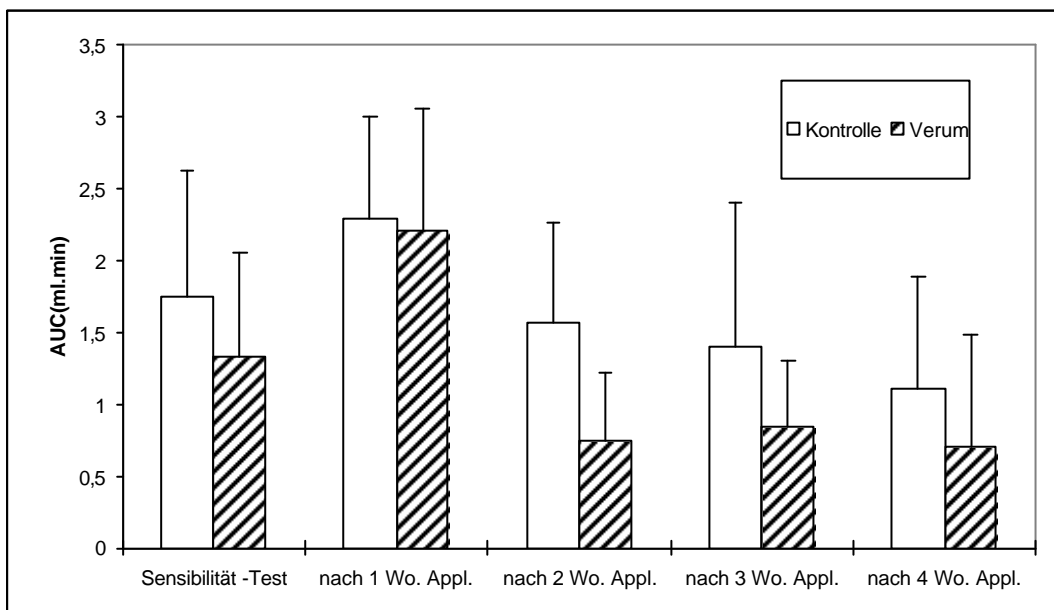
Abb. 21: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach oraler Verabreichung von 10mg/kg Theophyllin über 2 Tage (3x täglich) und am 3. Tag eine Stunde vor OA-Provokation (0,2%); n=11; ($\bar{x} \pm SD$)

4.2.1.2. Entzündungshemmende Substanzen

4.2.1.2.1. Glukokortikoide

4.2.1.2.1.1. Methylprednisolon - orale Verabreichung (Sensibilisierungsmethode 1)

Bei Glukokortikoiden musste man die Tiere über längere Zeit mit der Substanz behandeln, um die entzündungshemmende Wirkung zu erreichen. Nach täglicher oraler Gabe von **20 mg/kg Körpergewicht** Methylprednisolon zeigte sich erst in der 2. Woche eine signifikante Reduktion der Bronchokonstriktion (52,5%) von den Verumtieren gegenüber den Kontrolltieren. In den Wochen 3 und 4 reagiert die Kontrollgruppe immer schwächer, obwohl die Verumgruppe weiter eine geringere Bronchokonstriktion zeigt. Deshalb lässt die Signifikanz der Wirkung in den Wochen 3 und 4 nach (siehe Abbildung 22 und 23).



Test	Sensi.	1Wo.Appl.	2Wo.Appl	3Wo.Appl	4Wo.Appl
Signifikanzniveau $p < ,05$	n. signif	n. signif	signifikant	n. signif	n. signif
Prozentuale Inhibit. (%)	23,6	3,7	52,5	39,8	36,1

Abb. 22: Reaktionsverlauf nach 1x täglicher oraler Applikation von 20 mg/kg Methylprednisolon und wöchentlichem Provokationstest; OA-Provokation (0,2%); $n_c = 8, n_v = 7$; (AUC(MW)±SD)

Methylprednisolon

Provokationstest nach 2 Wochen Appl. 20mg/kg oral, 1xtgl. nc=8,nv=7

OA-Provokation (0,2%) : (x +/- SD)

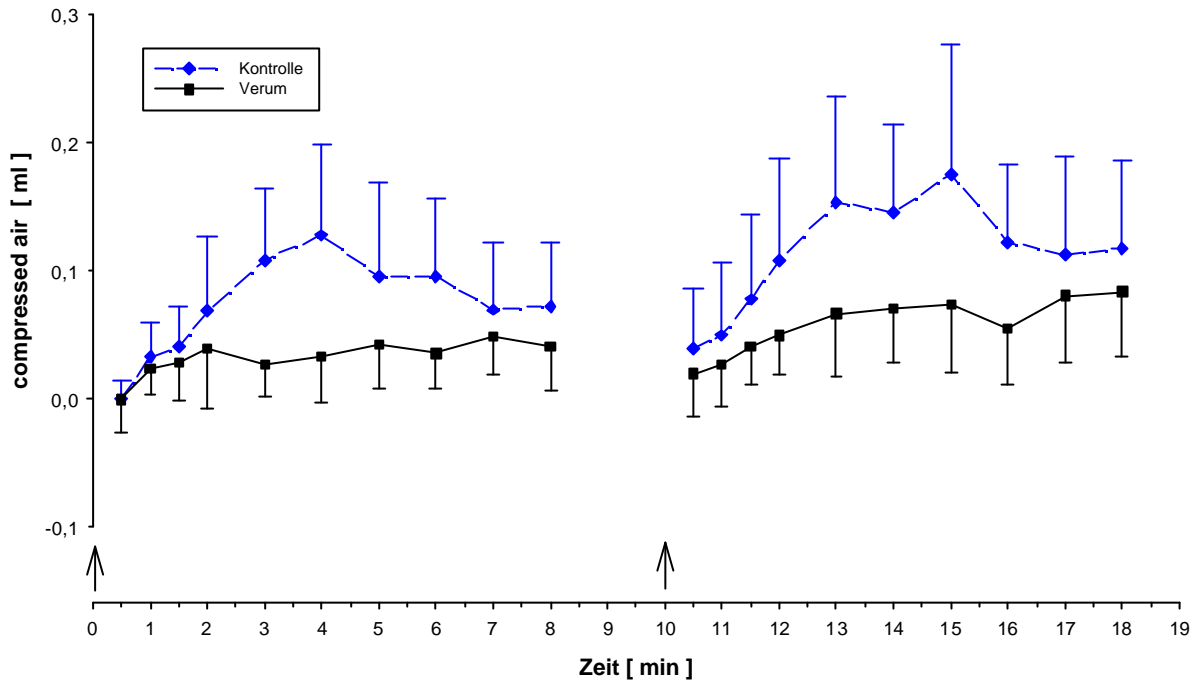
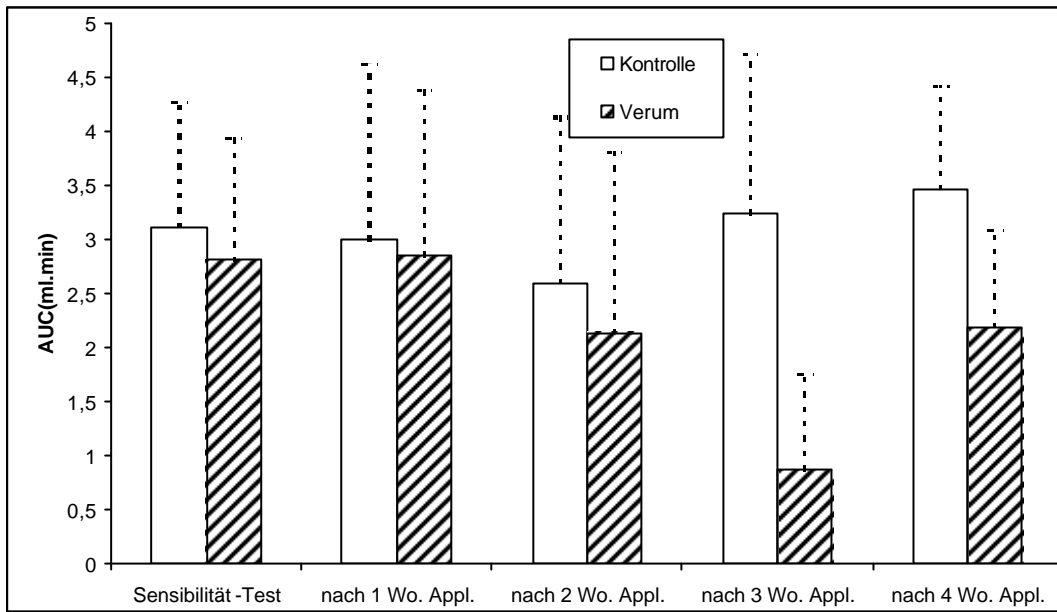


Abb. 23

4.2.1.2.1.2. Budesonid - inhalative Applikation (Sensibilisierungsmethode 2)

Nach täglicher inhalativer Applikation von **ca. 23 µg/kg Körpergewicht** Budesonid wurde erst in der 3. Woche die Ovalbumin-induzierte Bronchokonstriktion signifikant um 73,1% vermindert. Die signifikante asthmaprotektive Wirkung lässt in der 4. Woche nach (siehe Abb. 24 und 25).



Test	Sensi.	1Wo.Appl.	2Wo.Appl	3Wo.Appl	4Wo.Appl
Signifikanzniveau $p < ,05$	n. signif	n. signif	n. signif	signifikant	signifikant
Inhibition(%)	10,0	4,8	17,8	73,1	36,9

Abb. 24: Reaktionsverlauf nach 1x täglicher inhalativer Applikation von ca. 23µg/kg Budesonid und wöchentlichem Provokationstest; OA-Provokation (0,2%); $n_c = n_v = 7$; (AUC(MW)±SD)

Budesonid ca. 23µg/kg

Provokationstest nach 3 Wochen Appl.: inhalativ 1xtgl. $n_c = n_v = 7$

OA-Provokation (0.2%) : (x +/- SD)

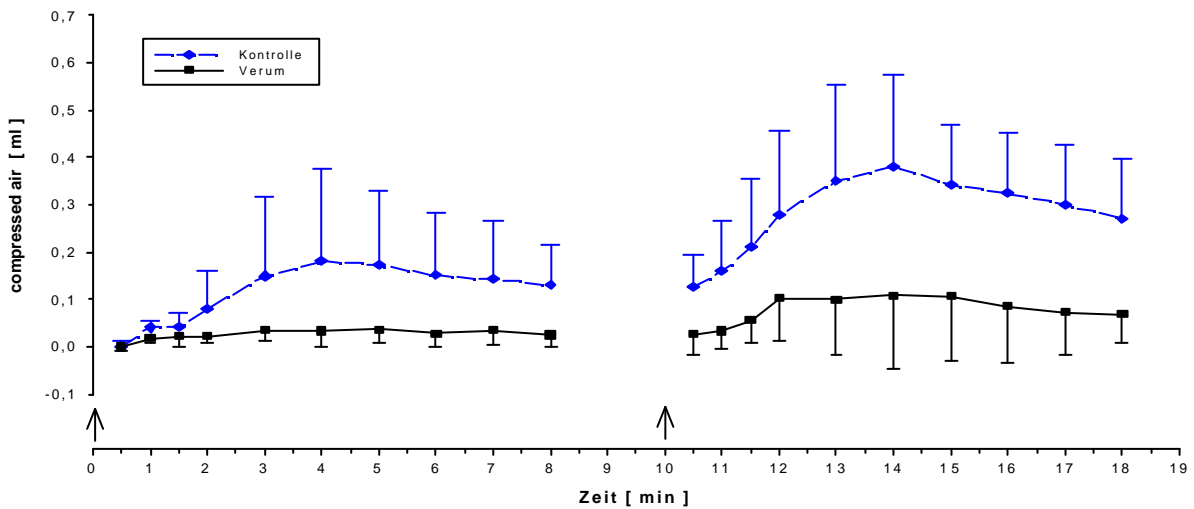
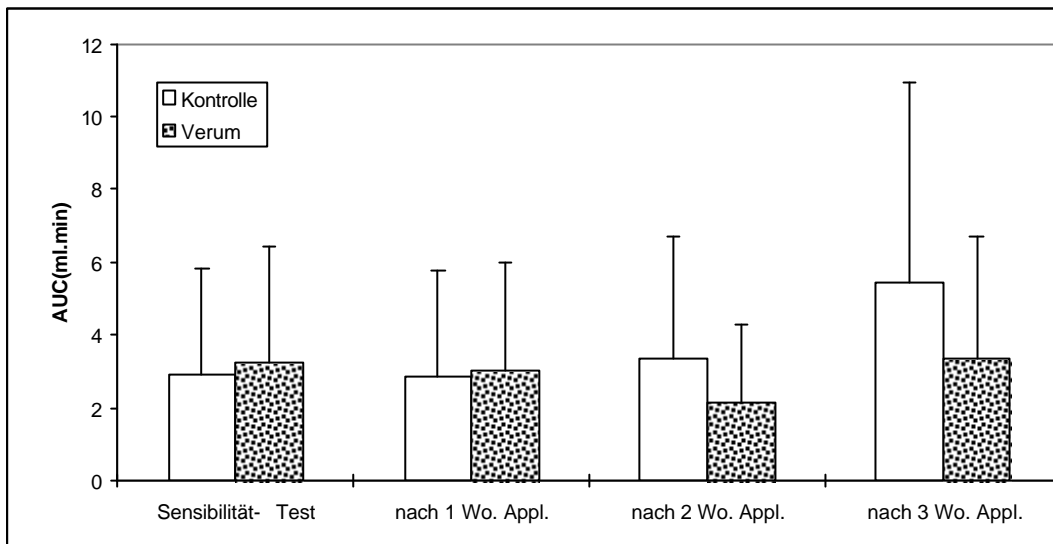


Abb. 25

Wenn aber **100 µg/kg Körpergewicht** Budesonid täglich inhalativ appliziert wird, erscheint eine signifikante Hemmung von 35,8% der bronchialen Obstruktion bereits in der 2. Woche, die dann mit einer Inhibition von 38,4% in der 3. Woche anhält (siehe Abbildung 26 und 27).



Test	Sensi.	1Wo.Appl.	2Wo.Appl	3Wo.Appl
Signifikanzniveau $p < ,05$	n. signif	n. signif	signifikant	signifikant
Inhibition(%)	-10,2	-4,5	35,8	38,4

Abb. 26: Reaktionsverlauf nach 1x täglicher (morgens) inhalativer Applikation von ca. 100µg/kg Budesonid und wöchentlichem Provokationstest; OA-Provokation (0,2%) ; $n_c = 8$, $n_v = 7$; (AUC(MW)±SD)

Budesonid ca. 100µg/kg

Provokationstest nach 2 Wochen Appl.: inhalativ 1xtgl. nc=nv=7

OA-Provokation (0.2%) : (x +/- SD)

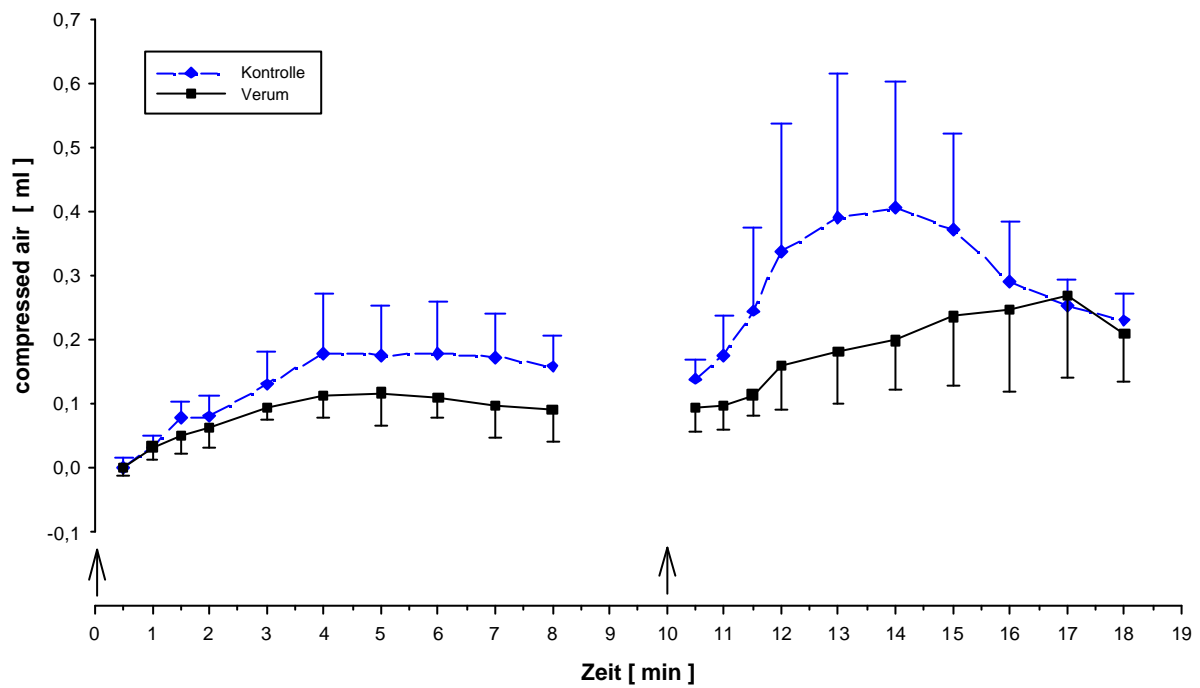
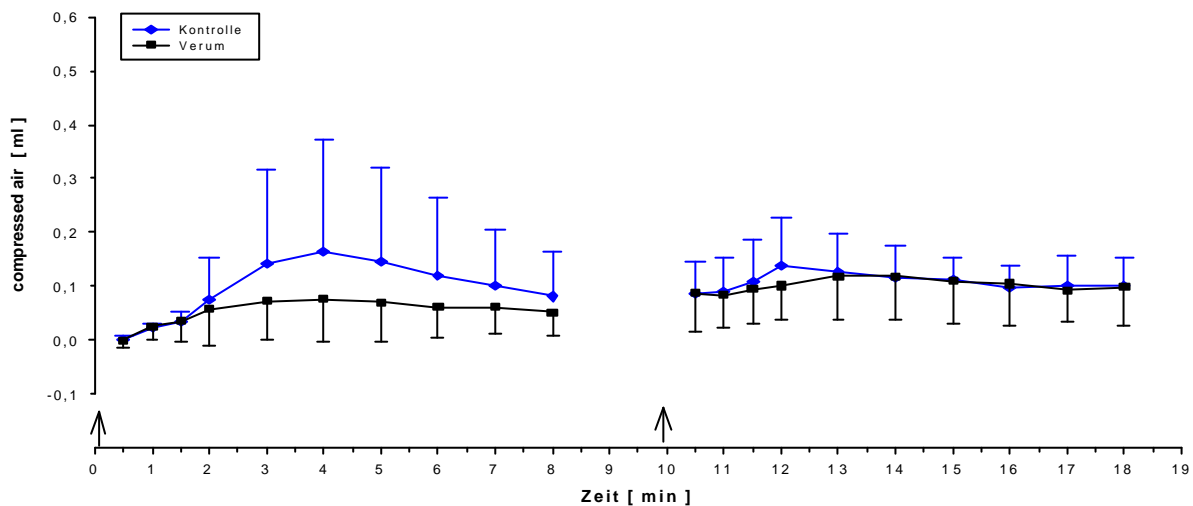


Abb. 27

4.2.1.2.2. Antileukotriene (Montelukast) – Orale Applikation

Montelukast als Leukotrien-Rezeptor-Antagonist wurde nach **einmaliger, dreitägiger und dreiwöchiger Applikation** an Meerschweinchen – sensibilisiert mit der Methode 2 - untersucht. Die Wirkung von Montelukast in Kombination mit Wascha (Gummiharz von *Dorema ammoniacum* Don) - eine traditionelle Droge aus Iran - wurde auch nach drei Wochen Therapie untersucht. Das Ergebnis wird aber in Kapitel 4.3.1.2.2. besprochen.

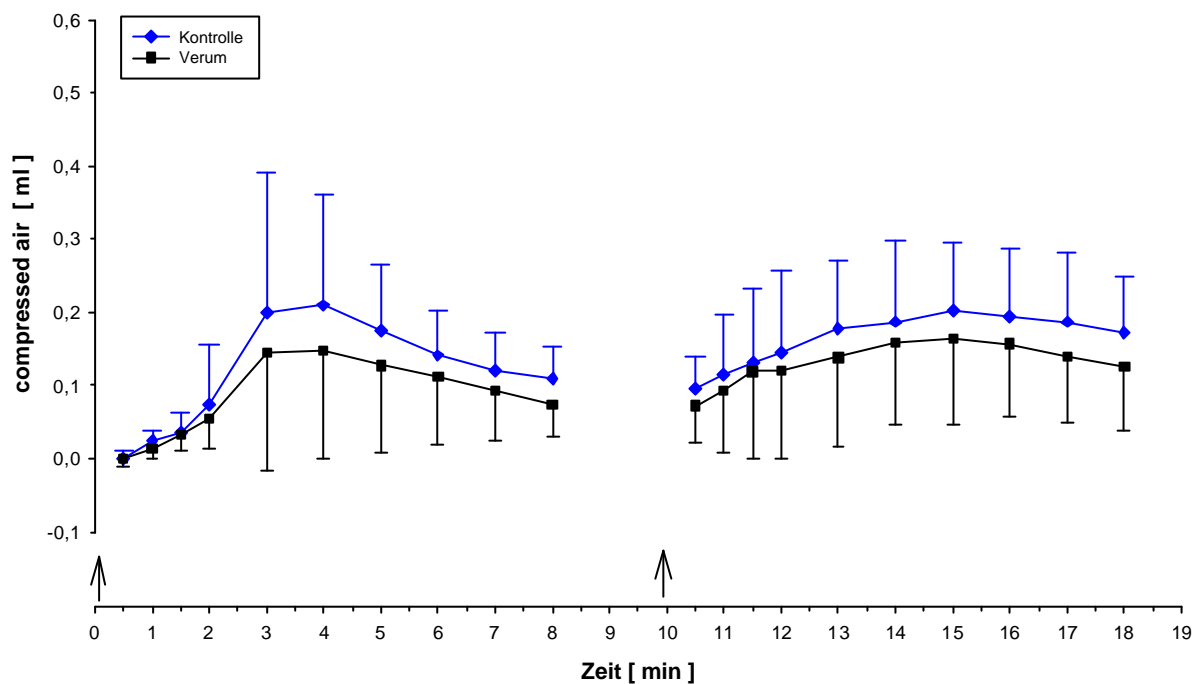
Montelukast zeigte nach einmaliger oraler Applikation von **0,5 mg/kg** eine 24,8%ige Inhibition der Bronchokonstriktion, die aber statistisch nicht signifikant war (siehe Abbildung 28).



Signifikanzniveau $p < 0,05$	nicht signifikant
Prozentuale Hemmung	24,8

Abb. 28: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedruckt in CA) nach einmaliger oraler Applikation von 0,5mg/kg Montelukast eine Stunde vor OA-Provokation (0,2%); n=13; ($\bar{x} \pm SD$)

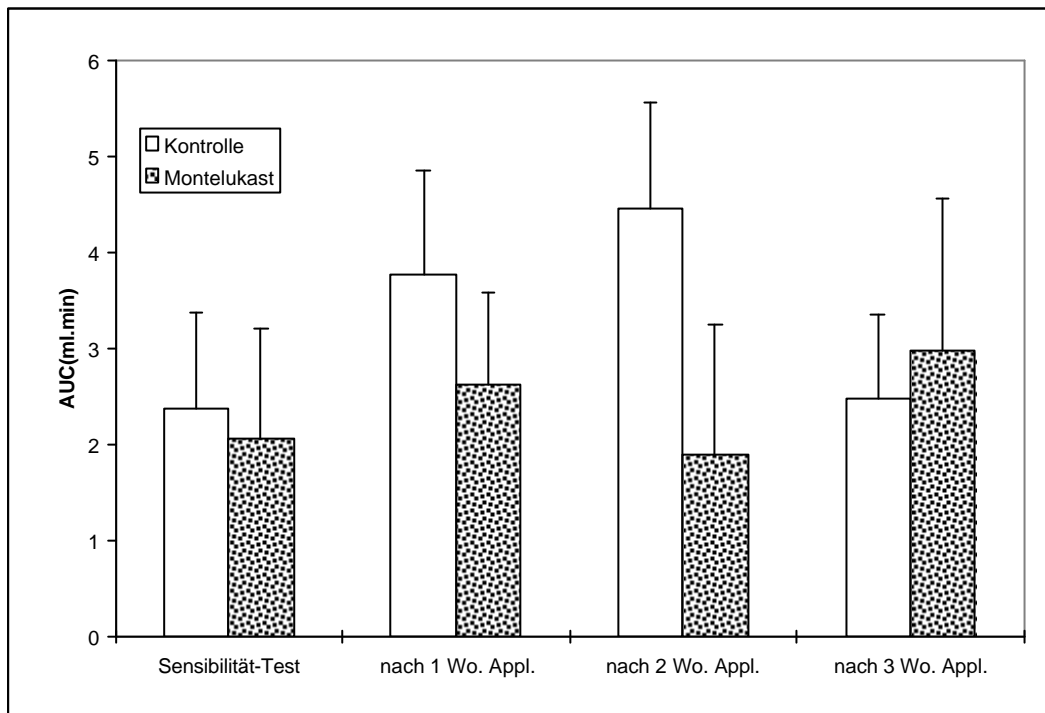
Nach dreitägiger oraler Therapie mit 1x täglich 0,5 mg/kg Montelukast war auch keine signifikante antiasthmatische Aktivität (22,9%) zu sehen (siehe Abbildung 29).



