

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Universitätsklinikum Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med J. Schipper

Zytokinprofile bei natürlicher und experimenteller Allergenprovokation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Alexander Pohle

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Herr Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan der Medizinischen Fakultät

Referent: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Martin Wagenmann
Koreferent: Herr Prof. Dr. med. Bernhard Homey

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	3
Epidemiologie der allergischen Rhinitis	3
Definition der allergischen Rhinitis	3
Diagnostik	4
Therapie	6
Immunologische Grundlagen	8
Fragestellung	11
Material und Methoden	12
Probandenauswahl	12
Nasale Provokation und Rhinomanometrie	13
Operation	13
Herstellung einer Einzelzellsuspension	14
Zytokinbestimmung mittels ELISPOT-Assay	14
Auswertung	16
Statistische Auswertung	17
Ergebnisse	18
Flow vor und nach nasaler Allergenprovokation	18
Zytokinproduktion nach nasaler Allergenprovokation	19
<i>Th2-Zytokine: IL-4, IL-13 und IL-5</i>	19
<i>Th1-Zytokine: IFN-γ und IL-12</i>	20
<i>IgE und IL-8</i>	23
Gewichtung der Th2- und Th1-Zytokine	24
<i>IL-4 / IFN-γ</i>	24
<i>IL-5 / IFN-γ</i>	25
<i>IL-13 / IFN-γ</i>	26
Zytokinproduktion der provozierten versus der nicht provozierten Nasenseite	27
<i>Th2-Zytokine: IL-4, IL-13 und IL-5</i>	27
<i>Th1-Zytokine: IFN-γ und IL-12</i>	29
<i>IgE und IL-8</i>	31
Diskussion	33
Effekt der nasalen Allergenprovokation	33
Weiterverarbeitung der Zellen	34
Messung der Zytokine in der Nasenschleimhaut	35
Zytokinproduktion in der Nasenschleimhaut nach nasaler Allergenprovokation	36
<i>Th2-Zytokine: IL-4, IL-13 und IL-5</i>	36
<i>Th1-Zytokine: IFN-γ und IL-12</i>	40
<i>IgE und IL-8</i>	42

Inhaltsverzeichnis

Gewichtung der Th1- und Th2-Zytokine	45
Zytokinproduktion der provozierten versus der nicht provozierten Nasenseite	47
Zusammenfassung	49
Literaturverzeichnis	52
Anhang.....	56
Anamnesebogen	56
Einverständniserklärung für die Teilnahme an der Studie.....	57
Publikationen	59
Danksagung.....	62
Eidesstattliche Erklärung	63

Einleitung

Epidemiologie der allergischen Rhinitis

Die allergische Rhinitis hat laut europaweit durchgeführter Studien eine Prävalenz von bis zu 25% mit steigender Tendenz [1, 2], wobei die Ursache für die steigende Zahl an Betroffenen nicht eindeutig geklärt ist [3, 4].

Diskutiert werden hierbei eine genetische Prädisposition sowie ein Einfluss der Art und Konzentration von Allergenen und Schadstoffen in der Luft [5]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der so genannte „Western-Lifestyle“, der mit einer gesteigerten Hygiene sowie frühzeitiger Gabe von Antibiotika im Kindesalter einhergeht, mit einem vermehrten Auftreten von Allergien vergesellschaftet ist [6, 7]. Hier zeigt sich, dass die Art und Häufigkeit der Stimulation des kindlichen Immunsystems in der Phase seiner Entwicklung eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Allergien zu spielen scheint.

Da die allergische Rhinitis sowohl für die Betroffenen individuell, als auch aus sozioökonomischer Sicht ein immer größer werdendes Problem darstellt [8], erscheint ein besseres Verständnis der Pathophysiologie gerade in Hinblick auf die Entwicklung neuer, spezifischer wirkender Therapien sinnvoll.

Definition der allergischen Rhinitis

Die Allergie ist gekennzeichnet durch eine übersteigerte, unangemessene Reaktion des Immunsystems auf eine körperfremde Substanz, die an sich keine wirkliche Bedrohung für den menschlichen Körper darstellt. Diese körperfremde Substanz wird als so genanntes Antigen bzw. Allergen bezeichnet.