Signifikanzniveau $p < 0,05$	nicht signifik.
Prozentuale Hemmung	22,9

Abb. 29: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach oraler Verabreichung von 0,5mg/kg Montelukast über 2 Tage (1x täglich) und am 3. Tag eine Stunde vor OA-Provokation (0,2%); n=11; ($\bar{x} \pm SD$)

Nach 1x täglicher oraler Applikation von **0,5 mg/kg Montelukast über drei Wochen** wurde erst in der 2. Woche eine signifikante (57,6%) asthmaprotektive Wirkung nach OA-Provokation deutlich. Eine Woche später ist aber wieder keine signifikante Wirkung zu sehen (siehe Abbildung 30 und 31).



Test	Sensi.	1Wo.Appl.	2Wo.Appl	3Wo.Appl
Signifikanzniveau $p < ,05$	n. signif	n. signif	signifikant	n. signif
Inhibition(%)	12,8	30,7	57,6	-19,59

Abb. 30: Reaktionsverlauf nach 1x täglicher oraler Applikation von 0,5 mg/kg Montelukast und wöchentlichem Provokationstest; OA-Provokation (0,2%); nc = nv = 6 ; (AUC(MW)±SD)

Montelukast

Provokationstest nach 2 Woche Appl. 0,5mg/kg oral, 1xtgl. nc=nv=6

OA-Provokation (0,2%) ; (x +/- SD)

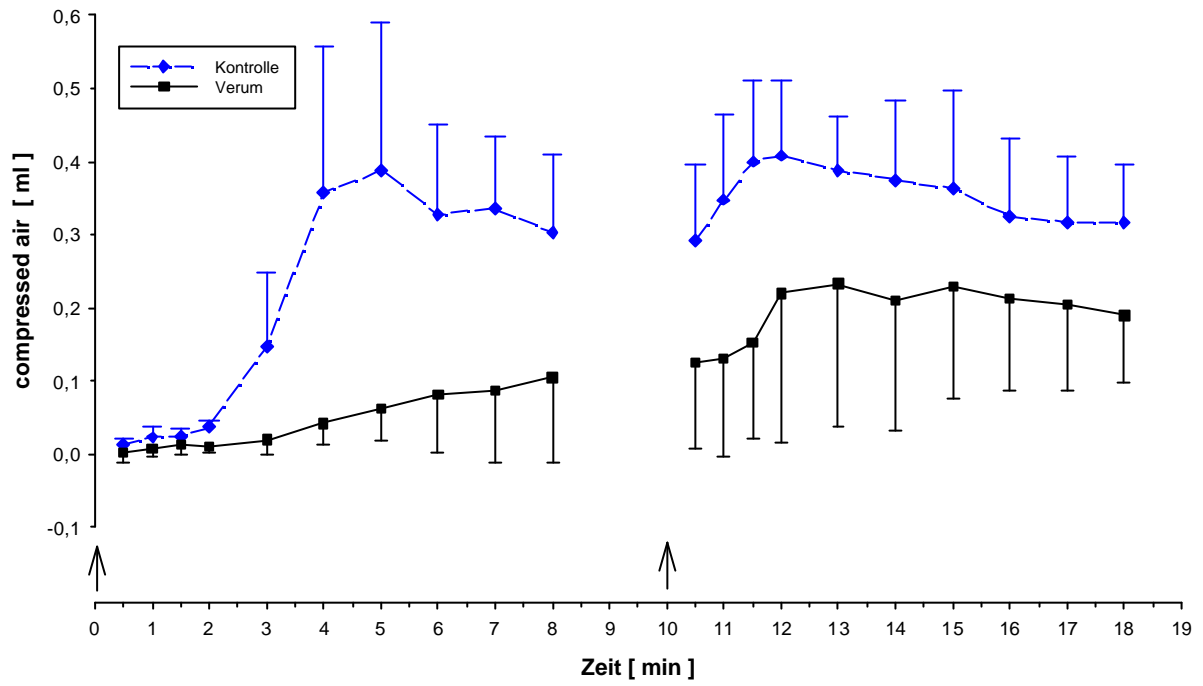


Abb. 31

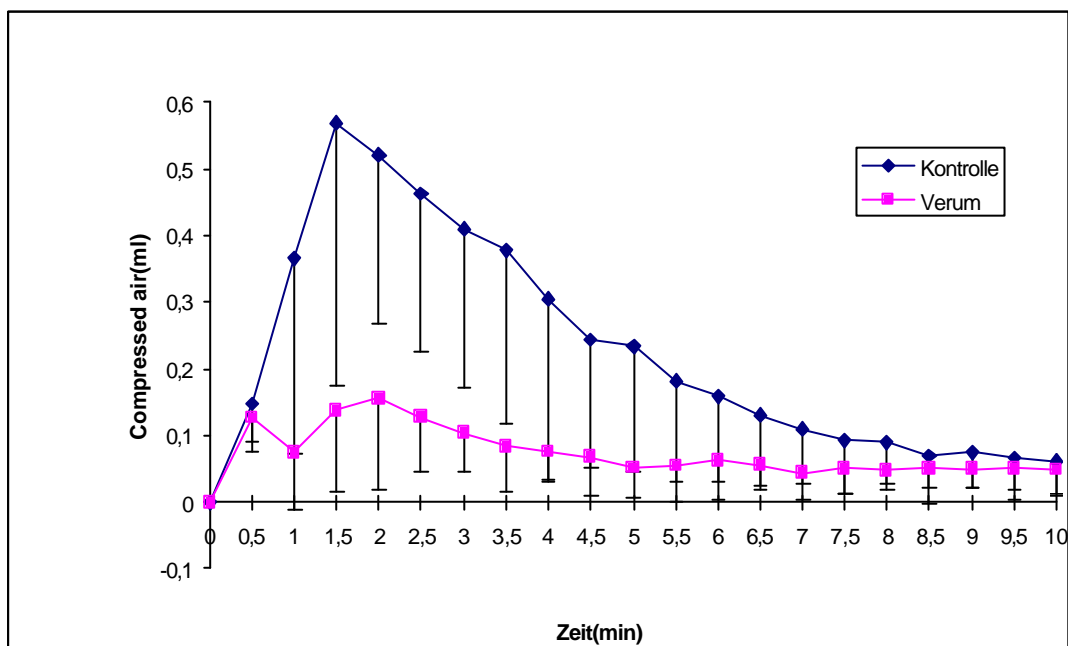
4.2.2. Histaminprovokation

4.2.2.1. Bronchodilatoren

4.2.2.1.1. Fenoterol

4.2.2.1.1.1. Fenoterol orale Applikation: Einmal Applikation 1 Stunde vor Histamin- Provokation

Fenoterol zeigte nach 1x oraler Applikation einer Dosis von **10 mg/kg** eine signifikante Hemmung der **Histamin-induzierten Bronchokonstriktion**. Die prozentuale Inhibition betrug 67,7% (siehe Abbildung 32). (Sensibilisierungsmethode 1)

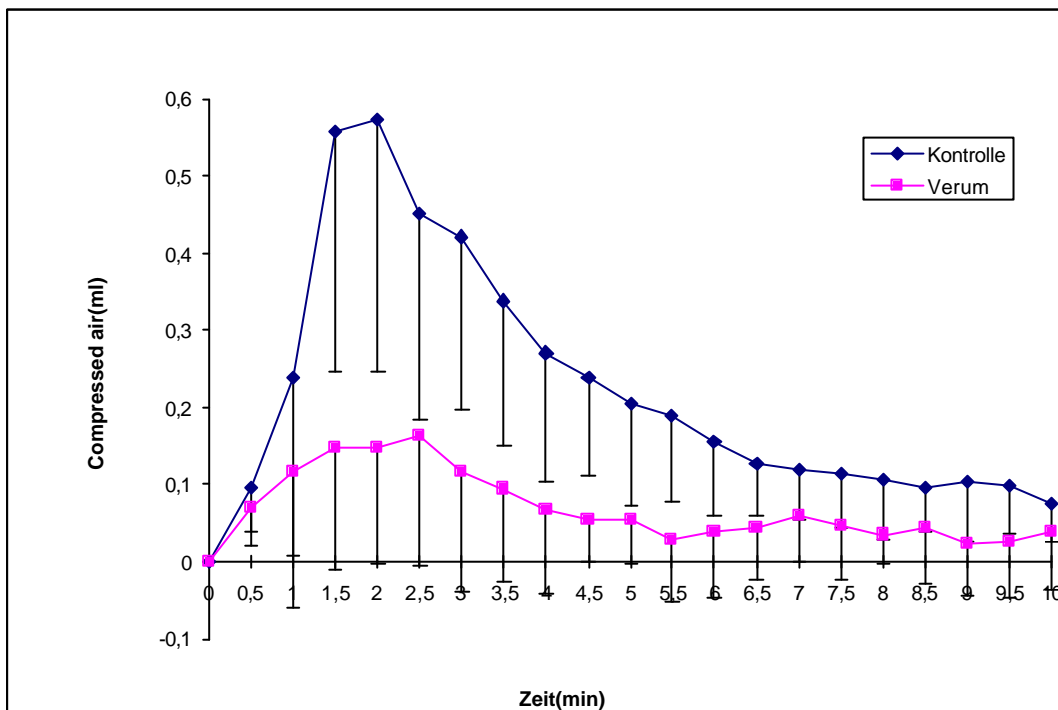


Signifikanzniveau $p < 0,05$	signifikant
Prozentuale Hemmung	67,7

Abb. 32: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach einmaliger oraler Applikation von 10mg/kg Fenoterol eine Stunde vor HI-Provokation (0,1%, 1x 30 sec in Minute 0); n=14; ($\bar{x} \pm SD$)

4.2.2.1.1.2. Fenoterol orale Applikation: Über 2 Tage + 1h Prae

Die orale Verabreichung von 10 mg/kg Fenoterol wurde ebenso über 2 Tage dreimal täglich und am dritten Tag 1 Stunde vor dem Provokationstest vorgenommen. Hier war auch eine signifikante Inhibition (69,1%) zu sehen (siehe Abbildung 33). (Sensibilisierungsmethode 1)

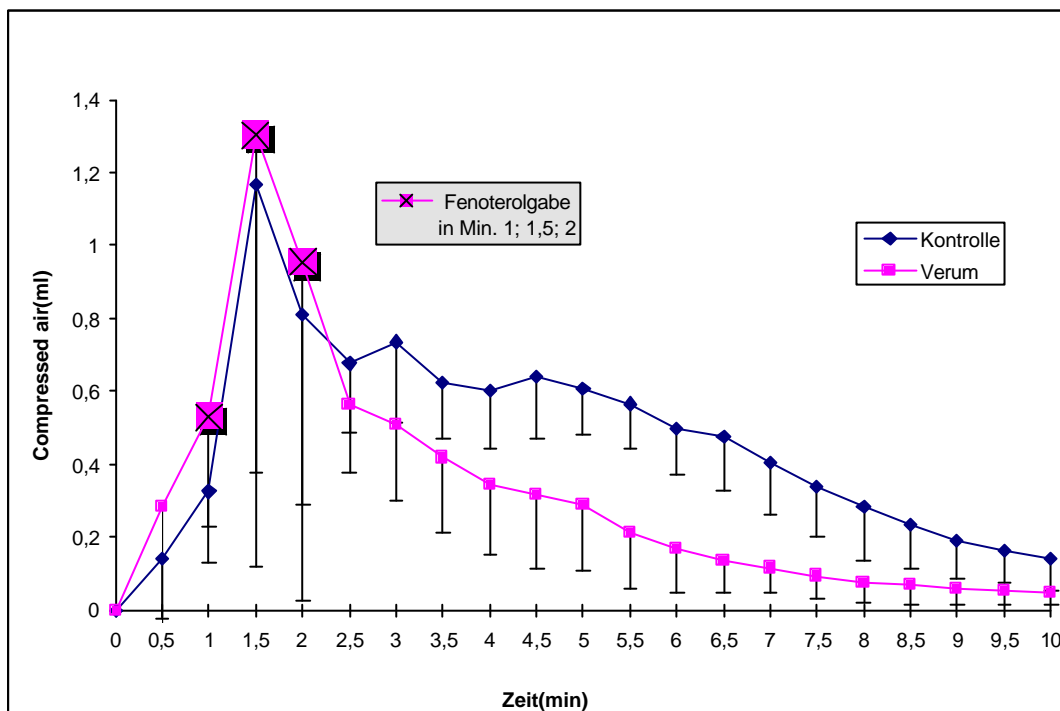


Signifikanzniveau $p < 0,05$	signifikant
Prozentuale Hemmung	69,1

Abb. 33: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedruckt in CA) nach oraler Verabreichung von 10mg/kg Fenoterol über 2 Tage (3x täglich) und am 3. Tag eine Stunde vor HI-Provokation (0,1%, 1x 30 sec in Minute 0); n=13; ($\bar{x} \pm SD$)

4.2.2.1.1.3. Fenoterol – inhalativ

Eine **0,013%ige Fenoterollösung** wurde 3x 15 sec in der 60sten, 90sten und 120sten Sekunde nach Histaminprovokation in den Atemwegen der Tiere vernebelt. Eine signifikante Inhibition der eingeleiteten Bronchokonstriktion mit einer Hemmung von 36,8% war zu sehen, die aber später einsetzte (siehe Abbildung 34). (Sensibilisierungsmethode 1)



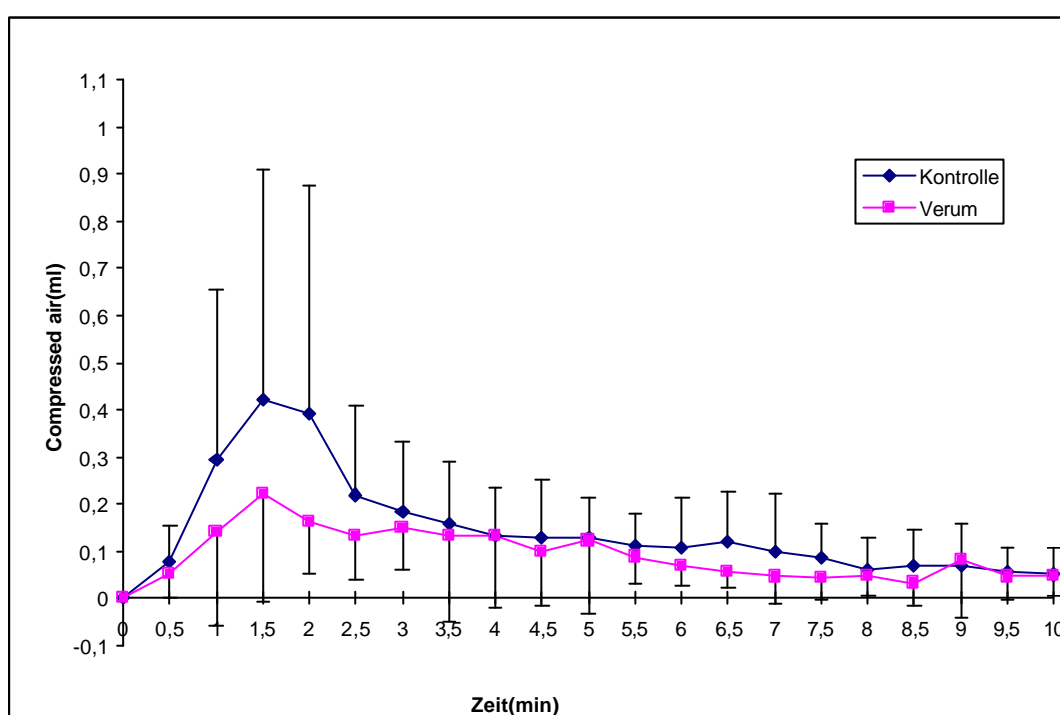
Signifikanzniveau $p < 0,05$	signifikant
Prozentuale Hemmung	36,8

Abb. 34: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach der Vernebelung von Fenoterollösung (0,013%, 3x 15 sec in der 60sten, 90sten und 120sten Sekunde) nach HI-Provokation (0,3%, 1x 30 sec in Minute 0); n=14; ($\bar{x} \pm SD$)

4.2.2.1.2. Theophyllin – oral

4.2.2.1.2.1 Theophyllin – oral: 1 Stunde vor Histaminprovokation

Theophyllin zeigte nach 1x oraler Verabreichung von **10 mg/kg** 1 Stunde vor dem Provokationstest eine 38,1%ige Verminderung der obstruktiven Reaktivität. Die Wirkung ist aber statistisch nicht signifikant (siehe Abbildung 35). (Sensibilisierungsmethode 1)

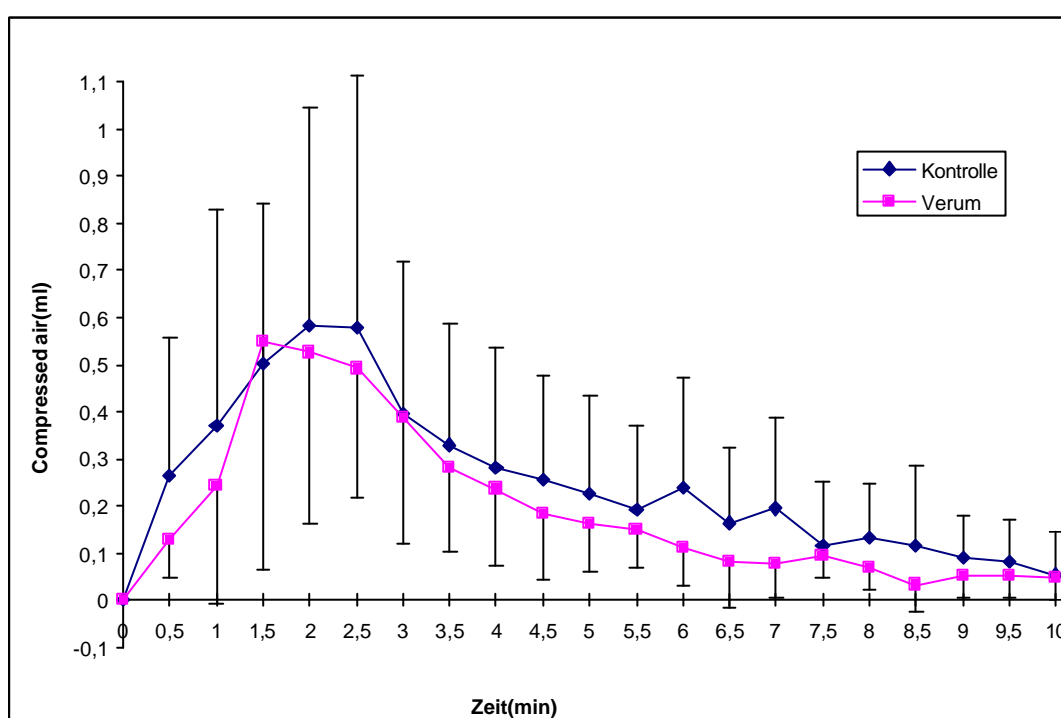


Signifikanzniveau $p < 0,05$	nicht signifik.
Prozentuale Hemmung	38,1

Abb. 35: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach einmaliger oraler Applikation von 10mg/kg Theophyllin eine Stunde vor HI-Provokation (0,1%, 1x 50 sec in Minute 0); n=10; ($\bar{x} \pm SD$)

4.2.2.1.2.2 Theophyllin – oral: Über 2 Tage und 1 Stunde Prae

Nach Applikation von 10 mg/kg Theophyllin über 2 Tage dreimal täglich und am dritten Tag 1 Stunde vor dem Provokationstest wurde auch keine signifikante Hemmung der bronchialen Obstruktion gesehen. Die prozentuale Inhibition betrug 24,8% (siehe Abbildung 36). (Sensibilisierungsmethode 1)



Signifikanzniveau $p < 0,05$	nicht signifik.
Prozentuale Hemmung	24,8

Abb. 36: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach oraler Verabreichung von 10mg/kg Theophyllin über 2 Tage (3x täglich) und am 3. Tag eine Stunde vor HI-Provokation (0,1%, 1x 30 sec in Minute 0); n=10; ($\bar{x} \pm SD$)

4.2.3. Diskussion der Untersuchungsergebnisse von bekannten humanen Asthmamitteln (S. 56 – S. 75).

4.2.3.1. Bronchodilatoren

4.2.3.1.1. Fenoterol (β_2 -Sympathomimetikum)

Die Wirkung von Fenoterol als altbekanntes kurzwirksames β_2 -Sympathomimetikum wurde in diesem Tiermodell untersucht, **um unser Tiermodell zu validieren**. Die Ergebnisse der oralen Applikation von Fenoterol demonstrieren, dass die Therapieergebnisse der Humanmedizin in unserem Tiermodell reproduziert werden können. Die **orale** Applikation von **10 mg/kg** Körpergewicht kann bei einmaliger Applikation eine Stunde vor der Allergen (Ovalbumin)-Exposition (siehe 4.2.1.1.1.1), genauso wie in der Humanmedizin, eine asthmatische Sofortreaktion signifikant verhindern. Bei der oralen Therapie über drei Tage ist die Wirkung etwas stärker (siehe 4.2.1.1.1.2), jedoch stellte sich bei einigen Tieren Tremor als Nebenwirkung ein. **Die inhalative Gabe** von Fenoterol am Anfang des Asthmaanfalls (30 sec. Vernebelung einer 0,013%igen Fenoterollösung in Minute 2 nach OA-Exposition) oder mittendrin (15 sec. Vernebelung einer 0,013%igen Fenoterollösung in Minute 12 nach der ersten OA-Exposition) zeigt die **schnelle Unterbrechung der Bronchokonstriktion** (siehe 4.2.1.1.1.3). Beim Menschen tritt die Wirkung 3-5 Minuten nach der Fenoterolvernebelung ein (Haen und Uhl 1996). In unseren Versuchen haben die Meerschweinchen auf vernebeltes Fenoterol nach 30 Sekunden reagiert. Wegen der sofortigen Unterbrechung des Asthmaanfalls haben wir bei unseren Versuchen die inhalative Fenoterolapplikation immer bei gefährdeten Tieren während der Allergenexposition als Rettungsmaßnahme angewandt.

Für die Empfindlichkeit des Zweikammerplethysmographen nach Dorsch-Hess und dieses Tiermodelles spricht, dass man mit einer so niedrigen Dosis an β_2 -Sympathomimetikum (Vernebelung einer 0,013%igen Fenoterollösung für 15 oder 30 sec.) eine Inhibition der bronchokonstriktiven Sofortreaktion reproduzieren kann. In anderen Arbeiten wurden oft höhere Dosen an β_2 -Sympathomimetika (Vernebelung einer 0,2 und 0,5%igen Sultanollösung für

10 min. - Ikegami et al 1997) eingesetzt, um eine gleiche Wirkung zu erzielen. Eine überhöhte Dosis Fenoterol, wie sie in der Humanmedizin bei der heute obsoleten Mono-Dauertherapie mit β -Sympathomimetika verwendet wurde, kann zu drastischen Nebenwirkungen wie bronchiale Hyperreagibilität und Mortalität führen. Meerschweinchen haben eine hohe Dosis Salbutamol (täglich 1 mg/kg s.c. in der Nuchal-Region) bei einer Histamin- bzw. PGF 2α -Exposition nicht überlebt (Sanjar et al 1990).

Bei Ovalbumin-sensibilisierten Meerschweinchen haben wir die protektive Wirkung nach oraler Applikation und die bronchodilatatorische Wirkung nach inhalativer Gabe von Fenoterol auch **nach Histaminprovokation** untersucht. Fenoterol als direktes Relaxans der Bronchialmuskulatur hat hier bei oraler Applikation die gleiche signifikante Wirkung wie nach Ovalbuminexposition gezeigt (siehe 4.2.2.1.1.1. und 4.2.2.1.1.2.). Nach inhalativer Applikation von Fenoterol in der 60., 90. und 120. Sekunde (siehe 4.2.2.1.1.3) kam es jedoch zu keiner schnellen Unterbrechung der Bronchokonstriktion wie nach Ovalbuminprovokation und insgesamt war die signifikante Inhibition (36,8%) schwächer als bei Ovalbuminexposition (55,3-59,9%).

Alles in allem entsprechen unsere Ergebnisse mit Fenoterol auch den Ergebnissen von anderen Untersuchungen mit β_2 -Sympathomimetika im Meerschweinchenmodell (Sanjar et al 1990, Iwama et al 1991, Matsumoto et al 1994, Ikegami et al 1997).

4.2.3.1.2. Theophyllin (Methylxantine)

Theophyllin als mittelstarker Bronchodilatator (Wirkungsstärke 2/3 von β_2 -Sympathomimetika) wird seit über 80 Jahren in der Humanmedizin eingesetzt. Theophyllin wurde auch in einigen Meerschweinchenmodellen untersucht (Andersson 1980b, Sanjar et al 1990, Banner et al 1995, Geist et al 1995, Ikegami et al 1997). Theophyllin hat entzündungshemmende Eigenschaften und kann deshalb nicht nur die asthmatische Sofortreaktion, sondern auch die verzögerte asthmatische Reaktion hemmen.

In dieser Arbeit wurde die **protektive Wirkung von 10 mg/kg** Theophyllin in einem in vivo Meerschweinchenmodell bei ovalbumin- und histamin-induzierter asthmatischer Sofortreaktion untersucht. Theophyllin zeigt in dieser Arbeit bei **einmaliger Applikation und drei Tage Therapie** eine **signifikante Inhibition der antigen(OA)-induzierten asthmatischen Sofortreaktion** (siehe 4.2.1.1.2.1. und 4.2.1.1.2.2.). Die 10 mg/kg-Dosis ist die normale Dosis,

die auch in der Humanmedizin mit individuellen Abweichungen empfohlen wird. In anderen Meerschweinchenmodellen konnte oft nur für höhere Dosen von Theophyllin (erst ab 30 mg/kg) die Wirkung bewiesen werden (Ikegami et al 1997, Banner et al 1995, Matsumoto et al 1994, Andersson und Bergstrand 1981); für 10 mg/kg konnte keine Inhibition der asthmatischen Sofort- und Spätreaktion beobachtet werden (Ikegami et al 1997, Matsumoto et al 1994). Das spricht für die **Sensibilität und Genauigkeit des Plethysmographen nach Dorsch und Hess**. Dies ist wichtig, da einerseits 10 mg/kg Dosis auch in der Humanmedizin üblich sind und andererseits die höheren Dosen von Theophyllin, z.B. 100 mg/kg, zu drastischen Nebenwirkungen wie Tremor, Anfall und zum Tod geführt haben (Ikegami et al 1997, Matsumoto et al 1994).

Im Unterschied zu Allergen-induzierten Reaktionen zeigt Theophyllin in der Humanmedizin kaum eine protektive Wirkung gegenüber der durch Histamin und Eicosanoide ausgelösten Sofortreaktion (Martin 1997). In den Meerschweinchen-Versuchen wurde auch keine signifikante Hemmung der Histamin-induzierten (Andersson 1980b, Sanjar et al 1990) oder Prostaglandin F_{2α}-induzierten Bronchokonstriktion gesehen (Sanjar et al 1990). In dieser Arbeit konnte zwar eine protektive Wirkung von Theophyllin bei einmaliger Applikation (38,1%) und bei einer drei Tage Therapie (24,8%) beobachtet werden (siehe 4.2.2.1.2.1. und 4.2.2.1.2.2), aber diese Wirkung war statistisch nicht signifikant und das entspricht den Ergebnissen der Humanmedizin und anderer Tierversuche.

4.2.3.2. Entzündungshemmer

4.2.3.2.1. Glukokortikoide

Asthma bronchiale basiert auf einem entzündlichen Prozess. Glukokortikoide sind zur Zeit die wichtigste antientzündliche Wirkstoffgruppe. In einem Tiermodell für Asthma sollten entzündungshemmende Substanzen und vor allem Glukokortikoide untersucht werden können. Andererseits könnten die Untersuchungen von Glukokortikoide in Tiermodellen zur Klärung der komplexen Wirkmechanismen der Glukokortikoide beitragen. Es ist aber nicht leicht, die Wirkung von Glukokortikoiden mit einer Hemmung der Bronchokonstriktion in einem Meerschweinchenmodell zu zeigen (Goadby und Smith 1964, Hicks 1970, Forsberg und Sörenby

1981, Heuer et al 1996). Einige Forscher vertraten die Ansicht, dass Meerschweinchen besonders resistent und unempfindlich gegen Glukokortikoide sind (Hodgson and Funder 1978, Giannopoulos and Keichline 1981). Die geringe Empfindlichkeit der Meerschweinchen gegen Glukokortikoide ist allgemein bekannt (Claman 1975, Hashimoto et al 1993, Heuer et al 1996). Trotzdem konnte inzwischen in mehreren Meerschweinchenmodellen die protektive Wirkung von Glukokortikoiden bei verzögerter asthmatischer Reaktion demonstriert werden (Andersson et al 1988, Hutson et al 1988, Hoshino et al 1989, Thorne und Karol 1989, Matsumoto et al 1994, Ikegamie et al 1997). Die Wirkung von Glukokortikoide bei der asthmatischen Sofortreaktion ist schwer zu beobachten. Die asthmatische Sofortreaktion ist bei Mensch und Meerschweinchen vor allem histaminvermittelt. Leukotriene C₄, Prostaglandine D₂ und PAF sind auch teilweise am akuten Asthmaanfall beteiligt. Man konnte oft bei Glukokortikoiden keine Wirkung bei der Sofortreaktion beim Menschen und Meerschweinchen finden (Cockcroft and Murdok 1987, Chand 1990, Heuer 1996, Ikegami 1997, Suda et al 1992, Matsumoto et al 1994). Die protektive Wirkung von Glukokortikoiden während der Sofortreaktion bei Meerschweinchen konnte nur dann beobachtet werden, wenn die Zeit zwischen der Glukokortikoid-Behandlung und Allergen-Exposition lang genug war und/oder eine Sensibilisierungsmethode mit sehr niedriger Dosis Allergen und Adsorbens gewählt wurde, damit die asthmatische Reaktion außer IgG auch durch IgE vermittelt wird (Andersson et al 1982, Andersson et al 1988, Iwama et al 1991), oder Glukokortikoide sehr hochdosiert (100mg/kg Methylprednisolon i.v. oder 10 mg/kg Dexamethason i.v.) verabreicht wurden (Hashimoto et al 1993). Die klinischen Untersuchungen haben gezeigt, dass erst nach Langzeitapplikation von Glukokortikoide die maximale Besserung der Symptome auftritt (Kraan et al 1988, Barnes 1990). Es wurde bis jetzt **noch keine Langzeitapplikation von Glukokortikoide am Meerschweinchen** durchgeführt, um die Besserung der Symptome bei akutem asthmatischem Anfall zu beobachten. In dieser Arbeit wurde die **Wirkung eines systemischen (Methylprednisolon) und eines inhalativen Steroids (Budesonid) nach Langzeitapplikation im Meerschweinchenmodell untersucht**, um 1. die Ergebnisse der Untersuchungen der antientzündlichen Wirkung im Meerschweinchenmodell mit den Ergebnissen der klinischen Untersuchungen zu vergleichen; 2. die geringe Empfindlichkeit der Meerschweinchen gegen Glukokortikoide möglichst zu kompensieren und 3. die maximale Wirkung von Glukokortikoide zu dokumentieren.

Nach täglicher **oralen** Gabe von **20 mg Methylprednisolon** und **wöchentlicher** Allergen-Exposition und nach Sensibilisierungsmethode 1 tritt die **signifikante Wirkung mit 52,5% Hemmung der Bronchokonstriktion erst nach zwei Wochen Applikation auf** (siehe 4.2.1.2.1.1). Später ist die Inhibition der bronchialen Obstruktion nicht mehr signifikant, obwohl die Verumgruppe weiter eine geringere Bronchokonstriktion zeigt. Jedoch nimmt auch die Reaktionsstärke der Kontrollgruppe ab, so dass die Differenz zwischen Kontroll- und Verumgruppe für eine statistisch signifikante Aussage zu klein wird. Die ständig abfallende Reaktionsstärke der Kontroll- und Verumgruppen wird durch Sensibilisierungsmethode 1 verursacht. Bei der Sensibilisierungsmethode 2 hätten die Tiere noch in der 3. und 4. Woche stark genug reagiert. In diesem Fall könnte man beurteilen, ob die Wirkung von Methylprednisolon in der 3. und 4. Woche wirklich nachgelassen hat.

Bei **topischer** Applikation von ca. **23 µg Budesonid tritt die signifikante Inhibition der Bronchokonstriktion erwartungsgemäß langsamer auf (erst nach 3 Wochen Applikation)** als bei systemisch eingesetztem Methylprednisolon (siehe 4.2.1.2.1.2). Das entspricht den Verhältnissen in der Humanmedizin. **Bei Erhöhung der Budesoniddosis auf 100 µg/kg tritt die signifikante Wirkung jedoch schneller (nach zwei Wochen Applikation) auf** und hält auch nach drei Wochen Applikation noch an (siehe 4.2.1.2.1.2). Die Tiere waren bei Budesonid-Versuchen mit der Methode 2 sensibilisiert. **Diese Resultate entsprechen den klinischen Untersuchungen**, wobei die maximale Hemmung der Symptome erst nach Langzeitapplikation von Glukokortikoiden auftritt. Unsere Ergebnisse widersprechen anderen Arbeiten, die eine inhibitorische Wirkung von Glukokortikoide bei asthmatischer Sofortreaktion am Meerschweinchen nicht nachweisen konnten. Der Grund ist in der von uns erstmals gewählten Applikation über einen Zeitraum von mehreren Wochen zu sehen.

4.2.3.2.2. Antileukotriene

4.2.3.2.2.1. Montelukast

Der Entzündungsprozess in den Atemwegen wird bei Asthma durch verschiedene Entzündungszellen und Mediatoren vermittelt. Leukotriene sind eine der wichtigsten Mediatoren

des Asthma bronchiale. Die Aktivität der Leukotriene als sog. Slow-Reacting-Substance of Anaphylaxis (SRS-A) wurde vor 60 Jahren entdeckt. Nach der Strukturaufklärung in den 70er Jahren stehen heute spezifische Medikamente zur Verfügung, die in der Lage sind, die Wirkung dieser Leukotriene selektiv zu hemmen. Antileukotriene sind entweder Leukotriensynthesehemmer (5-LO-Inhibitoren und Antagonisten des 5-LO-aktivierenden Proteins) oder Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten (LT-RA). Die momentan bekannten LT-RA richten sich gegen die Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptoren und vor allem CysLT1-Rezeptoren. Montelukast ist ein sehr potenter und hoch selektiver LTD₄- aber nicht LTC₄- oder LTB₄-Rezeptorantagonist bei Meerschweinchen, Schaf, Affe, Ratte und Mensch (Jones et al 1995). Die *in vitro* Rezeptorbindungsstudien und quantitativen pharmakologischen Studien demonstrieren, dass Montelukast wie Zafirlukast, Pobilukast und Pranlukast die CysLT1-Rezeptoren im Meerschweinchen- und Human-Lungenzellmembran blockieren und damit die Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur inhibieren (Aharony 1998, Aharony und Krell 1991, Aharony und Flacone 1989, Krell et al 1990, Jones et al 1995, Obata et al 1992).

In einigen Arbeiten wurde der Effekt von verschiedenen LT-Rezeptor-Antagonisten auf Antigen- und Leukotriene-induzierte Bronchokonstriktion untersucht. Zafirlukast und Montelukast inhibieren die LTD₄- und LTE₄-induzierte Bronchokonstriktion. Sie hemmen aber keine LTC₄, Serotonin, Acetylcholin, Histamin, Prostaglandin D₂ und Arachidonsäure vermittelte Bronchokonstriktion (Jones et al 1995, Aharony 1998). Zafirlukast und Montelukast hemmen die durch LTD₄ und LTE₄ vermittelte Kontraktion der isolierten Luftröhre der Meerschweinchen (Aharony 1998, Jones et al 1995). Die Wirkung von Zafirlukast wurde an sensibilisierten Meerschweinchen nach OA-Exposition getestet. Die Tiere waren mit Indometacin, Pyrilamin und Propranol behandelt, um die Prostanoid-, Histamin- und β -sympathomimetisch-vermittelten Effekte zu blockieren und die Antigen-induzierten Bronchospasmen zu maximieren. Zafirlukast, gegeben i.v. 35 Minuten vor Antigenexposition, zeigte eine signifikante Inhibition der durch OA-induzierten Reaktion. Ebenso veranlasste die i.v. Gabe von Zafirlukast nach Allergenbelastung eine schnellere Rückkehr der normalen pulmonalen Parameter im Vergleich zu den Kontrollmeerschweinchen. Im übrigen inhibiert Zafirlukast die Antigen-vermittelte verzögerte Bronchokonstriktion (Aharony 1998). Die hohe orale Dosis von Pranlukast reduziert signifikant die sofortige und verzögerte Bronchokonstriktion nach OA-Provokation bei sensibilisierten Meerschweinchen (Nakagawa et al 1993). Montelukast und Zafirlukast zeigten beim Schaf eine

signifikante Hemmung der sofort und verzögert auftretenden Bronchokonstriktion (Abraham 1996, Jones et al 1995). Montelukast wurde in vivo außer beim Schaf, bei der Ratte und auch bei nicht-narkotisierten Affen, nicht aber bei nicht-narkotisierten Meerschweinchen auf seine inhibitorische Wirkung auf sofortige und verzögerte Bronchokonstriktion untersucht. Überall war eine signifikante Hemmung zu verzeichnen (Jones et al 1995).

In dieser Arbeit wurde **Montelukast** als modernes Asthmamittel **zum ersten Mal in einem in vivo Meerschweinchenmodell bei Allergen-induzierter asthmatischer Bronchokonstriktion untersucht** und seine Wirkung mit bekannten Asthmamittel verglichen (siehe 4.2.1.2.2). Montelukast zeigt nach oraler Verabreichung (0,5 mg/kg) eine Stunde vor Allergenexposition eine 23,88%ige Hemmung der OA-induzierten Bronchokonstriktion, die nicht signifikant ist. Die orale Therapie über drei Tage hat zum gleichen Ergebnis geführt. **Erst bei täglicher oraler Behandlung der Tiere mit 0,5 mg/kg ist nach zwei Wochen Applikation eine signifikante Inhibition (58,12%) der OA-induzierten Bronchokonstriktion zu sehen**. Die Ergebnisse stimmen mit unseren Glukokortikoid-Ergebnissen überein, sie passen aber nicht zu den Ergebnissen von Fenoterol und Theophyllin. Montelukast verhält sich somit in unserem Tiermodell wie ein Entzündungshemmer. Es ist als Zusatzbehandlung additiv zu β -Sympathomimetika und Glukokortikoide in der Humanmedizin zugelassen und soll den Bedarf an diesen Medikamenten reduzieren. Die nur leichte Verbesserung der Lungenfunktion bei einmaliger Applikation und drei Tage Behandlung zeigen die antagonistische Wirkung gegen eine der vielen Entzündungsmediatoren, die am asthmatischen Geschehen beteiligt sind. Es wurde auch in anderen Arbeiten gezeigt, dass LT-RA einen Teil der Antigen-induzierten Bronchokonstriktion verhindern können (Funayama et al 1996, Britton et al 1987, Fuller et al 1989). Die positive Wirkung von Zafirlukast nach einmaliger Applikation wurde bei i.v. Gabe erst nach Blockade der Prostanoid-, Histamin- und β -mimetisch-vermittelten Effekte und damit Maximierung der Antigen-provozierten Bronchokonstriktion beobachtet (Aharony 1998). Die inhibitorische Wirkung von Pranlukast bei OA-induzierter Bronchokonstriktion wird erst bei sehr hoher oraler Dosis (30-100 mg/kg) erreicht (Nakagawa et al 1992).

Die Ergebnisse unserer Studien zeigen Parallelen zwischen den Effekten von β -Sympatomimetika, Methylxanthinen, Glukokortikoiden und Leukotrienrezeptorantagonisten bei der Antigen-induzierten Bronchokonstriktion in

unserem Meerschweinchenmodell und den klinischen Effekten dieser Substanzen beim Asthma des Menschen (Burge et al 1982, Cockcroft and Murdock 1987, Pauwels et al 1985, Kraan et al 1988, Barnes 1990). Dies zeigt, dass dieses Meerschweinchenmodell *ein zuverlässiges Tiermodell* zur Abschätzung broncho dilatatorischer und entzündungshemmender Effekte auch von neuen Wirkstoffen ist.

4.3. Untersuchungen von traditionellen Drogen

4.3.1 Drogen der traditionellen Volksmedizin

Neben den etablierten Antiasthmatika werden in der traditionellen Volksmedizin verschiedener Länder heute noch Pflanzen und daraus hergestellte Extrakt-Präparate zur Behandlung des Asthma bronchiale eingesetzt (Dorsch und Wagner 1991). In den wenigsten Fällen ist genau bekannt, welche Inhaltsstoffe dieser Pflanzen für die Wirksamkeit verantwortlich sind. Die Suche nach diesen Verbindungen verlangt die chemische Fraktionierung der Extrakte und Austestung der einzelnen Fraktionen mit Hilfe geeigneter pharmakologischer in vitro- und in vivo Untersuchungsmodelle. Die Suche ist sinnvoll und notwendig, da unter Umständen noch wirksamere Wirkstoffe aufgefunden werden können, die zudem vielleicht weniger Nebenwirkungen besitzen und eine bessere Compliance bei den Patienten finden. In den Fällen, in denen die aufgefundenen Verbindungen den Standardsubstanzen an Wirksamkeit nicht überlegen sind, kann außerdem versucht werden, deren Strukturen chemisch abzuwandeln, um auf diese Weise deren Wirksamkeit zu optimieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nachstehende Drogen für eine Untersuchung nach Langzeitapplikation ausgewählt: Picrorhiza kurroa, Angurate (*Mentzelia grandiflora*, *Mentzelia cordifolia* Domba), Caiophora sepiara, Wascha (*Dorema ammoniacum don*). Die Langzeitapplikation wurde gewählt, da sich bei den bekannten Entzündungshemmern, den Glukokortikoiden und Leukotrienrezeptorantagonisten, die Wirkungen in unserem Tiermodell auch erst nach einigen Wochen gezeigt hatten. Von den Drogen waren die meisten bereits im medikamentösen Einsatz in der Volksmedizin unter anderem bei Lungenerkrankung. Einige wie z.B. Wascha (*Dorema ammoniacum don*) waren bislang noch ziemlich unbekannt und daher auch pharmazeutisch noch nicht untersucht worden. Das gleiche gilt für Angurate (*Mentzelia grandiflora*) und *Caiophora sepiara*. Die letzten gehören zur Familie der Loasaceae, die nach den neusten chemotaxonomischen Untersuchungen als Marker der Familie Iridoidglykoside enthalten (Müller et al 1999). Iridoide sind meist verbreitet auch in den Familien der Scrophulariaceae, Oleaceae, Pedaliaceae und Myoporaceae (Wichtel 1997). Iridoide sind Monoterpene, die sich vom Iridodial ableiten und die erstmals im Abwehrsekret von Ameisen gefunden wurden (Wagner 1993). Bisher wurden für Iridoide in erster Linie Wirkungen auf die Verdauungsorgane gefunden (Del Carmen Recio et al 1994). Einige Iridoide wie z.B. das

Harpagorsid von *Harpagophytum procumbens* (Pedaliaceae) wirkt auch antiinflammatorisch. Bekannte Iridoide wie z.B. das Loganin und die Loganinsäure zeigten ebenfalls eine antiinflammatorische Wirksamkeit (Del Carmen Recio et al 1994). Iridoide wirken außerdem schmerzstillend, krampflösend, antineoplastisch und antiviral. Toxisch wirken Iridoide nur bei sehr hohen Dosen (Yamano et al 1988). Damit waren ideale Voraussetzungen gegeben, mit dieser Stoffklasse zu beginnen. Anschließend untersuchten wir die Droge Wascha und schließlich die verschiedenen Acetophenonverbindungen, von denen Dorsch et al (1989, 91,94) einige bereits untersucht hatten.

4.3.1.1 *Picrorhiza kurroa*

Picrorhiza Kurroa - eine Pflanze aus der indischen Erfahrungsmedizin

Royle ex Benth, eine kleine, mit dichten Stacheln besetzte Krautpflanze mit knollenartigen, winterharten Wurzeln wächst im Himalayagebiet Indiens und Pakistans in einer Höhe von 3000 bis 5000 m. Sie gehört zu der Familie der Scrophulariaceae (Lal et al 1988, Polumin 1984, Updhyay et al 1989). *Picrorhiza kurroa* enthält drei **Iridoidglykoside**: Veronikosid, Minekosid und 6-Feruloylcatalpol und zwei **Phenolglykoside mit Acetophenon-Grundgerüst: Picein und Androsin** (Stuppner und Wagner 1989). Nach Hydrolyse von Androsin entsteht **Apocynin**, das Aglycon von Androsin. In der ayurvedischen Medizin wird dieses Heilkraut insbesondere bei Asthma und Bronchitis verwendet. Darüber hinaus wird es bei chronischen Durchfallerkrankungen und arthritischen Beschwerden eingesetzt (Atal et al 1986, Dorsch und Wagner 1991, Langer et al 1981, Mahajani-Kulkarni 1977, Mogre et al 1981, Dey 1980). Eine antipyretische, verdauungs- und durchblutungsfördernde (Updhyay et al 1989) und eine fungizide (Lorimer-Perry 1944) Wirkung werden außerdem in der Literatur beschrieben. In der ayurvedischen Medizin ist die meist angewendete Applikationsweise eine Wassersuspension der pulverisierten Wurzel (Majumbar 1978), die entweder direkt oder nach Abkochung eingenommen wird. Auf diese Weise werden die hydrophilen und die lipophilen Wirkstoffe zusammen erfaßt (Simons et al 1990).

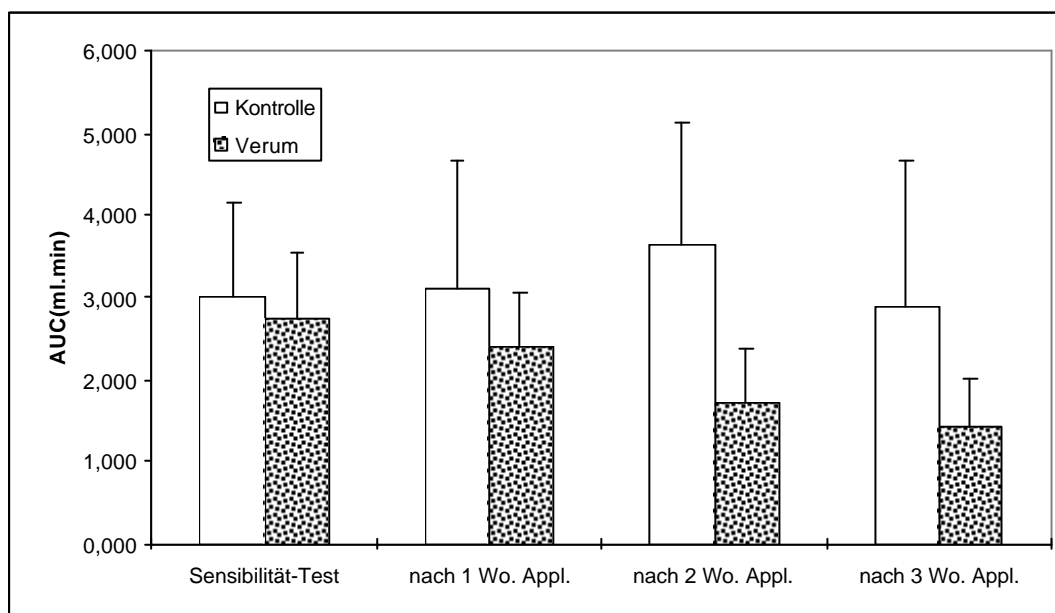


Abb. 37: *Picrorhiza kurroa*

Das Pulver der Wurzeln wurde in den 70er Jahren von indischen Wissenschaftlern in klinischen und tierexperimentellen Versuchen auf seine Wirksamkeit bei Asthma bronchiale getestet (Mahajani-Kulkarni 1977, Rajaram 1974, Langer et al 1981). In klinischen Versuchen konnte durch die Gabe von *Picrorhiza kurroa* eine Besserung des Asthma bei den behandelten Patienten erzielt werden. Interessanterweise wurden auch die Symptome anderer Autoimmunkrankheiten, wie rheumatische Beschwerden, Psoriasis, Vitiligo oder peptische Ulzera gelindert (Lewis 1989). In Tierversuchen mit Meerschweinchen wurde gefunden, dass das Pulver der Wurzel den bronchodilatatorischen Effekt der Katecholamine steigert und die Histaminausschüttung in der Lunge herabsetzt (Mahajani-Kulkarni 1977, Langer et al 1981, Mogre et al 1981, Mahajani-Kulkarni 1979, Pandy-Das 1988). In einer anderen Versuchsreihe mit Lebergewebe der Ratte konnte ein hepatoprotektiver Effekt nachgewiesen werden (Morge et al 1981, Stuppner-Wagner 1989).