Bei der allergischen Rhinitis betrifft diese Immunreaktion primär den oberen Respirationstrakt. Das Allergen erhält also hierbei Kontakt zu immunkompetenten Zellen insbesondere der Nasen- und Rachenschleimhaut. Die typischen Symptome

Einleitung

sind Nies- und Juckreiz, eine gesteigerte Produktion von nasalem Sekret sowie die Behinderung der Nasenatmung durch Anschwellen der Nasenschleimhaut. Außerdem kommt es häufig zu einer begleitenden Konjunktivitis sowie, insbesondere bei länger bestehender allergischer Rhinitis, zu einer Mitbeteiligung von Trachea und Bronchien [9, 10]. Dieses als allergisches Asthma bronchiale bezeichnete Krankheitsbild stellt eine potentiell lebensbedrohliche Erkrankung mit unter Umständen starker Einschränkung der Lebensqualität dar.

Je nach entsprechendem Allergen kann es zur Ausprägung einer nur in bestimmtem Monaten vorkommenden so genannten „saisonalen“ (Pollen von Bäumen, Gräsern oder Kräutern) oder einer ganzjährigen so genannten „perennialen“ Form (Hausstaubmilben, Schimmelpilze, Tierepithelien) der allergischen Rhinitis kommen. Die neuere Klassifikation der ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma) verlässt diese Betrachtung, die sich an den vorliegenden Allergenen orientiert, und favorisiert stattdessen eine Einteilung in eine „intermittierende“ und eine „persistierende“ Form der allergischen Rhinitis analog zur Einteilung des Asthma bronchiale [11, 12].

Diagnostik

An erster Stelle der Diagnostik der allergischen Rhinitis steht die Durchführung einer ausführlichen Anamnese, die sowohl eine möglichst genaue zeitliche (saisonal oder perennial) und örtliche Zuordnung (Pollen, Tierhaare, Hausstaubmilben) der Symptomatik, als auch die Befragung nach Allergikern in der Familie beinhalten sollte. Ergänzend können Angaben zur Wohnsituation (Teppiche und Pflanzen im Schlafzimmer) sowie zur Ausübung bestimmter Hobbys (Kontakt zu Tieren) wichtige Hinweise auf relevante Allergene geben. So gelingt einem häufig bereits anamnestisch eine orientierende Zuordnung der Erkrankung zu einem oder mehreren Allergenen.

Die HNO-ärztliche Untersuchung, die ebenfalls wichtiger Bestandteil der Diagnostik ist, zeigt beim symptomatischen Allergiker eine gerötete Nasenschleimhaut mit meist

Einleitung

hyperplastischen unteren Nasenmuscheln, die eine behinderte Nasenatmung zur Folge haben. Differentialdiagnostisch sollte endoskopisch eine chronische Sinusitis mit oder ohne Polyposis nasi sowie hyperplastische Adenoide bei Kindern abgeklärt werden, da diese Erkrankungen ähnliche Symptome hervorrufen können. Liegt jedoch nachweislich eine dieser Erkrankungen vor, so schließt dies eine zusätzlich bestehende Allergie keineswegs aus.

Zum Nachweis einer allergischen Sensibilisierung auf bestimmte Allergene dient als Screening-Methode der Wahl der Skin-Prick-Test. Hierbei werden Lösungen von Allergenen gegen eine NaCl- und eine Histamin-Kontrolle auf die Haut des Unterarms getropft und die Epidermis mit einer Lanzette oder Nadel so durchstoßen, dass die jeweilige Lösung Kontakt zu immunkompetenten Zellen in der Haut bekommt. Nach 15 bis 20 Minuten kann man das Ergebnis durch Ausmessen von Rötung und Quaddel für jedes Allergen ablesen. Wichtig ist hierbei die Differenzierung einer echten Quaddelbildung und Rötung als Folge einer allergischen Sofortreaktion von unspezifischen Stichkanalreaktionen, die meist nur als kleine Rötungen ohne deutliche Quaddelbildung imponieren.