Im Prototypen von Zweikammerganzkörperplethysmographen nach Dorsch konnte nach oraler Applikation von 100mg/kg *Picrorhiza kurroa*-Ethylacetatfraktion 60 Minuten vor Ovalbumin- und PAF-Provokation eine signifikante asthmaprotektive Wirkung (bei OA: 73%- und bei PAF: 56% -Inhibition) beobachtet werden (Gropp M. 1993).

In unseren Versuchen konnte durch 3-wöchige **Vorbehandlung mit einer täglichen oralen Applikation von 200 mg/kg Ethylacetat-Extrakt nach zwei Wochen eine signifikante Verminderung des OA-induzierten Asthma erzielt werden** Die prozentuale Inhibition lag bei **52,7%**. Nach drei Wochen Applikation betrug die Hemmung 50,8%, war statistisch aber nicht mehr signifikant (siehe Abbildung 38 und 39). Die verwendeten Tiere waren nach Methode 2 sensibilisiert worden.



Test	Sensi.	1Wo.Appl.	2Wo.Appl	3Wo.Appl
Signifikanzniveau $p < 0.05$	n. signif	n. signif	signifikant	n. signif
Inhibition(%)	8,5	23,1	52,7	50,8

Abb. 38: Reaktionsverlauf nach 1x täglicher oraler Applikation von 200 mg/kg *Picrorhiza kurroa* (Ethylacetatextrakt) und wöchentlichem Provokationstest; OA - Provokation (0,2%); $n_c = 6$, $n_v = 7$; (AUC(MW)±SD)

Picrorhiza kurroa

Provokationstest nach 2 Wochen Appl. 200mg Extrakt/kg oral, 1xtgl. nc=6,nv=7

OA-Provokation (0,2%) : (x +/- SD)

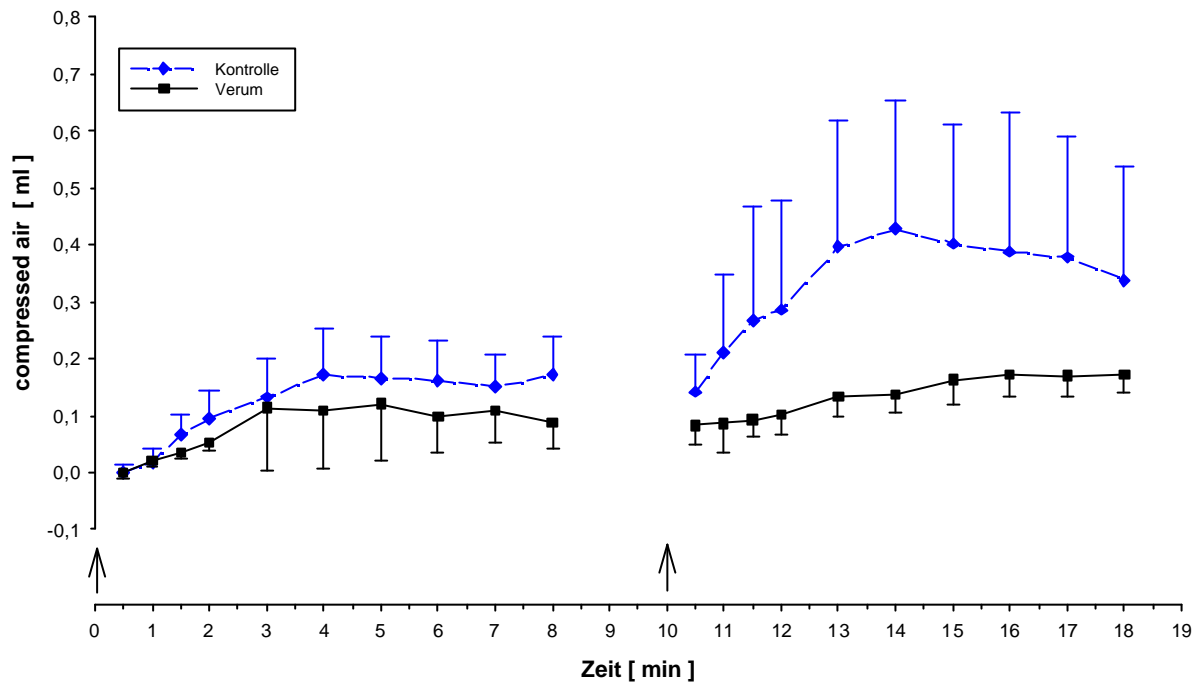


Abb. 39

4.3.1.2. Wascha (Gummiharz von „*Dorema ammoniacum* D. Don.“)

Wascha (Ammoniakgummi) ist ein **Gummiharz der Pflanze *Dorema ammoniacum* D. Don.** (Ammoniakpflanze) – Apiaceae. Eine große Zahl von Apiaceaeen-Pflanzen der asiatischen Steppen produziert in den schizogenen Exkretkanälen von Wurzeln und Stengeln sogenannte Gummiharze (Schleim + Harz + Ätherisches Öl).

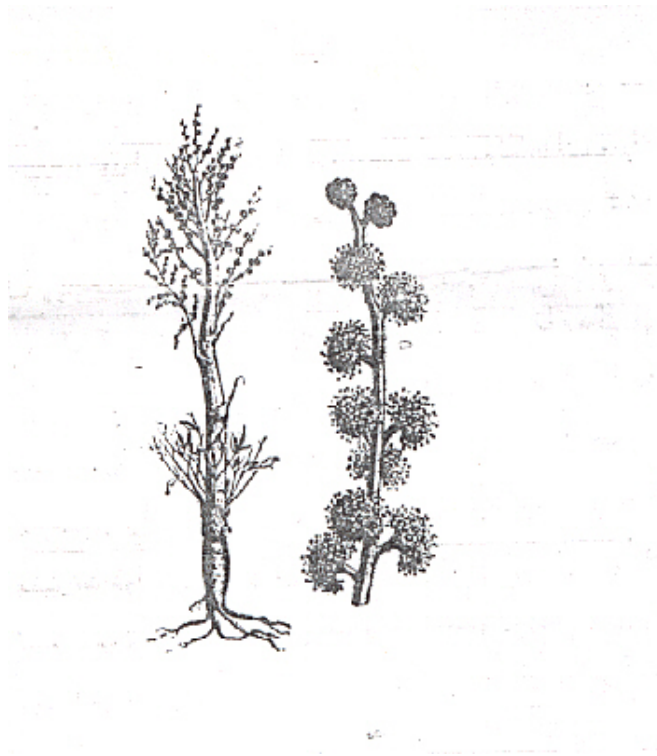


Abb. 40: *Dorema ammoniacum* D. Don.

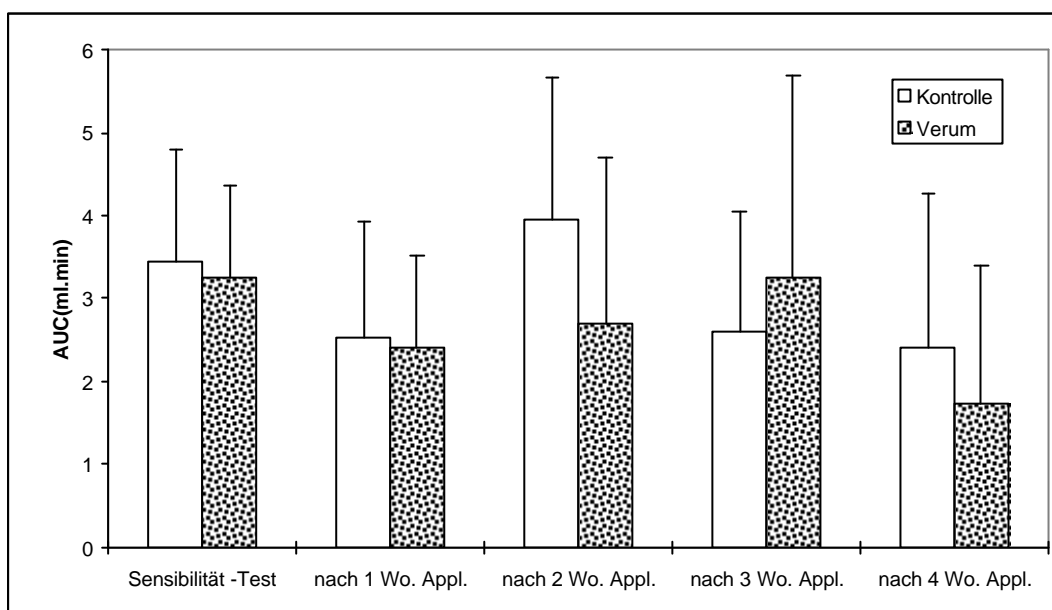
Nach Hegnauer (1973) liefern Pflanzen der Gattung Dorema und Ferula die medizinisch verwendeten Gummiharze. Die Gummiharze werden in der Volksmedizin des Irans, Indiens und in den arabischen Ländern eingesetzt. Die Pflanze *Dorema ammoniacum* D. Don., eine ausdauernde Krautpflanze, wächst im mittleren und südöstlichen Teil Irans. Wascha tritt aus den angeritzten Stengeln der Pflanze aus und trocknet kugelförmig/tropfenförmig an den Stengeln oder sammelt sich als amorphes, klumpiges Produkt am Fuß der Pflanze. Das tropfenförmige Gummiharz ist reiner als die amorphe Form, da keine Fremdstoffe beigemischt sind. Wascha sieht weiß bis hellbraun aus und gibt in Wasser eine milchartige Suspension. Die Droge hat einen

milden aber eigenartigen Geruch, schmeckt bitter und übelkeiterregend. „Wascha“ löst sich in Ethanol und Essig besser als in Wasser, erreicht aber in 22%igem Ethanol die beste Löslichkeit. Die Gummiharze enthalten Schleim, Harz und wechselnde Mengen ätherischen Öls. Im Harzanteil kommen strukturell komplexe Cumarine vom Typus der Farnesiferole und Ammoresinole vor. Erstere sind Ether der Umbelliferons mit aliphatischen, monocyclischen oder bicyclischen Farnesolderivaten, letztere gehören in die Klasse der sesquiterpensubstituierte Cumarine (Hegnauer 1973). Wascha setzt sich aus 69% Harzanteil und 22% Schleim, sehr niedriger Menge Salicylsäure und 2% bis 12% Wasser (Sargar 1989) zusammen. Das Schleimpolysaccharid enthält Galaktose, Arabinose, Rhamnose und Uronsäure im Verhältnis 12:5:2:3. Der Uronsäureanteil besteht aus Glucuronsäure und 4-O-Methylglucuronsäure (Hegnauer 1973 und Guarnieri et al 1970).

Die Droge wird in der Volksmedizin Irans als Schleimlöser und Abführmittel eingesetzt. In Form von Umschlägen wird sie bei Asthma und Tumorentzündungen verwendet (Aynehchi 1986). Wascha wird ausserdem bei Asthma und chronischer Bronchitis sowie als Tonikum eingesetzt (Sargar 1989). Ausserdem wird sie noch bei Allergie, Hautausschlag, unreiner Haut und als Wurmmittel verwendet. Bei Atemnot und Lungenerkrankung werden 2,5 bis 5 g Wascha in Wasser gelöst und mit Honig getrunken. Wascha mit Honig soll auch eine schleimlösende Wirkung haben und zusammen mit abgekochter Gerste bei Lungenerkrankungen wirksam sein. Eine Überdosis kann für Magen und Nieren schädlich sein. Beim Nesselausschlag wird Wascha getrunken oder zu Umschlägen verwendet.

4.3.1.2.1. Wascha [70 mg/kg]

Wascha - gelöst in 20%igem Ethanol - wurde **4 Wochen lang 1x täglich 70 mg/kg oral** appliziert. **Keiner der vier wöchentlichen OA-Belastungsteste zeigte einen signifikanten Unterschied** zwischen der Verum- und Kontrollgruppe. Die prozentuale Inhibition beim 1. bis 4. Provokationstest betrug: 4,2%, 31,5%, -24,2%, 2,1% (siehe Abbildung 41 und 42). Hier hat es den Anschein, dass die Dosierung nicht ausreichend war. (Sensibilisierungsmethode 2)



Test	Sensi.	1Wo.Appl.	2Wo.Appl	3Wo.Appl	4Wo.Appl
Signif.-niveau $p < 0,05$	n. signif	n. signif	n. signif	n. signif	n. signif
Inhibition(%)	5,7	4,2	31,5	-24,2	28,1

Abb. 41: Reaktionsverlauf nach 1x täglicher oraler Applikation von 70 mg/kg Wascha (*Dorema Ammuniakum*), suspendiert in 20%ige Ethanolösung und wöchentlichem Provokationstest; OA -Provokation(0,2%); $n_c = n_v = 6$; (AUC(MW) \pm SD)

Wascha (Gummiharz von Dorema ammoniacum)

Provokationstest nach 2 Wochen Appl. 70mg/kg oral, 1xtgl. nc=nv=7

OA-Provokation (0,2%) ; (x +/- SD)

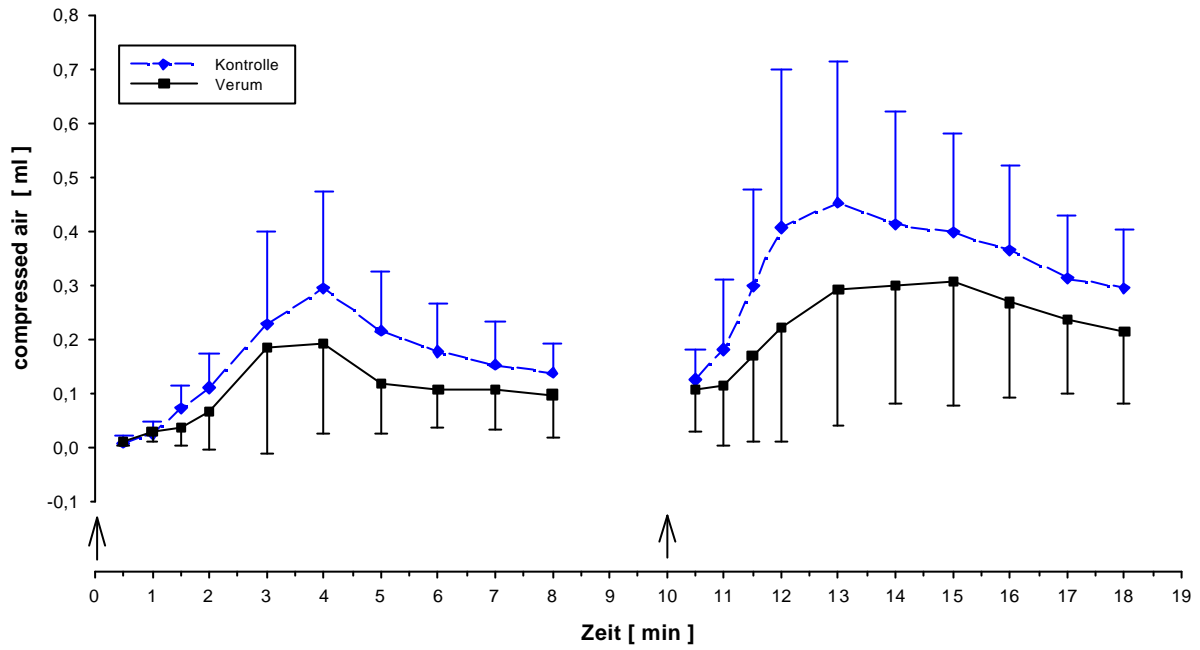
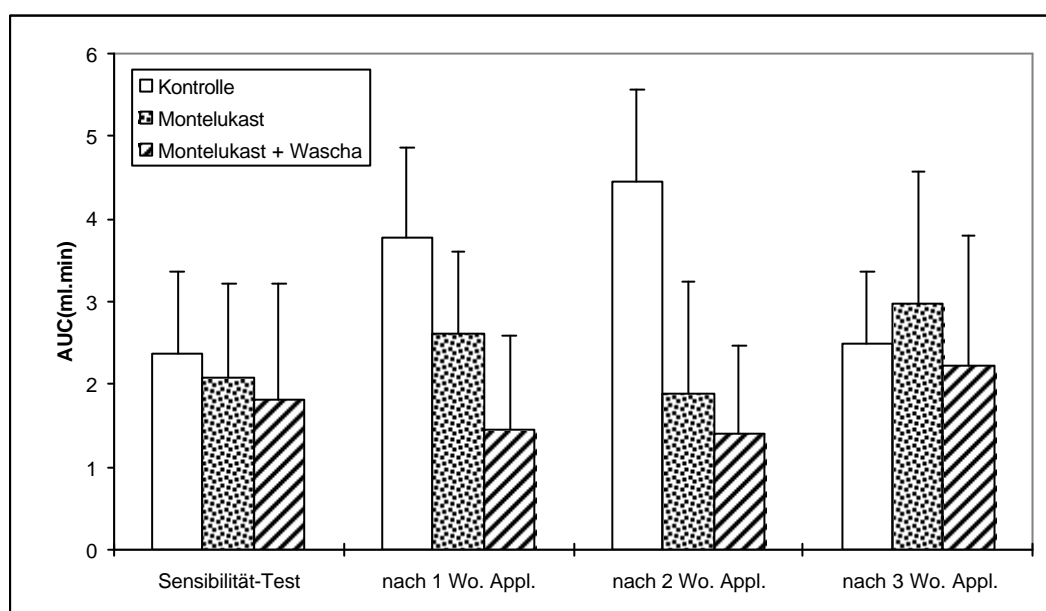


Abb. 42

4.3.1.2.2. Wascha (140 mg/kg) kombiniert mit Montelukast

Da die 70 mg/kg-Dosierung von Wascha für eine signifikante Wirkung nicht ausreichend war, haben wir in einem anderen Versuch die Dosierung verdoppelt. Hier wurde von Anfang an die Kombination mit Montelukast gewählt, um eine eventuelle antiasthmatische Wirkung noch sicherer nachweisen zu können.

Einer Tiergruppe wurden **3 Wochen lang 1x täglich oral 0,5 mg/kg Montelukast und 2 Stunden später 140 mg/kg Wascha** (*Dorema Ammoniacum*) - gelöst in 20%ige Ethanol - appliziert. **Nach einer Woche** war eine signifikante Hemmung der OA-induzierten asthmatischen



Test Montelukast	Sensi.	1Wo.Appl.	2Wo.Appl	3Wo.Appl
Signifikanzniveau $p < ,05$	n. signif	n. signif	Signifikant	n. signif
Inhibition(%)	12,8	30,7	57,6	-19,6
Test Montelukast + Wascha				
Signifikanzniveau $p < ,05$	n. signif	signifikant	Signifikant	n. signif
Inhibition(%)	23,6	61,7	68,6	10,2

Abb. 43: Reaktionsverlauf nach 1x täglicher oraler Applikation von: 1.) Kontrolllösung 2.) 0,5 mg/kg Montelukast 3.) 0,5 mg/kg Montelukast und 2 Stunden später 140mg/kg Wascha suspendiert in 20%ige Ethanollösung und wöchentlichem Provokationstest; OA-Provokation(0,2%); $n_c = n_v = 6$; (AUC(MW)±SD)

Wascha + Montelukast

Provokationstest nach 2 Wochen Appl., 0,5mg/kg Montelukast u. 2h später 140mg/kg Wascha.

oral 1xtgl. nc=nv=6. OA-Provokation (0,2%) ; (x +/- SD)

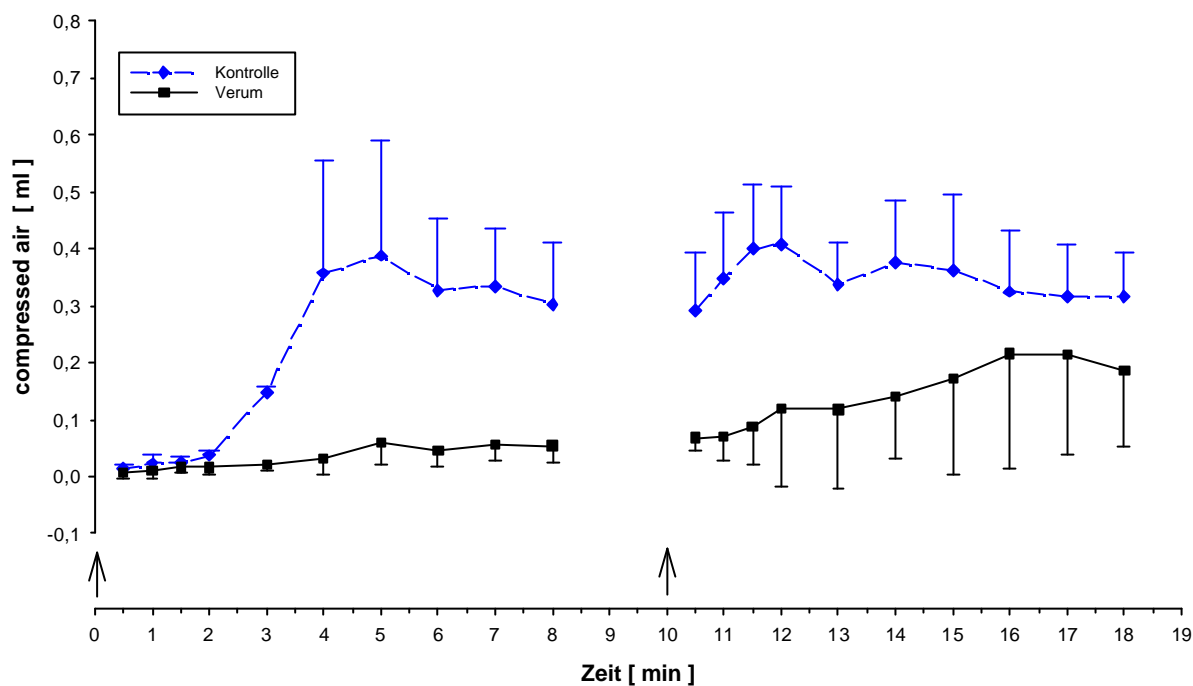


Abb. 44

Reaktivität (**61,7%**) zu sehen. Diese Kombination zeigte **nach zwei Wochen eine noch stärkere signifikante Inhibition (68,6%)**. Im Vergleich zu Montelukast als Monopräparat, das nach einer Woche eine 30,7%ige aber nicht signifikante Wirkung und nach 2 Wochen eine signifikante Hemmung von 57,6% zeigte, ist beim Kombinationspräparat **eine deutliche synergistische Wirkung erkennbar** (siehe Abbildung 43 und 44). (Sensibilisierungsmethode 2)

4.3.1.3. *Caiophora sepiara*

Die einjährige bis ausdauernde, krautige Kletterpflanze, gehört zur Gattung *Caiophora* und Unterfamilie Loasoideae der Familie Loasaceae. Die Gattung *Caiophora* umfasst ca. 30-50 Arten, deren Hauptverbreitungsgebiet in Südamerika in den Höhenlagen der Anden liegt. In der Gattung *Caiophora* und in der ganzen Familie Loasaceae kommen Loganin und Secoxyloganin (Kaplan und Gottlieb 1982) weit verbreitet vor.



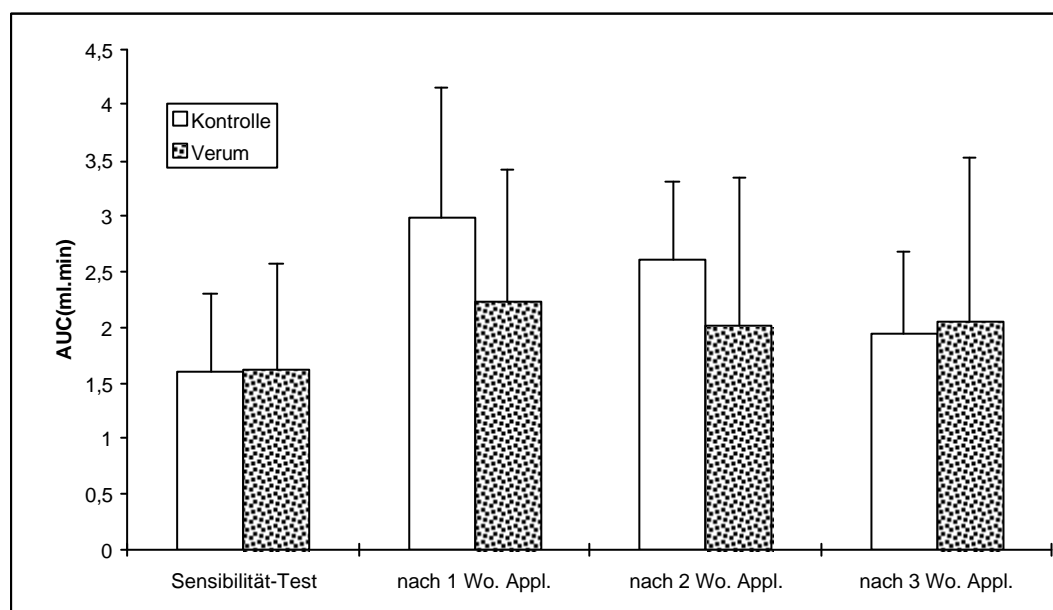
Abb. 45: *Caiophora Sepiara*

Foto: M. Weigend, Peru; Referenz: Weigend, Dostert & Driessle 97/314

Erst in neueren chemotaxonomischen Studien wurden 10-Hydroxyoleosiddimethylester und ein noch nicht identifiziertes Iridoid als Marker der Gattung *Caiophora* aufgefunden (Müller et al 1999). Außerdem kommen noch Chlorogensäure und Rutin in *Caiophora Sepiaria* vor. Obwohl die Gattung *Caiophora* und ihre systematischen Verwandten eine recht breite Anwendung in der

Volksmedizin hat, ist die Literatur über die Verwendung dieser Pflanzengruppen spärlich. Zubereitungen oberirdischer Pflanzenteile verschiedener *Caiophora*-Arten werden zur Behandlung von Rheuma, Lungenentzündung und hartnäckigem Husten innerlich angewendet (De Feo 1992). Die äusserliche Verwendung dieser Pflanzenfamilie (Loasaceae) wurde von Kneipp-Anhängern bei rheumatischen Beschwerden empfohlen (Mösbach 1992). Blätter von *Loasa tricolor* - eine Pflanzenart aus der Gattung *Loasa* und der Familie Loasaceae - werden homöopathisch verwendet (Hopp 1975).

Der Methanol-Extrakt der Droge zeigte nach 3 Wochen oraler Applikation von 100 mg/kg 1x täglich bei wöchentlichem OA-Provokationstest keine signifikante asthmaprotektive Wirkung. Die prozentuale Inhibition betrug nach einer Woche 25% und nach zwei Wochen 22,9% (siehe Abbildung 46 und 47). (Sensibilisierungsmethode 2)



Test	Sensi.	1Wo.Appl.	2Wo.Appl	3Wo.Appl
Signifikanzniveau $p < ,05$	n. signif	n. signif	n. signif	n. signif
Inhibition(%)	-0,9	25,0	22,9	-5,8

Abb. 46: Reaktionsverlauf nach 1x täglicher oraler Applikation von 100 mg/kg *Caiophora sepiara* (Methanolextrakt) und wöchentlichem Provokationstest; OA-Provokation(0,2%); $n_c = n_v = 6$; (AUC(MW)±SD)

Caiophora sepiara

Provokationstest nach 7 Tage Appl. 100mg Extrakt /kg oral, 1xtgl. nc=6, nv=7

OA-Provokation (0,2%) : (x +/- SD)

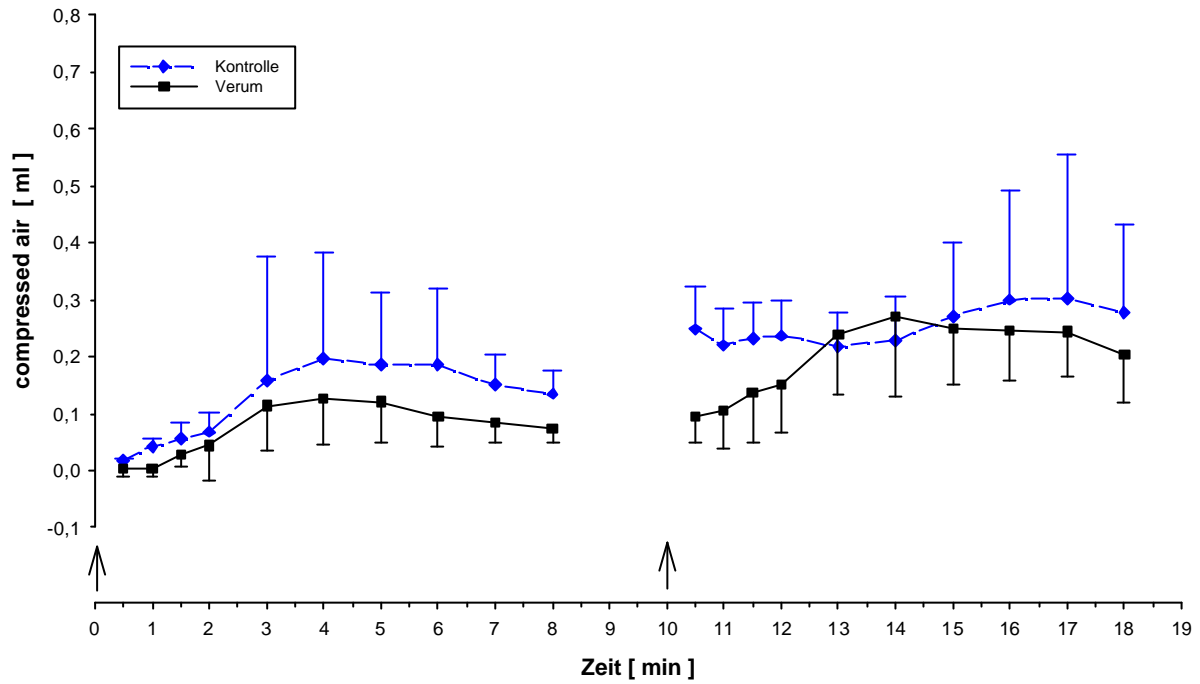
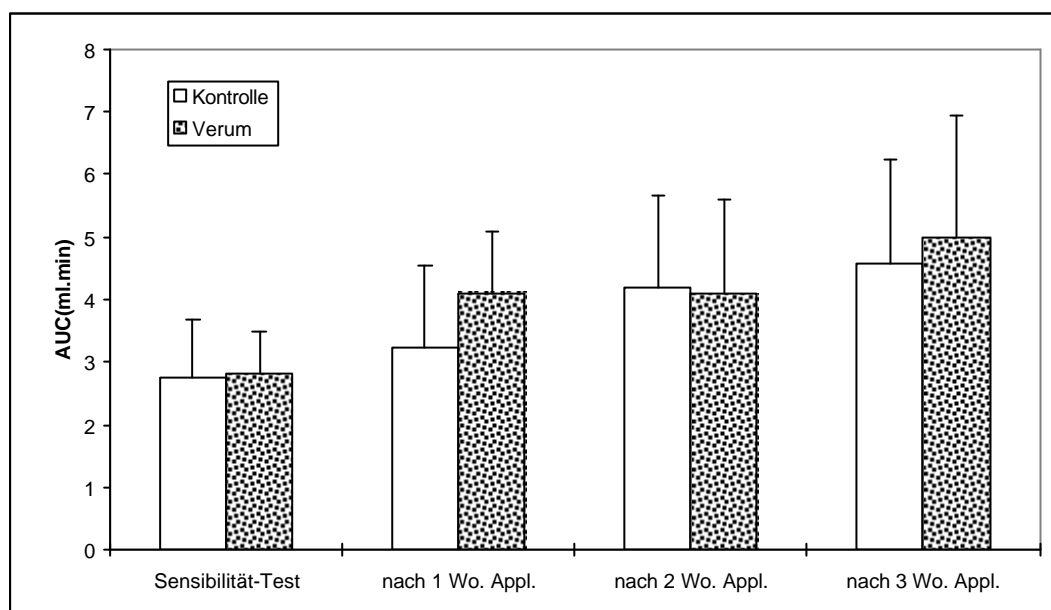


Abb. 47

4.3.1.4. Angurate (*Mentzelia grandiflora*, *Mentzelia cordifolia* Domba)

Angurate oder Anhuarate ist der Volksname für bestimmte Mentzelien aus lateinamerikanischen Ländern, vor allem aus Peru, Bolivien und Chile. Die Droge besteht aus den Zweigspitzen, Stengeln und Wurzeln der Heilpflanze *Mentzelia cordifolia* Dombey. Die ausdauernde Strauchpflanze wächst in einer Höhe von 3000 m. In der Literatur wird diese Art als *Mentzelia cordifolia* DOMB (Urban und Glg 1900) oder korrekter als *Mentzelia grandiflora* G. Don, Loasaceae benannt. Angurate (*Mentzelia grandiflora*) gehört zur Gattung *Mentzelia* und Unterfamilie Mentzelioideae der Familie Loasaceae. Phytochemische Studien zeigen, dass die Gattung *Mentzelia* durch C9-Iridoide (Müller et al 1999, Danielson et al 1973, Jensen et al 1981) und Iridoid Chlorohydrin (El Naggat et al 1982, Catalano et al 1995) charakterisiert ist. In der Gattung *Mentzelia* kommen noch weit verbreitete C10-Iridoide und Secoiridoide wie Loganin und Swerosid vor. Wie in der Volksmedizin üblich werden ähnlich aussehende Arten oft unter dem gleichen Volksname geführt. Das Handelspräparat Angurate (Teedroge aus oberirdischen Pflanzenteilen der Fa. Ronneburg Naturheilmittel) das ein Gemisch verschiedenen peruanischen Mentzelien-Arten zu sein scheint, wird als Magen-Darm-Tee eingesetzt. Angurate wird vor allem gegen Magengeschwür, aber auch als Wurmmittel und gegen Leberentzündungen verwendet (De Feo 1992). Angurate zeigte eine signifikante Besserung bei funktionellen Magen-Darm-Beschwerden Am carrageenininduzierte Rattenpfotenödem (Werner 1991). Es wurde mit dem Wasserextrakt der Droge eine deutliche entzündungshemmende Wirkung erzielt, die die Wirkung von Indometacin übertraf (Bucar 1998). Hier wurde als aktives Prinzip das C9-Iridoid Mentzelosid (syn. Deutziosid) identifiziert.

Die antiasthmatische Wirkung von Angurate (Methanol-Extrakt) wurde über drei Wochen bei OA-Exposition untersucht. Die Meerschweinchen bekamen **oral 1x täglich 25 mg/kg Methanol-Extrakt der Droge für 3 Wochen ohne dass eine signifikante asthmaprotektive Wirkung** erhalten werden konnte (siehe Abbildung 48 und 49). (Sensibilisierungsmethode 2)



Test	Sensi.	1Wo.Appl.	2Wo.Appl	3Wo.Appl
Signifikanzniveau $p < ,05$	n. signif	n. signif	n. signif	n. signif
Inhibition(%)	-1,9	-26,3	2,6	-8,9

Abb. 48: Reaktionsverlauf nach 1x täglicher oraler Applikation von 25 mg/kg Angurate (Methanolextrakt) und wöchentlichem Provokationstest; OA -Provokation (0,2%); $n_c = n_v = 7$; (AUC(MW)±SD)

Angurate

Provokationstest nach 2 Wochen Appl. 25mg Extrakt /kg oral, 1xtgl. nc=6nv=6

OA-Provokation (0,2%) : (x +/- SD)

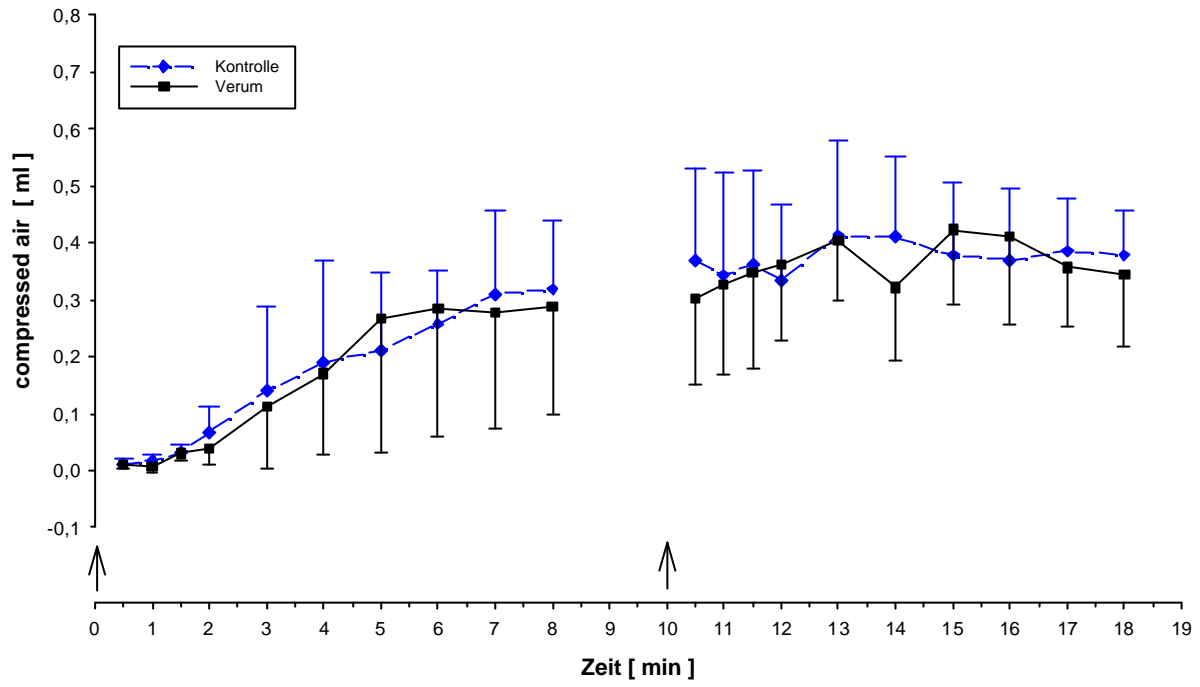


Abb. 49

4.3.2. Acetosyringenin

Acetophenone als wichtige Inhaltsstoffe der Pflanze *Picrorhiza kurroa* ; Acetosyringenin

Androsin und Picein sind die charakteristischen Acetophenone von *Picrorhiza kurroa* (Stuppner und Wagner 1989).

Androsin (4-(1- β -Glucosyloxy)-3-methoxy-acetophenon), Apocynin -Aglycon von Androsin- (4-hydroxy-3-methoxy-acetophenon) und das strukturverwandte Acetosyringenin (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-acetophenon) haben folgende Strukturformeln:

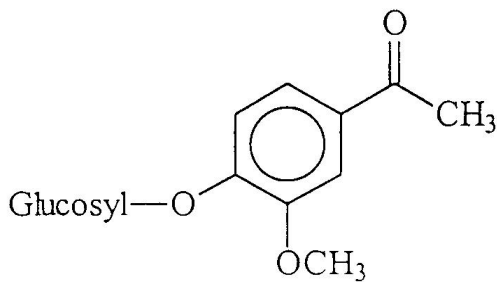


Abb. 50: Androsin

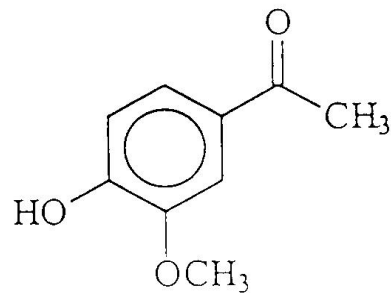


Abb. 51: Apocynin

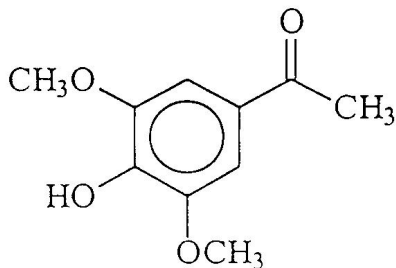


Abb. 52: Acetosyringenin

Für Apocynin ist schon früher in in vitro Untersuchungen eine antientzündliche Wirkung nachgewiesen worden. Apocynin zeigte im humanen Neutrophilenmembran eine potente inhibitorische Wirkung auf die Bildung von entzündungsinduzierenden Sauerstoffradikalen in dem es die membranständige radikalbildende NADPH-Oxidase hemmte (Simons et al 1990).

Die Thromboxan A₂-Synthese in Makrophagen von Meerschweinchenlungengewebe wird von Apocynin inhibiert; es stimuliert dabei aber die Ausschüttung von antiinflammatorischem Prostaglandin E₂. Außerdem soll Apocynin die Arachidonsäure-induzierte Aggregation von Rinderthrombozyten reduzieren, vermutlich durch die oben erwähnte Inhibition der Thromboxansynthese (Engels et al 1992).

Bischoff fand für Acetosyringenin eine 80%-ige Inhibition der Leukotrienfreisetzung aus menschlichen Basophilen bei einer Konzentration von 100 µM, während Apocynin nur eine mäßige Wirkung zeigte (Bischoff 1993). Vor allem Apocynin und 4-Hydroxyethoxy-3-methoxyacetophenon aber auch einige andere Acetophenone inhibierten in vitro die Superoxid-Anion (O²⁻)-Produktion in humanen Neutrophilen. Acetosyringenin konnte die Freisetzung des Superoxid-Anions allerdings nur mäßig hemmen (Stuppner et al 1995).

In vivo verhinderte Apocynin bei Ratten die Entwicklung einer Kollagen-induzierten Arthritis (t'Hart et al 1990). Es reduzierte die Gelenkschwellung bei behandelten Ratten nach intrakutaner Injektion von Tuberkelbakterien (t'Hart et al 1992).

Weitere Acetophenone mit Strukturverwandtschaft zu Androsin und Apocynin sind in einem erst entwickelten Modell eines Zweikammerganzkörperplethysmographen nach Dorsch untersucht worden (Dorsch et al 1994). Androsin – 0,5 mg/Tier, 30 Minuten vor Ovalbuminprovokation appliziert - ergab teilweise eine signifikante Hemmung der Bronchokonstriktion. Apocynin – 0,5 mg/Tier, 30 Minuten vor Ovalbuminprovokation appliziert – hemmte über die gesamte Provokationszeit signifikant die asthmatische Reaktion. Im allgemeinen hatten Aglycone nach OA-Provokation stärkere antiasthmatische Wirkung gezeigt als ihre entsprechenden Glukoside. **Acetosyringenin wies nach OA-Exposition die stärkste Wirkung auf.**

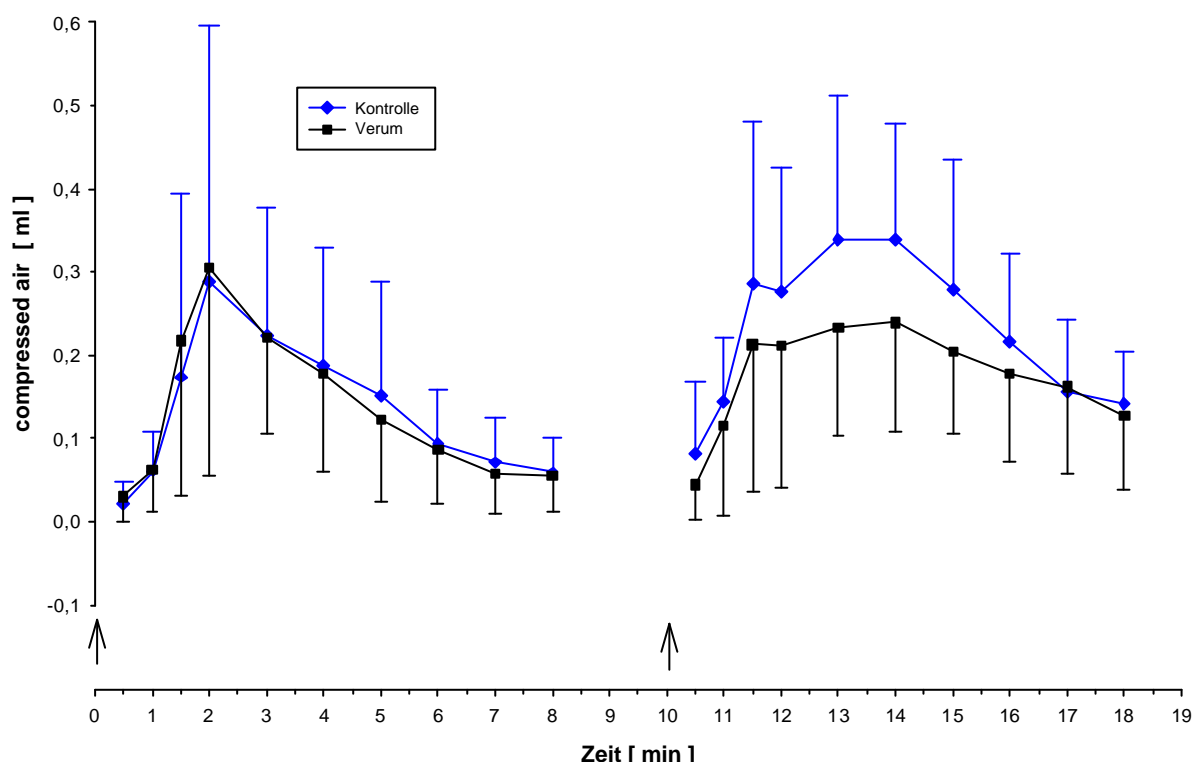
Auf Grund der positiven Literaturergebnisse wurden von uns weiterführende Untersuchungen begonnen. **Eine Reproduktion der früheren Arbeiten war schon deshalb nötig, weil sich nach dem neuen Tierschutzgesetz die Bedingungen für die Tierhaltung geändert hatten. Früher durften die Tiere in Metallkäfigen und auf Metallboden gehalten werden, während**

bei unseren Versuchen die Tiere nach Gesetz bereits auf Streu gehalten werden mussten
Zum Vergleich wurden von uns Untersuchungen bekannter Asthmamittel miteinbezogen.