Bei zweifelhaftem Ergebnis im Prick-Test oder bei großer Diskrepanz zwischen Testergebnis und klinischer Symptomatik des Patienten, kann man ergänzend für ausgewählte Allergene mittels RAST (Radio-Allergo-Sorbent-Assay) oder EAST (Enzym-Allergo-Sorbent-Assay) die Konzentration von spezifischen IgE im Serum bestimmen. Bei diesem Testverfahren wird ein auf schwammartigen Scheiben gebundenes Allergen mit dem Patientenserum inkubiert. Anschließend weist man die an das Allergen gebundenen spezifischen IgE mit radioaktiv- bzw. enzymmarkierten Antikörpern nach. Jedoch kommt auch diesem Test nur eine bedingte Aussagekraft zu. Denn normale Werte schließen einerseits eine Allergie nicht ganz sicher aus, andererseits können erhöhte Werte neben einer allergischen Sensibilisierung durchaus verschiedene Ursachen haben. So empfiehlt es sich, die Ergebnisse stets in Zusammenschau mit den Symptomen des Patienten zu sehen und entsprechend zu interpretieren.

Einleitung

Um bei positivem Skin-Prick-Test die Relevanz eines Allergens für die Nasenschleimhaut des Patienten möglichst objektiv zur Darstellung zu bringen, kann man einen nasalen Allergen-Provokations-Test (NPT) durchführen. Hierbei wird dem Patienten eine lyophilisierte Allergenlösung mit einem Zerstäuber auf die Schleimhaut der unteren Nasenmuschel aufgesprüht. Bei parallel durchgeführter Rhinomanometrie vor und nach Provokation lässt sich so die allergiebedingt anschwellende Nasenschleimhaut mit daraus resultierender Reduktion des nasalen Flows objektiv darstellen [13]. Um hier die allergische Rhinitis als Folge der Allergenexposition von einer einfachen nasalen Hyperreaktivität differenzieren zu können, sollte der Test, wie auch der Skin-Prick-Test, gegen eine NaCl-Kontrolle erfolgen. Es wird also neben der Leermessung ohne Provokation zusätzlich eine Messung nach nasaler Provokation mit NaCl durchgeführt. Bei Patienten mit allergisch bedingter Rhinitis zeigt sich erst nach Provokation mit der Allergenlösung eine deutliche Reduktion des nasalen Flows.

Therapie

Einer der wichtigsten Grundpfeiler der Therapie der allergischen Rhinitis besteht in der Vermeidung oder Verminderung des auslösenden Allergens. Bei saisonalen Allergenen wie Baum- oder Gräserpollen bieten sich hier in den Zeiten der stärksten Allergenbelastung einfache Maßnahmen wie das Geschlossenhalten der Fenster, der Kleidungswechsel außerhalb des Schlafzimmers sowie das Waschen der Haare vor dem Zubettgehen an. Außerdem kann der Einbau von Pollenfiltern im Auto eine deutliche Reduktion der Allergenexposition bewirken.

Zur Meidung perennialer Allergene, wie beispielsweise bei der Hausstaubmilbenallergie, nutzt man das so genannte „Encasing“. Hierbei werden Kopfkissen, Decke und Matratze mit einem speziellen „milbendichten“ Bezug umschlossen, um eine Minimierung der Allergenexposition zu erreichen. Zusätzlich sollte auf einen häufigen Bettwäschewechsel geachtet werden.

Um andere perenniale Allergene wie bestimmte Schimmelpilze zu meiden, sollte der allergisch sensibilisierte Patient wenn möglich auf Pflanzen oder Teppiche in seinem

Einleitung

Schlafzimmer verzichten, da diese häufig eine hohe Belastung an derartigen Allergenen aufweisen.

In Situationen, in denen sich eine Allergenexposition nicht vermeiden lässt, stehen topische Steroide in Form von Nasensprays zur Verfügung, die nach regelmäßiger Anwendung insbesondere eine Verbesserung der Nasenatmung und eine Verminderung der nasalen Sekretion zur Folge haben ohne ein mit systemischen Steroiden vergleichbares Nebenwirkungsspektrum zu bieten. Diese Wirkungen resultieren aus einer reduzierten Synthese proinflammatorischer Mediatoren und somit einer Reduktion der allergischen Entzündungsreaktion der Nasenschleimhaut.