4.3.2.1. Acetosyringenin-Ovalbuminexposition

4.3.2.1.1. Acetosyringenin orale Applikation (10mg/kg), 1 Stunde vor Ovalbuminprovokation

Nach einmaliger oraler Applikation von 10 mg/kg Acetosyringenin 1 Stunde vor Ovalbuminprovokation war nur eine 15,4%ige Hemmung der Bronchokonstriktion, die statistisch nicht signifikant war, zu sehen (siehe Abbildung 53). (Sensibilisierungsmethode 1)

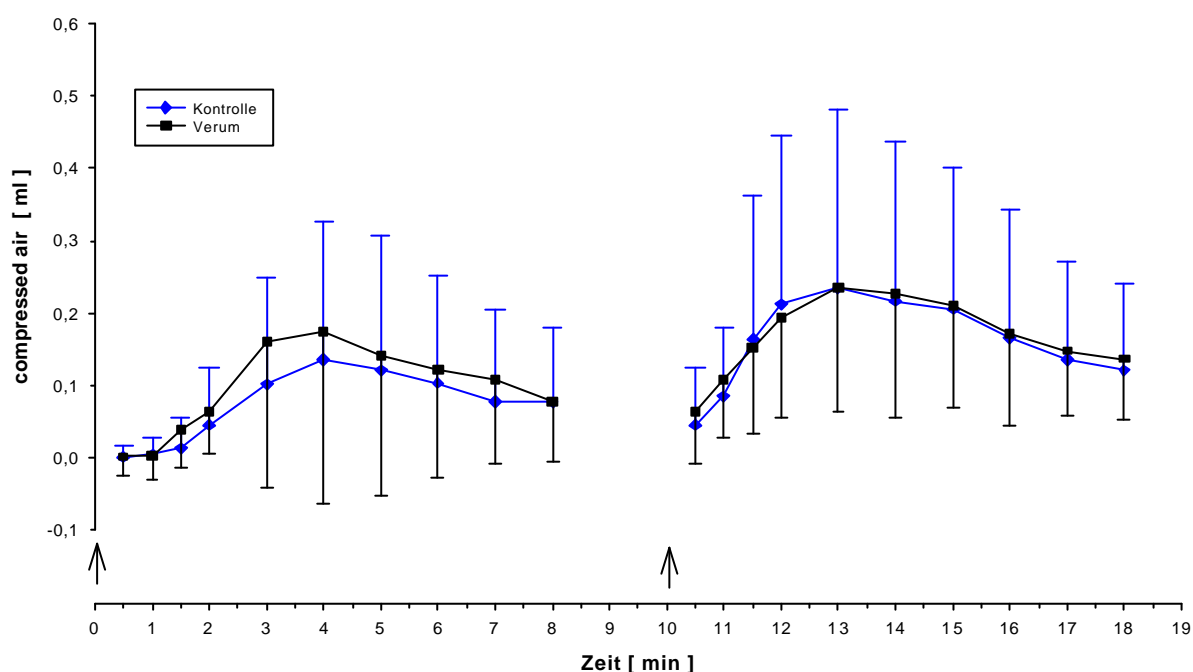


Signifikanzniveau $p < 0,05$	nicht signifik.
Prozentuale Hemmung	15,4

Abb. 53: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion nach einmaliger oraler Applikation von 10mg/kg Acetosyringenin eine Stunde vor OA-Provokation (0,2%); n=13; ($\bar{x} \pm SD$)

4.3.2.1.2. Acetosyringenin inhalative Applikation (0,5mg/Tier), 30 Minuten vor Ovalbuminprovokation

In einem zweiten Versuch wandelten wir die Versuchsanordnung ab. Nach der einmaligen **Vernebelung** von Acetosyringeninlösung (0,5% für 2 Minuten, entsprechend 0,5mg/Tier) 30 Minuten vor Ovalbuminexposition verblieb das Tier bis zur Provokation in der Kammer. Es war **keine Inhibition der Bronchokonstriktion** zu beobachten (siehe Abbildung 54). (Sensibilisierungsmethode 1)

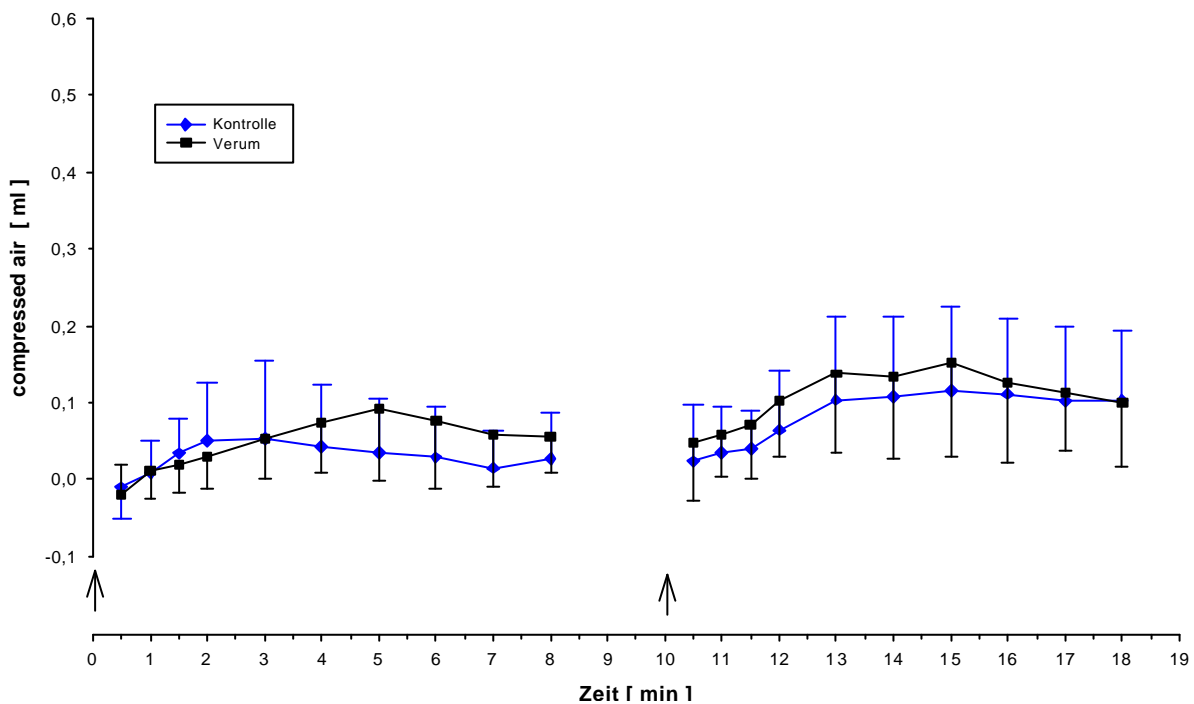


Signifikanzniveau $p < 0,05$	nicht signifik.
Prozentuale Hemmung	-11,6

Abb. 54: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach der Vernebelung von Acetosyringenin (0,5%, 1x 120 sec entspricht 0,5mg/Tier) 30 Minuten vor OA-Provokation (0,2%); n=11; ($\bar{x} \pm SD$)

4.3.2.1.3. Acetosyringenin inhalative Applikation (5mg/Tier), 30 Minuten vor Ovalbuminprovokation

In einer weiteren Versuchsanordnung wurde die Konzentration von Acetosyringenin erhöht. Nach der einmaligen Vernebelung von Acetosyringeninlösung (5% für 2 Minuten, entsprechend 5mg/Tier) blieb das Tier 30 Minuten vor Ovalbuminexposition bis zur Provokation in der Kammer. **Trotz der zehnfachen Dosierung im Vergleich zum letzten Versuch war auch hier keine Hemmung der Bronchokonstriktion festzustellen.** (siehe Abbildung 55). (Sensibilisierungsmethode 1)

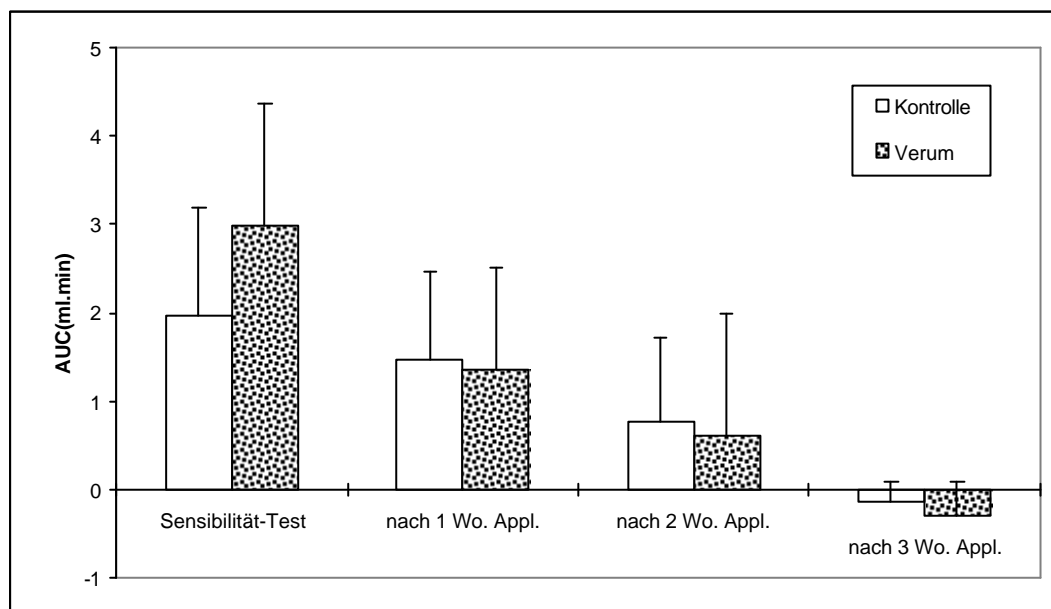


Signifikanzniveau $p < 0,05$	nicht signifik.
Prozentuale Hemmung	-49,4

Abb. 55: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach der Vernebelung von Acetosyringenin (5%, 1x 120 sec entspricht 5mg/Tier) 30 Minuten vor OA-Provokation (0,2%); n=14; ($\bar{x} \pm SD$)

4.3.2.1.4. Acetosyringenin inhalative Applikation 1x täglich 5mg/Tier, 3 Wochen lang

Schließlich wurden **5mg/kg Acetosyringenin 1x täglich 3 Wochen lang an die Tiere inhalativ** bei wöchentlichem OA-Provokationstest verabreicht. Auch hier konnte **keine statistisch signifikante asthmaprotektive Wirkung** festgestellt werden. Der Versuchsablauf war nicht optimal, da die Tiere nicht passend in Kontroll- und Verumgruppen eingeteilt waren und beide Gruppen über die gesamte Versuchszeit eine lediglich schwache, beim 4. Provokationstest überhaupt keine asthmatische Reaktion zeigten. Wenn die Reaktion der Verumgruppe über 4 Wochen beobachtet wurde, sah man tendenziell eine geringe antiasthmatische Wirkung, die aber statistisch nicht ins Gewicht fiel, da die Kontrollgruppe über 4 Wochen ebenfalls eine stark abfallende Bronchokonstriktion zeigte (s. Abbildung 56 und 57). (Sensibilisierungsmethode 1)



Test	Sensi.	1Wo.Appl.	2Wo.Appl	3Wo.Appl
Signifikanzniveau $p < ,05$	n. signif	n. signif	n. signif	n. signif
Inhibition(%)	-24,10	8,4	20,7	-115,1

Abb. 56: Reaktionsverlauf nach 1x täglicher inhalativer Applikation von 5 mg/kg Acetosyringenin und wöchentlichem Provokationstest; OA-Provokation (0,2%); $n_c = n_v = 7$; (AUC(MW)±SD)

Acetosyringenin

Provokationstest nach 2 Wochen Appl. 5mg/kg Inhalativ 1xtgl. nc=nv=7

OA-Provokation (0,2%) : (x +/- SD)

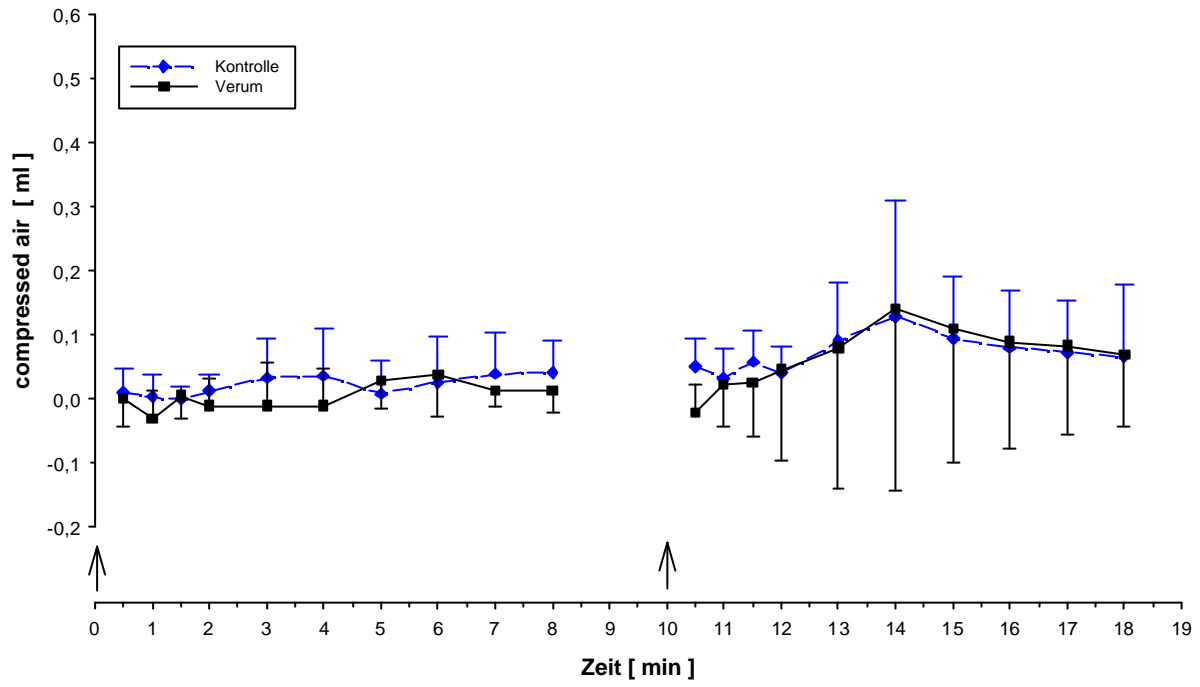
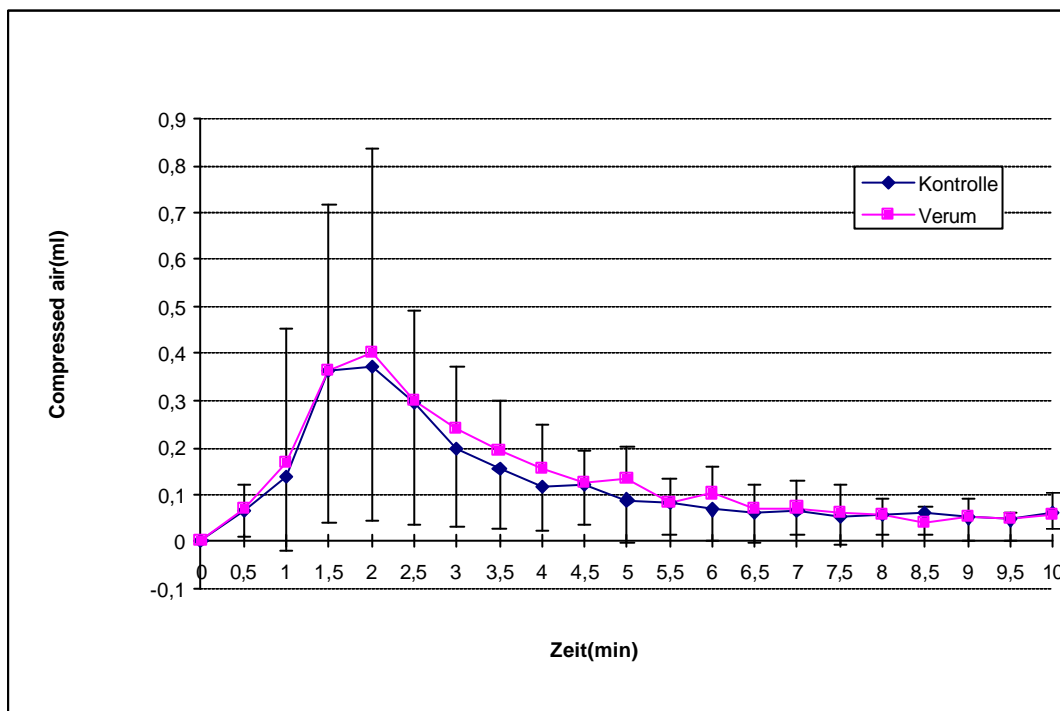


Abb. 57

4.3.2.2. Acetosyringenin-Histaminexposition

4.3.2.2.1. Acetosyringenin orale Applikation (10mg/kg), 1 Stunde vor Histaminprovokation

In einem letzten Versuch dieser Reihe wurde zur Provokation Histamin eingesetzt. Die orale Verabreichung von **10mg/kg Acetosyringenin 1 Stunde vor der Histaminexposition** ergab auch hier **keine Inhibition der Bronchokonstriktion** (siehe Abbildung 58) (Sensibilisierungsmethode 1)



Signifikanzniveau $p < 0,05$	nicht signifik.
Prozentuale Hemmung	-11.2

Abb. 58: Zeitverlauf der Bronchokonstriktion (ausgedrückt in CA) nach einmaliger oraler Applikation von 10mg/kg Acetosyringenin eine Stunde vor HI-Provokation (0,1%, 1x 50 sec in Minute 0); n=10; ($\bar{x} \pm SD$)

4.3.3. Diskussion der Untersuchungsergebnisse der Drogen der traditionellen Volksmedizin und von Acetosyringenin

4.3.3.1. Drogen der traditionellen Volksmedizin

Extrakte aus *Picrorhiza kurroa*, eine Pflanze der ayurvedischen Medizin mit Anwendung bei Leber- und Lungenentzündung, ist in zahlreichen tierexperimentellen und klinischen Modellen mit positiven Ergebnissen untersucht worden (siehe 4.3.1.1.). In dieser Arbeit wurde von uns auf eine mögliche antientzündlich-antiasthmatische Wirkung der Droge auch nach Langzeitapplikation geprüft. **Eine signifikante Hemmung der Bronchokonstriktion nach zwei Wochen Applikation bestätigte eindeutig die antiasthmatische Wirksamkeit der Droge.** Im Vergleich zur Glucocorticoid-Wirkung lag der Grad der Wirksamkeit etwas hinter den Glukokortikoiden. Nach drei Wochen Applikation ließ die Reaktionsstärke der Kontrollgruppe nach, lag aber immer noch bei einer Hemmrate der Bronchokonstriktion von 50,8% .

Worauf die antiasthmatische bzw. antientzündliche Wirkung zurückzuführen war, konnte nicht eindeutig geklärt werden, da die Iridoidglykoside Veronikosid, Minekosid und 6-Feruloylcatalpol für verschiedene Mischungen nicht zur Verfügung standen. Man könnte daher annehmen, dass die Acetophenonglykoside Picein und Androsin, deren Aglycone bereits einmal von Dorsch im plethysmographischen Modell mit positivem Ergebnis untersucht worden waren, an dieser Extraktmischung beteiligt sind. Da aber in unserer Versuchsreihe die antiasthmatische Wirkung der Acetophenone nicht reproduziert werden konnte, bleibt die Frage nach dem antiasthmatischen Wirkprinzip von *Picrorhiza kurroa* noch ungeklärt.

Möglicherweise hat in unseren Versuchen im Magendarmtrakt eine Hydrolyse der Acetophenonglykoside zu den freien Acetophenonen nicht in vollem Umfang stattgefunden.

Angurate (*M. grandiflora*) und *Caiophora sepiara* werden in Süd- und Mittelamerika von der Volksmedizin bei Lungenentzündung und hartnäckigem Husten innerlich verwendet (De Feo 1992). Beide gelten als Iridoiddroge mit potentiell entzündungshemmenden Eigenschaften (Bucar et al 1998, De Feo 1992). Nach täglicher oraler Applikation von 25 mg/kg Methanolextrakt von *Angurate* oder 100 mg/kg Methanolextrakt von *Caiophora sepiara* über

drei Wochen und wöchentlicher Allergenprovokation konnten allerdings keine signifikanten Wirkungen registriert werden (siehe 4.3.1.3 und 4.3.1.4). Dies kann verschiedene Gründe haben. Da Iridoidglykoside säureinstabil sind und nach oraler Applikation im Verdauungstrakt enzymatisch zu den Aglyconen gespalten werden können, wäre denkbar, dass die Spaltung im Versuch nicht optimal oder überhaupt nicht erfolgt ist, d.h. auch die Vorgänge im Verdauungstrakt der Meerschweinchen sind denen beim Menschen nicht gleichzusetzen.

Ob der Einsatz einer höheren Dosis - besonders bei *Caiophora sepiara*, für die nach zwei und drei Wochen Applikation eine schwache aber noch nicht signifikante Wirkung dokumentiert wurde - zu anderen Ergebnissen geführt hätte, ist im Rahmen dieser Experimente nicht untersucht worden.

Wascha (Gummiharz der Pflanze *Dorema ammoniacum*), eine Droge der iranischen Volksmedizin, wird unter anderem bei Asthma, Allergie und Lungenerkrankungen eingesetzt. In dieser Arbeit wurde Wascha als Suspension in Wasser - wie in der Volksmedizin üblich - **1x täglich 70 mg/kg über drei Wochen** an Meerschweinchen verabreicht. Es wurde **keine signifikante Wirkung** nach der Gabe dieser Dosis festgestellt. In einem zweiten Versuch wurde **1x täglich 140 mg/kg Wascha zwei Stunden nach der Applikation von 0,5 mg/kg Montelukast** an eine Gruppe von Tieren verabreicht. Eine Parallelgruppe erhielt nur Montelukast und eine andere Gruppe nur Lösungsmittel. **Wascha bewirkte jetzt eine signifikante Verdoppelung der Montelukastwirkung nach einer Woche Applikation und nach zwei Wochen Applikation immer noch eine deutliche synergistische Wirkung.** Dies zeigt, dass in unserem Tiermodell bei dieser Droge mit ausreichender Dosierung eine antiasthmatische Wirkung erreichbar ist.

4.3.3.2. Acetosyringenin

Die bereits früher von Dorsch und Mitarbeiter mit Acetosyringenin durchgeführten und positiv verlaufenen Untersuchungen haben wir in unserer Versuchsanordnung wiederholt.

Bei den Dorsch-Untersuchungen wurden die Tiere **in Metallkäfigen und auf Metallboden** gehalten. Bei unseren Untersuchungen mussten die Tiere dagegen **auf Streu** gehalten werden.

Bei uns zeigte Acetosyringenin nach **oralen (10mg/kg 1 h Prae)** oder **inhalativen (0,5mg/Tier und 5mg/Tier 30 min. Prae)** Applikation und bei OA-Exposition (siehe 4.3.2.1.1. bis 4.3.2.1.3.) **keine eindeutige akute antiasthmatische Wirkung.**

Folgende Gründe könnten für diese divergenten Ergebnisse verantwortlich sein:

- 1. Die unterschiedlichen Tierhaltungsbedingungen haben die Untersuchungen stark beeinflusst.** Nach Untersuchungen von Hinterberger zeigen Tiere in diesem Tiermodell je nach Tierhaltungsbedingung ein unterschiedliches Sensibilitätsverhalten auf. Die Tiere auf Streu geben demnach eine stärkere allergische Reaktion als Versuchstiere in Metallkäfigen (Hinterberger 2000).
- 2. Die früheren Untersuchungen im Prototyp dieses Plethysmograph waren nicht validiert und deshalb schwer zu reproduzieren.** Wie die Untersuchungen in unserem validierten Tiermodell an Standardsubstanzen aber bewiesen haben, waren unsere Ergebnisse einwandfrei reproduzierbar.
- 3. Ob auch eventuelle unterschiedliche Techniken bei der Applikation oder noch weitere Faktoren zur diesen divergenten Ergebnissen geführt haben, ist uns nicht bekannt.**

Im Prototyp dieses Gerätes wurden damals keine Langzeituntersuchungen mit Acetosyringenin durchgeführt. Bei uns war das Ergebnis der 3-wöchigen inhalativen Behandlung der Tiere mit Acetosyringenin (siehe 4.3.2.1.4.) nicht eindeutig, da der Versuchsablauf sich nicht als optimal erwies. Die Tiere waren nicht passend in Kontroll- und Verumgruppen aufgeteilt. Die Verumgruppe hat bei dem Sensibilitätstest um 24% stärker reagiert als die Kontrollgruppe. Außerdem waren die Tiere nach Methode 1 sensibilisiert, so dass sowohl die Kontroll- als auch die Verumgruppe über den gesamten Versuchsablauf nur eine schwache asthmatische Reaktion gezeigt hatten. Aus diesem Grund war es nicht möglich die Unterschiede in der Reaktionsstärke beider Gruppen statistisch zu bewerten. Man könnte eine tendenzielle antiasthmatische Wirkung feststellen, wenn man allein die Reaktion der Verumgruppe beurteilen würde. Zusammen mit der Kontrollgruppe jedoch war diese statistisch nicht nachzuweisen, da die Kontrollgruppe eine ebenso stark reduzierende Bronchokonstriktion über die gesamte Versuchszeit aufwies.

Acetosyringenin konnte die bronchiale Hyperregibilität nach oraler Applikation (10mg/kg) 1 Stunde vor Histaminprovokation nicht hemmen. Dies war die Bestätigung für die vorherigen Untersuchungen (siehe 4.3.2.2.1.).

5. ZUSAMMENFASSUNG

*Die Prüfung der Bedingungen der Ovalbuminsensibilisierung bei Meerschweinchen und die Untersuchungen bekannter Asthmamittel, einiger Pflanzenextrakte und von Acetosyringenin diente in erster Linie der Validierung dieser plethysmographischen Tiermethode.