Bei unzureichendem Erfolg können anstelle oder in Ergänzung zur lokalen Therapie systemisch verabreichte Antihistaminika dem Patienten eine Linderung der Symptome bringen. Diese Medikamente wirken über eine kompetitive Hemmung von H_1 -Rezeptoren, was zu einer verminderten Stimulation sensorischer Nervenfasern in der Nasenschleimhaut führt. Darüber hinaus wird der Permeabilitätserhöhung der Gefäße sowie der Vasodilatation entgegengewirkt, was in der Nasenschleimhaut insbesondere die nasale Sekretion sowie die Obstruktion reduziert.

Außerdem stehen zur Therapie der allergischen Rhinitis Chromone zur Verfügung, die einen membranstabilisierenden Effekt auf Mastzellen haben und somit die Degranulation und die damit verbundene Histaminausschüttung hemmen. Die klinische Anwendbarkeit dieser Substanzen ist jedoch dadurch eingeschränkt, dass sie nur prophylaktische Wirkung zeigen und keinen Effekt auf eine bereits etablierte allergische Reaktion der Nasenschleimhaut haben.

Insbesondere bei langfristig bestehender allergischer Rhinitis mit stark beeinträchtigender klinischer Symptomatik des Patienten ist eine Hyposensibilisierung zu erwägen. Diese Therapie ist zwar mit einem großem Aufwand für den Patienten verbunden, da sie über mehrere Jahre hinweg fortgeführt werden muss, erzielt aber in vielen Fällen einen nachhaltigeren Erfolg. Dem Patienten werden dabei in festgelegten Abständen anfangs sehr geringe und im Verlauf zunehmende Dosen des entsprechenden Allergens verabreicht. Ziel dieser

Einleitung

Therapie ist es, eine Toleranz gegenüber den für den Patienten beeinträchtigenden Allergenen zu erreichen. Immunologisch erklärt man sich die Wirkungsweise dieser Therapie durch die Erzielung eines Isotypenswitches der B-Zellen von IgE- zu IgG-Antikörpern, der vor allem durch die sehr niedrigen Anfangsdosen des Allergens induziert wird. Durch diesen Isotypenswitch werden die Allergene bereits von IgG-Antikörpern erkannt, gebunden und von Makrophagen phagozytiert, bevor sie Kontakt zu membranständigen IgE-Antikörpern auf den Mastzellen bekommen.

Die Verabreichung der Hyposensibilisierungstherapie erfolgt als subkutane Injektion von lyophilisierten Allergenlösungen. Für einige Allergene (insbesondere Gräserpollen) steht bereits eine Therapie in Form von Tabletten oder Tropfen zur Verfügung. Bei dieser so genannten SLIT (sublinguale Immuntherapie) werden die Allergene über die Mundschleimhaut aufgenommen.

Immunologische Grundlagen

Die allergische Rhinitis ist nach der klassischen Einteilung der Immunreaktionen von Coombs und Gell eine typische Reaktion vom Soforttyp (Typ I), also eine Überempfindlichkeitsreaktion nach vorheriger Sensibilisierung durch Induktion der Bildung spezifischer IgE-Antikörper.

Um eine Allergie zu entwickeln muss der Organismus also zunächst mit einem Allergen in Kontakt kommen, welches in der Schleimhaut von antigenpräsentierenden Zellen z.B. Makrophagen oder dendritischen Zellen phagozytiert und anschließend immunkompetenten B-Lymphozyten präsentiert wird. Die B-Lymphozyten wandeln sich anschließend in Plasmazellen um und produzieren für das phagozytierte Allergen spezifisches IgE, welches an die hochaffinen FcεRI-IgE-Rezeptoren der Mastzellen bindet [14]. Kommt der so gegen ein Allergen sensibilisierte Organismus mit diesem erneut in Kontakt, führt dies zur Auslösung einer allergischen Reaktion.

Einleitung

Diese allergische Reaktion, wie sie im Rahmen der allergischen Rhinitis in der Nasenschleimhaut der Patienten stattfindet, lässt sich in eine Sofortphase und eine Spätphase einteilen.

Die Sofortphase ist gekennzeichnet durch die Bindung von in die Schleimhaut eingedrungenen Allergenmolekülen an die membranständigen IgE-Antikörper auf den Mastzellen. Die Querverbindung („crosslinking“) dieser IgE-Antikörper führt zum Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen mit nachfolgender Degranulation, bei der es zur raschen Freisetzung von Entzündungsmediatoren kommt [15]. Diese Mediatoren (insbesondere Histamin, Prostaglandine, Leukotriene und präformierte Zytokine) lassen sich bereits kurze Zeit nach Allergenexposition vermehrt in nasalem Sekret nachweisen und führen durch ihre Wirkung auf Nerven, Blutgefäße und Drüsen der Nasenschleimhaut zu den typischen Symptomen der allergischen Sofortreaktion wie Nies- und Juckreiz, einer gesteigerten nasalen Sekretion sowie einer Behinderung der Nasenatmung durch Anschwellen der Schleimhaut [16, 17].

Diese akuten Symptome halten einige Sekunden bis Minuten nach Allergenkontakt an und klingen danach wieder ab.

Stunden nach Allergenkontakt kommt es in der Nasenschleimhaut zur Spätphase der allergischen Reaktion, die immunologisch am ehesten einer chronischen Entzündung entspricht und als klinisches Korrelat ein Wiederauftreten der Symptome ohne erneuten Allergenkontakt hat.

In dieser Phase lässt sich ein erneutes Ansteigen der Histamin- und Leukotrienkonzentration nachweisen [18] und es kommt zur verstärkten Einwanderung von Entzündungszellen ins Gewebe, wobei hier die eosinophilen Granulozyten dominieren, jedoch auch T-Lymphozyten und Basophile nachzuweisen sind. Zum größten Teil verantwortlich für diesen Einstrom an Zellen in die allergische Nasenschleimhaut sind die zuvor von den ortsständigen Zellen produzierten Zytokine. Quelle dieser natürlichen Proteine sind vor allem Mastzellen, basophile Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen sowie Eosinophile und Epithelzellen.

Eine bedeutende Rolle bei der Steuerung des Zytokinmusters dieser allergischen Entzündungsreaktion spielen so genannte T-Helfer-Zellen. Diese Zellen lassen sich anhand der von ihnen synthetisierten Zytokine in zwei Gruppen einteilen: Th_1 -Zellen,

Einleitung

die vor allem eine zellulär vermittelte Immunreaktion hervorrufen (klassische Tuberkulinreaktion) sowie Th₂-Zellen, die besonders eine humorale Immunreaktion zur Folge haben (klassische allergische Reaktion). Erstmals wurden diese beiden T-Helfer-Zell-Subgruppen 1986 von Mosmann et al. anhand von unterschiedlichen Mustern in der Zytokinproduktion bei T-Zellen von Mäusen beschrieben [19]. Die Ausdifferenzierung noch unreifer Th₀-Zellen in Richtung Th₁ oder Th₂ wird durch verschiedene Faktoren wie der bereits vorhandenen Zytokinumgebung, der Dosis des Allergens und der Dauer der Exposition beeinflusst [20, 21]. Außerdem gibt es eine Reihe weiterer T-Zellen: T-Gedächtnis-, T-Suppressor- und zytotoxische T-Zellen, sowie regulatorische T-Zellen, denen man in letzter Zeit neben den T-Helfer-Zellen eine besondere Aufmerksamkeit schenkt, da man in ihnen einen möglichen Potential für die Prävention oder Therapie allergischer Krankheiten sieht [22].