Nach Injektion einer niedrigen Dosis Ovalbumin zusammen mit Aluminiumhydroxid als Adjuvanz war die allergische Sensibilisierung der Tiere deutlich stärker ausgeprägt und hielt auch länger an als nach Injektion einer deutlich höheren Ovalbumindosis ohne Adjuvanz. Die Auslösung der Bronchokonstriktion nach Inhalation des Allergens Ovalbumin tritt in der 2. bis 4. Minute ein, nach Inhalation von Histamin bereits nach 1 1/2 bis 2 Minuten. Dabei war es günstiger, die Histamindosis durch Vernebelung einer konzentrierteren Histaminlösung zu erhöhen, als durch Verlängerung der Vernebelungszeit. Auch die Inhalation des Allergens Ovalbumin, so wie es zur Testung der allergischen Sensibilisierung benutzt wurde, bewirkte per se eine Sensibilisierung, wenn die Tiere von klein auf, das heißt unmittelbar nach Ankunft im Tierstall immer wieder der Ovalbumin Inhalation exponiert wurden. Es ist daher durchaus denkbar, dass durch die Experimente selbst auf inhalativem Wege eine Verstärkung der Sensibilisierung bewirkt wird. Tatsächlich war das Umgekehrte der Fall: die allergische Reaktion fiel immer schwächer aus und war 5 Wochen nach der Sensibilisierung kaum noch zu beobachten. Nach der Sensibilisierung in Gegenwart des Adjuvanz war die Abnahme der allergischen Reaktion über 3 bis 4 Wochen nur geringfügig und stieg anschließend wieder an. Das Ausmaß der bronchialen Obstruktion nahm bei inhalativer Sensibilisierung im Verlauf der wöchentlichen Tests nur langsam zu, während eine Tiergruppe die erst 4 Wochen nach der intraperitonealen Sensibilisierung zum 1. Mal getestet worden war, die stärkste bronchiale Obstruktion zeigte. Zum gleichen Zeitpunkt zeigten die Tiergruppen, die bereits früheren Experimenten unterzogen wurden, schwächere Werte, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die inhalativen Ovalbumin Expositionen nach intraperitonealen Sensibilisierung eher einen Tachyphylaxie Effekt bewirkten als eine Verstärkung der Sensibilisierung. Ein saisonaler Effekt auf das Ausmaß der Sensibilisierung konnte bei keiner der untersuchten Tiergruppen festgestellt werden, da die Versuche kontinuierlich in

den Monaten Mai - Juli, August - September, Oktober - November und Dezember - Januar stattgefunden hatten..

* Die Validierung des Ganzkörper-Plethysmographen für Meerschweinchen mit den bekannten Asthmamedikamenten ergab eine vollständige Unterdrückung der bronchialen Obstruktion nach Ovalbumin- und Histaminexposition durch das β -Sympathomimetikum Fenoterol, während das Methylxanthin Theophyllin nur die Ovalbumin-, nicht jedoch die Histamin-induzierte Bronchokonstriktion verhindern konnte.

Die entzündungshemmende Wirkung der Glukokortikoide war nach 2-wöchiger täglicher oraler Gabe von Methylprednisolon nachzuweisen, während die täglich inhalative Behandlung der Tiere mit Budesonid erst nach 3 Wochen eine signifikante Hemmung der Bronchokonstriktion ergab. Der Leukotrien-Antagonist Montelukast verringerte lediglich nicht signifikant die Bronchokonstriktion um ca. 24 %, unabhängig davon, ob die Ovalbumin induzierte Bronchokonstriktion bereits 1 Stunde nach der ersten Gabe von Montelukast oder erst nach 3-tägiger Therapie bestimmt wurde. Eine Signifikanz erreichte diese Hemmung der Bronchokonstriktion erst nach 2-wöchiger täglicher oraler Applikation von Montelukast.

* - Von den getesteten Pflanzenextrakten zeigte sich eine signifikante Hemmung der Bronchokonstriktion nach 3-wöchiger Applikation bei *Picrorhiza kurroa*, was im Vergleich zu der Glucocorticoid-Wirkung einer etwas schwächeren antientzündlichen Wirkung entsprach.

- Die Applikation von Wascha (Gummiharz von *Dorema ammoniacum*) in Kombination mit Montelukast bewirkte eine Verdoppelung der Montelukast-Wirkung nach einer Woche. Da bei alleiniger Applikation von Wascha keine Wirkung demonstriert werden konnte, scheint hier ein interessanter Synergieeffekt die Ursache für diese Wirkverdoppelung zu sein.

- Wirkungslos blieb auch die orale Applikation von Extrakten aus Angurate und *Caiophora sepiara* nach über 3 Wochen Behandlung.

- Acetosyringenin zeigte weder nach oraler noch nach inhalativer Applikation eine akut antiasthmatische Wirkung. Nach Applikation über 3 Wochen konnte dagegen eine tendenziell antiasthmatische Wirkung demonstriert werden, die aber keine statistische Signifikanz

gegenüber der Kontrollgruppe ergeben hatte. Die Histamin-induzierte Bronchokonstriktion konnte durch Acetosyringenin nicht gehemmt werden. Als Ursache für diese Diskrepanz unserer Versuche zu den früheren Untersuchungen können die unterschiedliche Tierhaltung, das Arbeiten mit einer nicht validierten und standardisierten Versuchsanordnung oder abweichende Applikationstechniken verantwortlich sein.

Die vorgelegten Untersuchungsergebnisse belegen, dass das plethysmographische Zweikammer-Tiermodell in der jetzt vorliegenden von uns validierten und standardisierten Methode an Ovalbumin-sensibilisierten Meerschweinchen geeignet ist, nicht nur die antiasthmatische Wirksamkeit von synthetischen Arzneistoffen zu bestätigen bzw. zu überprüfen, sondern auch Pflanzenextrakte und daraus isolierte Wirkstoffe auf ihr mögliches antiasthmatisches Wirkpotential hin zu untersuchen.

Die antiasthmatische Wirksamkeit untersuchter bekannter in der Humanmedizin eingesetzter Antiasthmata korrelierte eindeutig mit den Ergebnissen in unseren Tiermodellen.

Die Methode ist sowohl für die Suche nach neuen Wirkstoffen als auch für die Wirkkontrolle in Industriebetrieben geeignet.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abraham WM (1996): The sheep as a model of the late asthmatic response. In D. Raeburn and M.A. Giembycz, editors, Airways Smooth Muscle: Modeling the Asthmatic Response In Vivo. Birkhauser Verlag, Basel. 171-189

Agertoft L, Petersen S (1994): Effect of long-term treatment with an inhaled corticosteroid on growth and pulmonary funktion in asthmatic children. *Respir Med* 88: 373-381

Aharony D (1998): Pharmacology of Leukotrien Receptor Antagonists. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 157. pP s214-s219

Aharony D and Flacone RC (1989): Binding of 3H-LTD₄ and the peptide leukotriene antagonist 3H-ICI 198,615 to receptors on human lung membranes. In U. Zor , Z. Naor and A. Danon. Editors Leukotrienes and Prostanoids in Health and Disease, Vol 3: New Trends in Lipid Mediator Research Karger, Basel. 67-71

Aharony D and Krell RD (1991): Pharmacology of peptide leukotriene receptor antagonists. *Ann N Y Acad Sci* 629: 125-132

Andersson P (1980a): Antigen-Induced Bronchial Anaphylaxis in Actively Sensitized Guinea-Pigs. Pattern of Response in Relation to Immunization Regimen. *Allergy* 35:65-71

Andersson P (1980b): Antigen-Induced Bronchial Anaphylaxis in Actively Sensitized Guinea-Pigs: antianaphylactic effect of sodium cromoglycate and aminophylline. *Br J Pharmac* 69: 467-472

Andersson P. (1981): Antigen-Induced Bronchial Anaphylaxis in Actively Sensitized Guinea Pigs. The Effect of Booster Injection and Cyclophosphamide Treatment. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 64: 249-258)

Andersson P, Bergstrand H (1981): Antigen-Induced Bronchial Anaphylaxis in Actively Sensitized Guinea-Pigs: effect of long-term Treatment with sodium cromoglycate and aminophylline. *Br J Pharmac* 74: 601-609

Andersson P and Brattsand R (1982): Protective Effects of the Glucocorticoide, on lung anaphylaxis in actively sensitized guinea-pigs: Inhibition of IgE-but not of IgG-mediated Anaphylaxis *Br J Pharmac* 76: 139-147

Andersson P, Brange C, Von Kogerer B, Sonmark B and Stahre G (1988): Effect of glucocorticosteroid treatment on ovalbumin-induced IgE-mediated immediate and late allergic response in guinea pigs. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 87:32

Andersson WH, Krzanowski J.J., Polson J. B., Szentivanyi A. (1979): Characteristics of Histamine Canine Tracheal Smooth Muscle. *Naunyn-Schmiedbergs Arch. Pharmacol.* 308, 117-125

Aoki S, Boubekeur K, Kristersson A, Morley J and Sanjar S (1988): Is allergic airway hyperreactivity of the guinea-pig dependent on eosinophil accumulation in the lung? *Br J Pharmacol* 94: 365p

Atal NC, Sharma ML, Kaul A et al (1986): Immunomodulating agents of plant origin I: Preliminary screening. *Journal of Ethnopharmacology* 18: 133

Aubier M, Barnes PJ (1995): Theophyllin and Phosphodiesterase inhibitors *Eur Res J* 8: 347-348)

Aynehchi Y (1986) *Pharmakognosy and Medicinal Plants of Iran*
Tehran University Publications No. 1879 (in persisch)

Azzawi M, Bradley B, Jeffrey PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G (1990): Identification of activated T-Lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 142: 1407-1413

Banner KH, Page CP (1995): Theophylline and selective phosphodiesterase inhibitors as anti-inflammatory drugs in the treatment of bronchial asthma. *Eur Respir J* 8: 996-1000

Banner KH, Marchini F, Buschi A, Morruggi E, Semeraro C, Page CP (1995): The Effect of Selective Phosphodiesterase Inhibitors in Comparison with other Anti-asthma Drugs on Allergen-induced Eosinophilia in Guinea-pig Airways. *Pulmonary Pharmacology* 8: 37-42

Barnes N (1997): Behandlung des allergischen Asthma mit Leukotrien-Rezeptorantagonisten. In Kroegel C (Ed.): *Moderne Therapie des Asthma bronchiale*. Thieme Verlag, Stuttgart

Barnes PJ (1990): Effect of corticosteroids on airway hyper responsiveness. *Am Rev Respir Dis* 141: 70

Barnes PJ (1992): Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. *Am Rev Respir Dis* 148

Barnes PJ (1995): Cyclic nucleotides and phosphodiesterases and airway function. *Eur Resp J* 8: 457-462

Barnes PJ, Chung KF, Page CP (1988): Platelet-activating factor as a mediator of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 81: 919-934

Barnes PJ, Chung KF, Page CP (1988a): Inflammatory mediators and asthma. *Pharmacol Rev* 40: 49-84

Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC (1988b): (Hrsg.): *Asthma: Basic mechanisms and clinical management*. Academic Press, London

Barnes PJ et al (1999): Anti-IgE antibody therapy for Asthma. *N Engl J Med* 341: 2006-2008

Boner AL, Piacentini GL (1993): Inhaled corticosteroids in children. Is there a „safe“ dosage? *Drug Safety* 9: 9-20

- Bochner BS, Udem BJ, Lichtenstein LM (1994): Immunological aspects of asthma. *Annu Rev Immunol* 12:295-335
- Bodem SH (1997): Theophyllin und neue Inhibitoren der Phosphodiesterase bei Asthma, *Pharmazeutische Zeitung* Nr. 24 142. Jahrgang 12 Juni
- Britton JR, Hanley SP, Tattersfield AE (1987): The effect of an oral leukotriene D4 antagonist L-649,923 on the response to inhaled antigen in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 79: 811-816
- Brown PH, Crompton GK, Greening AP (1991): Proinflammatory cytokines in acute asthma. *Lancet* 338: 590-593
- Bucar F, Knauder E, Schubert-Zsilavec M (1998): Studies on the Antiinflammatory Principle of *Mentzelia chilensis*. *Phytochemistry Research* 12: 275-278
- Burge PS, Efthimiou J, Turner-Warwick M, and Nelmes PTJ (1982): Double-blind trials of inhaled beclomethasone dipropionate and flucortin butyl ester in allergen-induced immediate and late asthmatic reaction. *Clin Allergy* 12: 523-531
- Busse WW, Calhoun WF, Sedgwick JD (1993): Mechanism of airway inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 147: 20-24
- Catalano S, Flamini G, Bilia AR, Morelli I, Nicoletti M (1995): Iridoids from *Mentzelia cordifolia*. *Phytochemistry* 38/4: 895-897
- Chan-Yeung M, Lam S, Chan H, Tse KS, Salari H (1991): The release of platelet-activating factor into plasma during allergen-induced bronchoconstriction. *J Allergy Clin Immunol* 87: 667-673
- Coles SJ, Neil KH, Reid LM, Austen KF (1983): Effect of leukotrienes C4 and D4 on glycoprotein and lysosome secretion by human bronchial mucosa. *Prostaglandins* 25: 155-170

Cockcroft DW and Hargreave FE (1989): Relationship between atopy and airway hyperresponsiveness. In: Sluiter HJ, van der Lende R, Gerritsen J, Postma DS (Hrsg): Bronchitis IV. Van Gorcum, Assen/Maastricht, pp. 23-24)

Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB (1988): T-lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet* I: 1129-1132

Crapo R (1994): Pulmonary function. *N Engl J Med* 331: 25-30

Cuss FM, Dixon CMS, Barnes PJ (1986): Effects of inhaled platelet-activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man. *Lancet* 1: 189-192

Daffonchio L, Payne AN, Lees IW and Whittle BRJ (1989): Airway hyperreactivity follows anaphylactic microshock in anaesthetized guinea-pigs. *Eur J Pharmacol* 161: 135-142

Danielson TJ, Hawes EM, Bliss CA (1973): *Canadian Journal of Chemistry* 51, 760

De Feo V (1992): Medicinal and magical plants in the northern Peruvian Andes, *Fitoterapia* 63: 417-440

Del Carmen Recio M, Giner RM, Manez S, Rios JH (1994): Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Med.* 60: 232-234

Dey AC (1980): pp.81-82 *Indian Medicinal Plants used in Ayurvedic Preparations*. Bishen Singh Mahendra Pal Singh (Verlag) Dehra Dun, India.

Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CRW (1990): Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 142: 434-457

Djukanovic R, et al (1995): The effect of theophylline on mucosal inflammation in the asthmatic airway: biopsy results. *Eur Resp J* 8: 831-833

Dorsch W, Frey J. (1981): Allergen-Tachyphylaxie in Guinea-Pigs in vivo - a Prostaglandin E mediated Phenomen? Eur. J. Pediatr. 135, 336

Dorsch W, Wagner H (1991): New antiasthmatic drugs from Traditional Medicine? International Archives of Allergy and Immunology 94:262-265

Dorsch W, Hess V (1992): Noninvasive analysis of lung function in small animals: Compressed Air, thoracic gas volume, airway resistance, maximal flow rates, tidal volume, breathing frequency, I/E ratio. International Archives of Allergy and Applied Immunology 99:496-498.

Dorsch W, Waldher U, Rosmanith J (1981): Continuous recording of intrapulmonary „compressed air “ as a sensitive non invasive method of measuring bronchial obstruction in guinea-pigs. Pflügers Arch 391, 236-241

Dorsch W, Frey L, Neuhauser J (1983): Histamin- und Allergen-Tachyphylaxie beim lebenden Meerschweinchen. Allergologie, Jahrgang 6, Nr. 3/S. 94-97

Dorsch W, Wagner H, Bayer Th (1989): Asthmaschutzwirkung von Zwiebelextrakten: Wirkprofil von Thiosulfinaten. Allergologie 12: 388-396

Dorsch W, Müller A, Christoffel V, Stuppner H, Antus S, Gottsegen A, Wagner H (1994): Antiasthmatic acetophenones – an in vivo study on structure activity relationship. Phytomedicine Vol. 1/1994, pp. 47-54

Drazen JM, O'Brien J, Sparrow D, Weiss ST, Martins MA (1992): Recovery of leucotriene E4 from the urine of patients with airway obstruction. Am Rev Respir Dis 146: 104-108

DuBois CM, Bissonette E, Rola-Pleszczynski M (1989): Asbestosis fibers and silica particles stimulate rat alveolar macrophages to release tumor necrosis factor. Autoregulatory role of leukotriene B4. Am Rev Respir Dis 139: 1257

Dunn CJ, Elliott GA, Oostveen JA and Richards IM (1988): Development of a prolonged eosinophil-rich inflammatory leukocyte infiltration in the guinea-pig asthmatic response to ovalbumin inhalation. *Am Rev Respir Dis* 137: 541-547

El-Naggar LJ, Beal JL, Doskotch RW (1982): Iridoid glycosides from *Mentzelia decapetala*. *J Nat Prod* 45/5: 539-550

Engels F, Renirie BF, t'Hart BA, Labadie RP, and Nijkamp FP (1992) : Effects of apocynin, a drug isolated from the roots of *Picrorhiza kurroa* on arachidonic acid metabolism. *FEBS Letters* 305/3: 254-256

Evans TW, Rogers DF, Aursulky B, chung KF, Barnes PJ (1989): Regional and time dependant effects of inflammatory mediators on airway microvascular permeability in the guinea-pig. *Clinical Science* 76: 479-485

Forsberg K, Sörenby L (1981): The influence of a new corticosteroid, budesonide, on anaphylactic bronchoconstriction and SRS-A release in the guinea-pig. *Agents and actions* 11: 391-395

Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (1997): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 7. Auflage, Spektrum akademischer Verlag

Frew AJ, Moqbel R, Azzawi M, Hartnell A, Barkans J (1990): T Lymphocytes and eosinophils in allergen-induced late asthmatic reactions in the guinea-pig. *Am Rev Respir Dis* 141: 407-413

Fuller RW, Black PN, Dollery CT (1989): Effect of the oral leukotriene D4 antagonist LY171883 on inhaled and intradermal challenge with antigen and leukotriene D4 in atopic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 83: 939-944

Funayama T, Sekizawa K, Yamaya M, Yamauchi K, Ohno Isao, Ohrui T, Terajima M, Okinaga S, and Sasaki H (1996): Role of Leukotriene-degrading Enzymes in Pulmonary Response to

Antigen Infusion in Sensitized Guinea-Pigs In Vivo. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. Vol. 15 pp. 260-267

Galli SJ (1993): New concepts about mast cell. N Engl J Med 328: 257-265

Geist C, Schneider J, Zimmer O (1995): Effect of the lipoxygenase inhibitor N-hydroxy-N-(6-methoxy-3,4-dihydro-2-naphthylmethyl) urea on bronchoconstriction and lung vascular permeability in anaphylactic guinea-pigs. Arzneimittelforschung 45(2): 155-8

Giannopoulos G and Keichline D (1981): Species-related differences in steroid-binding specificity of glucocorticoid receptors in lungs. Endocrinology 108: 1414

Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM (1993): The biology of the eosinophil leukocyte. Ann. Rev. Med. 44: 85-101

Goadby P, Smith WG (1964): Observation on the anti-anaphylactic activity of hydrocortisone and related steroids. J Pharm Pharmac 16: 108-114

Gorenne I, Norel X, Brink C (1996): Cysteinyl leukotriene receptors in the human lung: what's new? TIPS 17:342-345

Greos LS, Vichyanond P, Bleodow DC, Irvin CG, Larsen GL, Szeffler SJ, Hill MR (1991): Methylprednisolone achieves greater concentrations in the lung than prednisone. Am Rev Respir Dis 144: 586-592

Gropp M, (1993): Untersuchungen zur asthmaprotektiven Wirkung verschiedener Fraktionen und Inhaltstoffe der *Picrorhiza kurroa*; Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Guarnieri A und Amorosa M (1970): Ann. Chim. (Roma) 60, 3, 17, 108

Haahtela T, Järvinen M, Kava T et al (1994): Effects of reducing or discontinuing inhaled budesonide in patients with mild asthma. *N Engl J Med* 331: 700-705

Haen E (1995) Chronopharmakologie der reversiblen Atemwegsobstruktion *Wien. Med. Wschr.* 145, 439-445

Haen E (1999): aus Haen und Forth : Wirkstoffprofile für die Arzneimitteltherapie, Erkrankung der Atemwege - Obstruktive Atemwegenerkrankung, ecomed verlagsgesellschaft

Haen E (2000) Vorlesungen an der LMU-München , Walther-Straub-Institut für Pharmakologie

Haen E (2001): Paradigmenwechsel in der Asthmatherapie. *Deutsche Apotheker Zeitung* 141. Jahrgang 30: 48-59

Haen E und Uhl D (1996): Asthma bronchiale. *Medpharm*

Haen E, Dorsch W, Hess V, Christoffel V (1999): Bestimmung der Lungenfunktion im Ganzkörperplethysmographen für Meerschweinchen. *Atemw. Lungenkrkh.* 25, 432-434

Harris D.N. et al (1980): Effect of SQ 80.338(1-(3-Phenyl-2-Propenyl)-1H-Imidazol) on Thromboxane Synthase Activity and Arachidonic Acid Induced Platelet Aggregation and Bronchoconstriction. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* 6, 437-441

t'Hart BA, Simons JM, Knaan-Shanzer S, Bakker NPM, Labadie RP(1990): Antiarthritic activity of the newly developed neutrophil oxidative burst antagonist apocynin. *Free Radical Biol Med* 9: 127-131

t' Hart BA, Elferink JGR, Nibbering PH (1992): Effect of apocynin on the induction of ulcerative lesions in rat skin injected with tubercle bacteria. *Int J Immunopharmac* 14(6):953-961

Hashimoto M, Shinozaki Y, Katori M (1993): Immediate inhibitory effect of methylprednisolone sultetanate (U-67590A) on antigen-induced cutaneous and airway anaphylactic responses in guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.* 108: 604-612

Hegnauer R(1973): *Chemotaxonomie der Pflanzen VI.* Birkhäuser Verlag

Henderson WR (1994): Role of leukotrienes in asthma. *Ann Allergy* 72(3): 272-278

Herxheimer H (1956): *Therapie des Asthma Bronchiale 2. Auflage* Benno Schwabe & Co. Verlag, Basel und Stuttgart

Heuer HO, Wenz B, Jennewein HM, Urich K (1996): Pharmacological characterisation of a new model of antigen-induced pulmonary late-phase reaction in the conscious guinea-pig which uses additional polymyxin B inhalation. *J. Lipid Mediators Cell Signalling* 15 : 17-28

Hicks R (1970): The influence of corticosteroid pretreatment on anaphylactic bronchoconstriction in the guinea-pig. *J Pharm Pharmac* 22:170-179

Hodgson AJ and Funder JW (1978): Glucocorticoid receptors in the guinea-pig. *A J Physiol* 235:R115

Hoppe H (1975): *Drogenkunde Band 1 – Walter de Gruyter, Berlin New York*

Hosford D, Mencia-Huerta JM, Braquet P (1990): Platelet-activating factor (PAF) and PAF antagonists in asthma. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 7: 261-273

Hoshino H, Kobayashi H, Konno S, Okazawa A, Okada Y, Suganuma T, Maruyama S, Adachi M, Takahashi T (1989): Allergen-induced late bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness in guinea-pigs. *Jap J Allergol* 38 : 314

Hutson PA, Church MK, Clay TP, Miller P and Holgate ST (1988): Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea-pigs. *Am Rev Respir Dis* 137: 548

Iijima H, Ishii M, Yamauchi K, Chao CL, Kimura K, Shimura S, Shindoh Y, Inoue H, Mue S and Takishima T (1987): Bronchoalveolar lavage and histologic characterization of late asthmatic response in guinea-pigs. *Am Rev Respir Dis* 136: 922-929

Ikegami K, Hata H, Fuchigami J-i, Tanaka K, Kohjimoto Y, Uchida S, Tasaka K (1997): Apfant (a PAF receptor antagonist) suppresses the early late airway responses in guinea-pigs: a comparison with antiasthmatic drugs. *European Journal of Pharmacology* 328:75-81

Iwama T, Shikada KI, Yamamoto A, Skashita M, Hibi M, Terasawa M (1991): Effect of NZ-107 on Late-phase airway responses and airway hyperreactivity in guinea-pigs. *Eur J Pharmacol* 199: 271

Jensen SR, Mikkelsen CB, Nielsen BJ (1981): Systematic implications of the distribution of iridoids and other chemical compounds in the Loganiaceae and other families of the Asteridae.- *Ann. Missouri Bot. Gard.* 79: 284-302

Jones TR, Davis C, Daniel EE (1982): Pharmacological study of the contractile activity of leukotriene C4 and D4 on isolated human airway smooth muscle. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 60: 638-643

Jones TR, Labelle M, Belley M, Champion E, Charette L, Evans J, Ford-Hutchinson AW, Guathier JY, Lord A, Masson P, McAuliffe M, McFarlane CS, Metters KM, Pickett C, Piechuta H, Rochette C, Rodger IW, Sawyer N, Young RN, Zamboni R, und Abraham WM (1995): Pharmacology of montelukast sodium (singulair®), a potent and selective leukotriene D4 receptor antagonist. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 191-201

Juniper EF, Frith PA, Hargreave FE (1989): Airway responsiveness to histamine and methocholine: relationship to minimum treatment to control symptoms of asthma. *Thorax* 36: 575-579

Kaplan MAC und Gottlieb OR (1982): Iridoids as Systematic Markers in Dicotyledons. *Biochem Syst and Ecol* 10/4: 329-347

Kallos P, Kallos L (1984): Experimental asthma in guinea-pigs revisited. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 73: 77-85

Kikawa Y, Miyanomae T, Inoue Y, Saito M, Nakai A, Shigematsu Y, Hosoi S, Sudo M (1992): Urinary leukotriene E4 after exercise challenge in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 89: 1111-1119

King TP (1966): Chemical und biological properties of some atopic allergens. In: Kunkel HG, Dixon FJ, eds. *Advances in immunology*. New York: Academic Press, 1966: 77-105

Kraan J, Koeter GH, Van der Mark TW, Boorsma M, KuklerJ, Sluiter and De Vries K (1988): Dosage and time effects of inhaled budesonide on bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 137: 44

Krell RD, Aharony D, Buckner CK, Keith RA, Kusner EJ, Snyder DW, Bernstein PR, Matassa VG, Yee YK, Brown FJ, Heasp B, Giles RA (1990): The preclinical pharmacology of ICI 204,219: a peptide leukotriene antagonist. *Am Rev Respir Dis* 141: 978-987

Kroegel C (1992): Dose airway smooth muscle care about platelet-activating factor? *Euro Respir J* 5: 915-918.