Dass bei der allergischen Rhinitis vermehrt Th₂-Zytokine wie IL-4 und IL-5 produziert und sezerniert werden, die sich in der Nasenschleimhaut nachweisen lassen, ist nicht mehr zweifelhaft und konnte in diversen Studien gezeigt werden. Nicht eindeutig dagegen ist die Beobachtung, dass es im Rahmen der allergischen Spätphasereaktion außerdem zur Sekretion von Th1-Zytokinen kommt. So ließ sich in Versuchen mit PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) von allergischen Patienten nach Allergenstimulation neben IL-4-mRNA ebenfalls eine erhöhte IFN- γ -mRNA-Konzentrationen nachweisen [23]. Demgegenüber konnte Durham bei Allergikern nach Immuntherapie einen Anstieg der mRNA für IFN- γ beobachten, was dem Th1-Zytokin einen eher protektiven Effekt im Rahmen allergischer Reaktionen zuschreibt [24]. In unserer eigenen Arbeitsgruppe konnten wir wiederum zeigen, dass sich mit sensitiveren Verfahren auch in der entzündlichen Nasenschleimhaut von Patienten mit allergischer Rhinitis sowohl erhöhte Werte für Th₂- als auch für Th₁-Zytokine wie IFN- γ und IL-12 nachweisen lassen [23, 25]. Dies lässt den Schluss zu, dass die allergische Reaktion der Nasenschleimhaut nicht allein als Th₂-getragene Immunreaktion zu sehen ist, sondern vielmehr als ein komplexes Zusammenspiel zwischen beiden T-Helfer-Zell-Subgruppen verstanden werden muss.

Ein möglicher Grund für die zusätzliche Sekretion von Th1-Zytokinen neben den klassischerweise für die allergische Reaktion verantwortlich gemachten Th₂-Zytokinen IL-4 und IL-5 könnte in der Chronizität der allergischen Stimulation liegen, bei der es über Wochen und Monate hinweg zu einer kontinuierlichen

Einleitung

Allergenexposition kommt. Da dieser Steuerung und der Gewichtung von Th1- und Th2-Zytokinen in der Nasenschleimhaut eine zentrale Rolle für das Verständnis der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis zukommt und ein potentielles Gebiet für die Entwicklung gezielter wirkender Therapien liegt, untersuchten wir die Zytokinmuster der Nasenschleimhaut von allergischen Patienten während der Saison sowie nach einmaliger nasaler Allergenprovokation mit folgenden Fragestellungen:

Fragestellung

Ziel unserer Studie war die Überprüfung der Hypothese, dass eine einmalige, experimentelle nasale Allergenprovokation zur Ausprägung einer Th2-Zytokinproduktion führt, während bei natürlicher Allergenexposition während der Saison sowohl Th2- als auch Th1-Zytokine synthetisiert werden.

Dabei stellten wir uns folgende Fragen:

- Lässt sich bei allergischen Patienten mit präoperativ durchgeführter nasaler Allergenprovokation eine erhöhte Synthetisierung von Zytokinen in der Nasenschleimhaut induzieren?
- Werden bei allergischen Patienten während der Saison, also während kontinuierlicher, natürlicher Allergenstimulation, in Relation mehr Th1- als Th2-Zytokine synthetisiert?

Zusätzlich untersuchten wir die Zytokinproduktion auf der kontralateralen unprovzierten Seite mit folgender Fragestellung:

- Können wir mit unserem Versuchsaufbau die bereits in früheren Studien [16, 26] demonstrierte Beobachtung bekräftigen, dass eine einseitig durchgeführte nasale Allergenprovokation ebenfalls eine vermehrte Freisetzung von Zytokinen auf der Gegenseite (z.B. durch nervale Reflexe) zur Folge hat?

Material und Methoden

Probandenauswahl

Wir untersuchten in einem Zeitraum von zwei Jahren Patienten, bei denen im Rahmen eines operativen Eingriffs der Nase eine Conchotomie durchgeführt wurde. Bei diesen Patienten erhoben wir präoperativ eine ausführliche Allergie-Diagnostik (Anamnese, Untersuchung, Skin-Prick-Test, nasaler Allergen-Provokationstest).

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten mit einer symptomatischen intermittierenden (saisonalen) allergischen Rhinitis, die zur Zeit der Operation nicht den für sie relevanten Allergenen ausgesetzt waren, sowie eine Kontrollgruppe von nicht-allergischen Patienten.

Ausgeschlossen wurden Patienten mit einer allergischen Sensibilisierung gegenüber persistierenden (perennialen) Allergenen, Patienten mit einer Sinusitis, Patienten mit einem mittelschweren oder schweren Asthma bronchiale. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Kinder (Patienten unter 18 Jahre), schwangere Patientinnen und Patienten mit schweren Allgemeinerkrankungen.