Kroegel C (1997a): In: *Asthma von A bis Z*. C. Kroegel / E. Martin / M. Schmidt Medikon Verlag München

Kroegel C (1997b): Pathogenetische Grundlagen des Asthma bronchiale. In: Kroegel C (Ed.): *Moderne Therapie des Asthma bronchiale*. Thieme Verlag, Stuttgart

Kroegel C, Kortsik C, Luttmann W, Matthys H, Werner P, Virchow jr. JC (1993): Pathomechanismus der asthmatischen Entzündungsreaktion. Entzündungszellen und Mediatoren Deutsches Ärzteblatt 90 [Suppl 46]: 3-13

Kroegel C, Luttmann W, Matthys H und Virchow jr. JC (1995): Grundlagen und Anwendung der modernen antientzündlichen Therapie des Asthma bronchiale. Internist 36:546-559

Kroegel C, König W, Jäger L (1997): Erweiterte Therapie des Asthma bronchiale mit 5-Lipoxygenase-Inhibitoren und Leukotrien-Rezeptorantagonisten. Biochemie, Pathophysiologie und therapeutische Perspektiven. Dtsch Arztebl 94: A1802-1810

Kumlin M, Dahlen B, Bjorck T, Zetterstrom O, Ganstrom E, Dahlen SE (1992): Urinary excretion of leukotriene E4 and 11-dehydrothromboxane B2 in response to bronchial provocation with allergen, aspirin, leukotriene D4 and histamine in asthmatics. Am Rev Respir Dis 146: 96-103

Kuwamori M, Wada M, Takita T, Tadokoro T, Maekawa A, Innami S (1997): Effect of Dietary n-3/n-6 Fatty Acid Ratio on the Total Count, Fatty Acid Composition, and Histamine and leukotriene Concentrations of Mast Cells in Tunica Mucosa Bronchicum of Type I Allergic Guinea-Pig Biosci-Biotechnol-Biochem. 61(5): 763-7

Labat C, Ortiz JL, Norel X, Gorenne I, Verley J, Abram TS, Cuthbert MJ, et al (1992): A second cysteinyl leukotriene receptor in human lungs. J Pharmacol Exp Ther 263(2):800-805

Lagente V, Moodley I, Perrin S, Mottin G, Junien JL (1994): Effects of isozyme-selective phosphodiesterase inhibitors on eosinophil infiltration in the guinea-pig lung European Journal of Pharmacology 255: 253-256

Laitinen L, Laitinen AA, Haahtela T, Vikka V, Spur BW, Lee TH (1993): Leukotriene E4 and granulocytic infiltration into asthmatic airways. Lancet 341: 989-990

- Lal N, Singh Ahuja S, Kukreja AK, Pandey B (1988): Clonal propagation of *P. kurroa* Royle ex Benth. by Shoot tip culture. *Plant Cell Reports* 7 :202-205 .
- Lam S, Chan _H, Le Riche JC, Chan Yeung M, Salari H (1988): Release of leukotrienes in patients with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 81: 711-717
- Langer JG, Gupta OP, AtalCK (1981) : Clinical trials on *Picrorhiza kurroa* as an Immunoregulator. *Indian Journal of Pharmacology* 13: 98-103
- Lapa e Silva JR, Ruffie C, Vargaftig BB, Pretolani M (1995): Modulation of the bronchial inflammation in sensitized guinea-pigs by FK506, nedocromil sodium and dexamethasone *Eur Respir J* 8: 1321-1327
- Lewis (1989) : pp 253-265 In Kelly(Hrsg.) *Textbook of Rheumatology*. Saunders Verlag, Philadelphia.
- Liu MC, Blecher ER, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Niv Y, McLemore TL, Permutt S, Proud D, Hubbard WC (1990): Evidence for elevated levels of histamine, prostaglandin D2, and other bronchoconstricting prostaglandins in the airways of subjects with mild asthma. *Am Rev Respir Dis* 142: 126-132
- Lorimer SD, Perry NB, (1994): Antifungal Hydroxyacetophenones from the New Zealand Liverwort, *Plagiochila fasciculata*. *Planta Medica* 60: 386-387
- Mahajani SS, Kulkarni RD (1977): Effect of Disodium Cromoglycate and *P. kurroa* root powder on sensitivity of guinea-pigs to histamin and sympathomimetic
- Mahajani SS, Kulkarni RD (1979): Induction of resistance to isoprenaline in guinea-pigs and its modulation by dsodium cromoglycate, *picrorhiza kurroa* and indomethacin. *Aspects of Allergy applied Immunology* 12: 205-215

Majumbar A(1978) : pp 57-78 In: Handbook of domestic Medicine and Common Ayurvedic Remedies. Central Council for Research in Indian Medicine and homeopathy (Hrsg.), Ministry of Health and Family Welfare, Government of India, New Dehli.

Marom Z, Shelhamer JH, Bach MK, Morton DR, Kaliner M (1982): Slow-reacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucous from human airway in vitro. Am Rev Respir Dis 126 : 449-451

Martin E (1997): In: Asthma von A bis Z C. Kroegel / E. Martin / M. Schmidt Medikon Verlag München

Matsumoto T, Ashida Y, Tsukuda R (1994): Pharmacological Modulation of immediate and late airway response and leukocyte infiltration in the guinea-pig. J Pharmacol Exp Ther 269: 1236

Matthys H (1972): Lungenfunktionsdiagnostik mittels Ganzkörperplethysmographie. F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart und New York

Milogram H et al (1999): Treatment of allergic asthma with monoclonal anti-IgE antibody. N. Engl J Med 341: 1966-1973

Mösbach EW (1992): Botanica Indigena de Chile. Andres Bello, Santiago de Chile

Mogre K, Vore K, Sheth UK (1981): Effect of *Picrorhiza kurroa* and *Eclipta alb* on Na-K-ATPase in hepatic injury by hepatotoxic agents. Indian Journal of Pharmacology 13: 253-259

Moseley PL, Monick M, Hunnigake GW (1988): Divergent effects of silica on lymphocyte proliferation and immunoglobulin production. J Appl Physiol 56: 350

Müller A, (1994): Chemische und pharmakologische Untersuchungen der antiasthmatisch wirksamen Arzneipflanzen *Galphimia glauca* (Cav.) und *Adhatoda vasica* (Nees) – Untersuchungen über Struktur-Wirkungsbeziehungen von Acetophenonderivaten mit

antiasthmatischer Wirkung; Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Müller AA, Kufer JK, Dietl KG, Reiter SA, Grau J und Weigend M (1999): Iridoid glucosides-chemotaxonomic markers in Loasoideae. *Phytochemistry* 52: 67-78

Mutschler E (2001): *Arzneimittelwirkung* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
Nakagawa NT, Obata T, Kobayashi T, Okada Y, Nambu F, Terawaki T, Furuya T, Muryobayashi K, Sawada M, Aishita H (1992): In vivo pharmacologic profile of ONO-1078: a potent, selective and orally active peptide leukotriene (LT) antagonist. *Jpn J Pharmacol* 60: 217-225

Nakagawa NT, Obata T, Kobayashi T, Okada Y, Nambu F, Terawaki T, Furuya T, Muryobayashi K, Sawada M, Aishita H (1993): Effect of a peptide leukotriene receptor antagonist, ONO-1078, on guinea-pig models of asthma. *Eur J Pharmacol* 235: 211-219

Nakazawa T (1984): Change of plasma cortisol level in late asthmatic responses (in Japanese). *Jpn J Allergol* 33: 424-427

Nelson HS (1995): β -Adrenergic bronchodilators. *N Engl J Med* 333:499-506

Nicolaizik WH, Marchant JL, Preece MA, Warner JO (1994): Endocrine and lung function in asthmatic children on inhaled corticosteroids. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 624-628

Nolte D (1991): *Asthma* Urban & Schwarzenberg, 5. Aufl. München

Obata T, Kobayashi T, Okada Y, Nakagawa N, Terawaki T and Aishita H (1992): Effect of a Peptide Leukotriene Antagonist, Ono-1078 on Antigen-induced Airway Microvascular Leakage in Actively Sensitized Guinea-Pigs. *Life Sciences*, vol. 51. 1577-1583

Obata T, Okada Y, Motoishu M, Nakagawa N, Terawaki T and Aishita H (1992): In vitro antagonism of ONO-1078, a newly developed anti-asthma agent, against peptide leukotrienes in isolated guinea-pig tissue. *Jpn J Pharmacol* 60: 227-237

Okuho T, Takahashi H, Sumitano M, Shimodo K, Suzuki S (1987): Plasma levels of leukotrienes C₄ and D₄ during wheezing attacks in asthmatic patients. *Int Arch of Allergy and Appl Immunol* 84: 149-155

One T., Motoyama Y., Sakai S., Yoneda J., Kumeda S. (1979): Interaction between Aspirin and Prostaglandin in the Isolated Guinea-Pig Tracheal Muscle. *Japan J. Pharmacol.* 29, 865-875

Orehek J., Douglas J.S., Bouhuys (1975): Contractile Responses of the Guinea-Pig Trachea in vitro: Modification by Prostaglandin Synthesis Inhibiting Drugs. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 194, 554-564

Ovary Z, Benacerral B, Bloch KJ (1963): Properties of guinea-pig 7S antibodies involved in passive cutaneous and systemic anaphylaxis. *J. Exp Med* 117: 951-64

Owen WF (1991): Cytokine regulation of eosinophil inflammatory disease. *Res Trends* 8: 85-89

Page CP (1990): The role of platelet-activating factor in allergic respiratory disease
Br J Clin Pharmacol 30: 99-106

Pandy BL, Das PK (1988): Immunopharmacological studies on *Picrorhiza kurroa* Royle-ex-Benth part III : Adrenergic mechanisms of antiinflammatory action. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 32:120-125

Panettieri RA, Ciocca V, Hay DWP (1996): The inhibitory effect of duced potrniation of human airway smooth muscle proliferation. *Am J Respir Crit Care Med* 153: A 842 (Abstract)

Parish WE (1970): Homologous serum passive cutaneous anaphylaxis in guinea-pigs mediated by two γ 1 or γ 1-type heat-stable globulin and a non- γ 1 heat-stable reagin. *Immunol* 105:1296-8

Pauwels R, Van Renterghem D, Van Der Straeten M, Johannesson N and Persson CG (1985): the effect of theophylline and enrofylline on allergen-induced bronchoconstriction *J Allergy Clin Immunol* 76: 583-590

Petro W, Konitzko N (1990): Atlas der Lungenfunktiondiagnostik. Medikon Verlag München, Steinkopff Verlag Darmstadt S.17ff

Piancentini GL, Kaliner MA (1991): The potential role of leukotrienes in bronchial asthma. Am Rev Respir Dis 133: 896-899

Pliss LB, Ingenito EP, Ingram RH, Pichurko B (1990): Assessment of bronchoalveolar cell and mediator response to isocapnic hyperpnea in asthma. Am Rev Reespir Dis 142:73-78

Polumin O, Stainton A, (1984): pp. 156. Flowers of the Himalaya. Oxford University Press, Bombay, Kalkutta, Madras.

Popa V, Douglas JS and Bouhuys A (1973): Airway responses to histamine, acetylcholine and Propranolol in anaphylactic hypersensitivity in guinea-pigs. J Allergy clin Immunol 51: 344-356

Rabe KF et al (1995): Theophylline and selective PDE inhibitors as bronchodilators and smooth muscle relaxants. Eur Respir J 8:637-642

Raeburn D, Advenier C (1995): Isoenzym-selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors: effects on airway smooth muscle. Int J Biochem Cell Biol 27: 29-37

Rajaram D, A preliminary clinical trial of P. kurroa in bronchial asthma (1974): Paper presented at World Congress on Asthma, Bronchitis and Conditions Allied, New Dehli.

Reiss T (1997): Überblick über die Ergebnisse klinischer Studien mit Montelukast. In: Bericht zum Symposium am 21. September 1997 im Rahmen des European Respiratory Society Congress in Berlin

Renz H, Smith HR, Henson JE, Ray BS, Irvin CG, Gelfand EW (1992): Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse. J. Allergy Clin. Immunol 89: 1127-1138

Riedel F, Krämer M, Scheibenbogen C and Rieger C (1988): Effects of SO₂ exposure on allergic sensitization in the guinea-pig. *The Journal of Allergy and clinical Immunology*, 82:527-534

Ring J (1995): *Angewandte Allergologie*, MMW Medizin Verlag München

Robinson DS, Durham SR, Kay AB (1993): Cytokines in asthma. *Thorax* 48: 845-853

Robinson DA, Hamid Q, Ying S, et al (1992): Predominant Th₂-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 326: 298-304

Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST (1989): Subepithelial fibrosis in bronchi of asthmatics. *Lancet* II: 520-523

Rottem M, Metcalfe DD (1995): Development and maturation of mast cells and basophils. In: Busse WW, Holgate ST (Eds), *Asthma and Rhinitis*. Blackwell Scientific Publications, Boston-Oxford-London-Berlin

Sachs L, (1984): *Angewandte Statistik*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo

Samhoun MN, Conroy DM, Piper PJ (1984): Pharmacological profile of leukotriene E₄, N-acetyl E₄ and of four of their novel omega and beta oxidative metabolites in airway of guinea-pig and men in vitro. *British Journal of Pharmacology* 98: 1406-1412

Sanjar S, Aoki S, Kristersson A, Smith D, Morley J (1990): Antigen challenge induces Pulmonary airway eosinophil accumulation and airway hyperreactivity in sensitized guinea-pig : the effect of anti-asthma drugs. *Br. J. Pharmacol.* 99: 679-686

Sargar A (1989): *Heilpflanzen III. Band* Publikation von Teheran-Universität (in persisch)

Schleimer RP, Macglashan DW, Peters SP, Pinckhard RN, et al (1986): Characterization of inflammatory mediator release from purified human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* 133: 614-617

Schmidt M (1997): In: *Asthma von A bis Z* C. Kroegel / E. Martin / M. Schmidt Medikon Verlag München

Schudt C, et al (1995): PDE isoenzymes as targets for anti-asthma drugs. *Eur Resp J* 8: 1179-1183

Schulze-Weringhaus G (1993): Atopische Atemwegsobstruktion In: *Deutsches Ärzteblatt Supplement zu Heft 46/1993*

Shizawa T, Ohmori S, Maeda K, Sakata K, Ishii T, Kamitani T (1996): 5-Lipoxygenase Inhibitory and Antihistamine Activities of Linetastine. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 46(11): 1072-1076

Simons JM, t'Hart BA, Labadie RP et al (1990): Modulation of human complement activation and the human neutrophil oxidative burst by different root extracts of *Picrorhiza kurroa*. *Phytotherapy Research* 4: 207-221

Simons JM, t'Hart BA, IP Vai Ching TRAM, van Dijk H, and Labadie RP (1990a): Metabolic activation of natural phenols trophils. *Free Radical. Biol. Med.* 8: 251-258

Smith LJ (1991): The role of platelet-activating factor in asthma. *Am Rev Respir Dis* 143:100-102

Spada CS, Nieves AL, Krauss AH, Woodward DF (1994): Comparison of leukotriene B4 and D4 effects on human eosinophil and neutrophil motility in vitro. *J Leukoc Biol* 55: 183-191

Stuppner H, Wagner H (1989): Minor Iridoid and Phenol Glycosides of *Picrorhiza kurroa*. *Planta Medica* 55:467-469

Stuppner H, Reinisch O, Wiedermann CJ, Wagner H (1995): Acetophenones – compounds from plant origin with inhibitory effects on neutrophil in vitro respiration burst activity. *Phytomedicine* Vol. 4: 283-286

Suda H, Nagai H, Iwama T, Koda A (1992): Effects of NZ-107 on Bronchoconstriction in Guinea-Pigs. *Int Arch Allergy Immunol* 97: 187-193

Tattersfield AE (1992): Bronchodilators: New developments. *Br Med Bull* 48: 190-204

Teixeira MM, Rossi AG, Williams TJ, Hellewell PG (1994): Effect of phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on cutaneous inflammation in the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 112: 332-340

Thorne PS and Karol MH (1989): Association of fever with late-onset pulmonary hypersensitivity responses in the guinea-pig. *Toxicol Appl Pharmacol* 100:247

Timonen T, and Stenius-Aarnia B (1985): Natural killer cell activity in asthma. *Clin Exp Med* 59: 85-90

Toogood JH (1990): Complications of topical steroid therapy for asthma. *Am Rev Respir Dis* 141: 89-96

Tsunoda H, Katayama S, Sakuma Y, Tanaka S, Tsukidate K, Abe S, Yamatsu I, and Katayama K (1991): Effect of a Novel 5-Lipoxygenase Inhibitor, E6080 on Bronchospasm, Airway Cellular Infiltration and Leukotriene Production in Guinea-Pigs. *Prostaglandins-Leukot-Essent-Fatty-Acids.* 42(1): 51-6

Ukena D, Berdel D, Butt U et al (1996): Theophyllin in der Therapie des Asthma bronchiale- Ist eine Neubewertung notwendig? *Med Klin* 91: 751-752

Ukena D, Sybrecht GW (1993): Was ist gesichert in der medikamentösen Therapie des Asthma bronchiale? *Internist* 34: 1133-1140

Underwood DC, Muccitelli RM, Lutmann MA, Hay DW, Torphy TJ, Wasserman MA (1994): Differential antagonism of airway contractile responses to prostaglandin (PG) D₂ and 9 alpha-11beta-PGF₂ by atropine SK&F 88046 and SQ 29548 in the guinea-pig. *J Pharmacol Exp Ther* 268(1): 304-310

Upadhyay R, Arumugam N, Bhojwani S. (1989): In vitro propagation of *P. kurroa* Royle ex Benth-An endangered species of medicinal importance. *Phytomorphology*, 39(2,3),pp.235-242.

Urban I und Gillg W (1990): *Novorum actorum academiae caesareae leopoldinae-carolinae germanicae naturae curiosorum* 76 (1)

Von Wichert P, Feddersen CO (1994): Kontroversen in der Therapie des Asthma bronchiale. *Internist* 35: 376-384

Wagner H (1993): *Pharmazeutische Biologie. Drogen und Inhaltstoffe*. Gustav Fischer Stuttgart, New York

Walker C, Bode E, Boer L, Hansel TT, Basler K, Virchow jr. JC (1992): Allergic and non allergic asthmatics have a distinct pattern of T cell activation and cytokine production in peripheral blood and BAL. *Am Rev Respir Dis* 146: 109-115

Wang CG, Du T, Xu LJ, Martin JG (1993): Role of leukotriene D₄ in allergen-induced increases in airway smooth muscle in the rat. *Am Rev Respir Dis* 148: 413-417

Wardlaw AJ, Hay H, Cromwell O, Collins JV, Kay AB (1989): Leukotrienes LTC₄ and LTB₄ in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma and other respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 84 : 19-26

Werner C (1991): Wirksamkeit und Verträglichkeit eines Magentees (Angurate) bei funktionellen Magen-Darm-Beschwerden (Colon irritabile und dyseptisches Syndrom). *Phytotherapie* 12: 192-194

Wettengel R et al (1994): Empfehlungen der Deutschen Atemwegsliga zum Asthmamanagement bei Erwachsenen und bei Kindern. *Med Klin* 89:57-67

White MV (1990): The role of histamine in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 86: 599-605

Wichtel M (1997): Teedrogen und Phytopharmaka. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart

Wirchow JC jr, Braun R, Häfner D, Kortsik C, Engelstätter R, Werner P, Matthys H, Blaser K, Walker C, Kroegel C (1993): Increased levels of BAL cytokines in early and late allergic reaction following segmental allergen provocation. *Am Rev Respir Dis* 147: A 784

Yamano T, Tsujimoto Y, Noda T, Shimizu M, Ohmori M, Morita S, Yamada A (1988): Hepatotoxicity of Gardenia yellow color in rats. *Toxicol Lett* 44: 177-182

Zielen S, Rabe KF, Mahn U, Buhl R (2000): Pressekonferenz, Frankfurt/Main, 18. Januar 2000, veranstaltet von der Novartis; Bericht von *Deutsche Apotheker Zeitung* 140. Jahrgang 5:41-43

DANKSAGUNG

Mein ganz herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. Haen, Klinische Pharmakologie, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Regensburg, für die Bereitstellung des Themas, für die kompetente, sachliche und freundliche Betreuung dieser Arbeit und für seine Hilfsbereitschaft und kritischen Anregungen,

genauso Herrn Prof. Dr. H. Wagner, Institut für pharmazeutische Biologie der Universität München, für das interessante Thema, für seine fachkundigen und väterlichen Anleitungen und Ratschläge,

Herrn Dr. Andreas Müller, Institut für pharmazeutische Biologie der Universität München, für alle seine Anregungen, Bemühungen, Hilfsbereitschaft und insbesondere für das Bereitstellen der Droge nextrakte,

Herrn Prof. Dr. W. Dorsch Kinderärztliche Gemeinschaftspraxis München, für das Bereitstellen des Plethysmographes und weitere Unterstützungen,

Herrn Dr. Volker Christoffel, Fa. Plantamed, Neumarkt, für die freundliche Unterstützung

sowie meiner Arbeitsgruppe Markus Hinterberger und Ulrike Schwaiger für ihre große Hilfsbereitschaft.

LEBENS LAUF

Name	Wahid Mahdawi
Geburtsdatum	19.06.1960
Geburtsort	Lahidjan/Iran
1966 - 1978	Besuch der Grund- , Mittel- , Oberschule in Iran Abschluss: Abitur
1979 - 1981	Maschinenbaustudium in Maschad/Iran (Studiumabbruch, da alle iranischen Universitäten geschlossen wurden)
1982– 1985	Tätigkeit als Lehrer
Seit Nov. 1985	Aufenthalt in Deutschland
1986 - 1987	Deutschkurs in Regensburg
1987 - 1988	Besuch des Studienkollegs in München (Abschluss des Studienkollegs entspricht dem deutschen Abitur)
01.11.88 - 15.12.93	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
16.01.94 - 15.07.94	Pharmaziepraktikum bei Hexal Pharma in Holzkirchen
16.07.94 - 15.01.95	Pharmaziepraktikum in der Rainfarn-Apotheke in München
09.03.95	3. Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

Seit Apr. 1995	Apothekertätigkeit in verschiedenen Apotheken in München und Umgebung
seit Nov. 2002	Inhaber und Leiter der Hiltensperger-Apotheke in München

Berufliche Weiterbildung

Mai 1996 - Mai 1997	Fachmann für moderne Informationstechnologie; Bereich: Medizin
----------------------------	---

Wissenschaftliche Tätigkeit

Juni 1997 – Mai 2001	Promotion am Walter-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität München bei Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Ekkehard Haen und Professor Dr. rer. nat. Hildebert Wagner
-----------------------------	---