Außerdem durften folgende Medikamente in den letzten vier Wochen nicht von den Patienten eingenommen worden sein: Glukocorticosteroide: systemisch und topisch, Antihistaminika, Leukotrien-Antagonisten, Chromone, Beta-Blocker, sowie alle weiteren Medikamente, die relevante Effekte auf die allergische Reaktion ausüben oder die Notfallbehandlung einer anaphylaktischen Reaktion komplizieren könnten.

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt. Die Teilnahme an der Studie erfolgte freiwillig, so dass jeder teilnehmende Patient nach einem Aufklärungsgespräch eine schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnete.

Insgesamt konnten wir auf diese Weise 27 Patienten für unsere Studie rekrutieren: 14 Patienten mit einer symptomatischen intermittierenden (saisonalen) allergischen Rhinitis (AR + NPT) sowie 13 nicht allergische Kontrollpatienten (Ko + NPT).

Die Daten unserer Studie verglichen wir mit Daten von nicht-allergischen, nicht provozierten Patienten (Ko) sowie mit Allergikern, die innerhalb der Saison operiert

wurden, also einer natürlichen, kontinuierlichen Allergenexposition ausgesetzt waren (AR). Diese Daten der beiden Vergleichsgruppen wurden zuvor in unserem Labor nach der gleichen Methode mithilfe des ELISPOT-Assays erhoben wie in der aktuellen Studie.

Nasale Provokation und Rhinomanometrie

Bei allen Patienten wurde am Tag vor der Operation eine nasale Allergenprovokation mit lyophilisierten Allergenlösungen (Allergopharma) durchgeführt.

Dabei wählten wir bei den 14 Patienten mit saisonaler allergischer Rhinitis ein Allergen, gegen das eine allergische Sensibilisierung vorlag, Nicht-allergische Patienten wurden mit einem beliebigen saisonal vorkommenden Allergen nasal provoziert.

Um eine ausreichend kräftige allergische Reaktion hervorzurufen, führten wir eine Provokation mit 50.000 BE des entsprechenden Allergens durch, ohne vorherige Provokation mit NaCl.

Den Effekt des Allergens dokumentierten wir, indem wir bei den Patienten vor und nach der Provokation eine Rhinomanometrie (EVG, Rhinotest 2000 plus, Version 6.3.2.300) gemäß den offiziellen Kriterien der Arbeitsgemeinschaft Allergologie, Immunologie und Umweltmedizin (AGAI) der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie (DGAKI) mit entsprechender Modifikation durchführten und das Ergebnis entsprechend beurteilten. [13]

Operation

Die Operation der Patienten wurde in einem Zeitintervall von 15 bis 20 Stunden nach der nasalen Provokation durchgeführt. Die meisten Patienten in unserer Studie erhielten eine Conchotomie mit oder ohne Septumplastik. Bei einigen Patienten wurde eine Conchotomie im Rahmen einer Septorhinoplastik durchgeführt. Dabei

wurden die unteren Nasenmuscheln seitengetreunt entnommen und in 0,9%iger NaCl-Lösung ins Labor transportiert. Hier erfolgte eine sofortige Weiterverarbeitung der Zellen, um einen möglichst hohen Anteil viabler Immunzellen zu erhalten.

Herstellung einer Einzelzellsuspension

Im Labor wurden die Präparate einem kombiniert mechanisch enzymatischen Verfahren zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension unterzogen.

Hierzu inkubierten wir das zuvor zerkleinerte, von Knochen befreite Gewebe zunächst in einer Enzymmischung aus Collagenase/ Dispase (Roche Diagnostics, Mannheim) und DNase (Sigma, St. Louis, USA) bei 37°C unter 5% CO₂ mit Bewegung eine Stunde lang im Brutschrank. Anschließend erfolgte die Filtration über ein 100µm-Sieb mit Puffer (PBS). Noch nicht vereinzelte Zellen wurden mit einer zweiten Enzymmischung aus Hyaluronidase (Sigma) und Trypsin-EDTA (Boehringer Mannheim) erneut eine Stunde bei 37° unter 5% CO₂ mit Bewegung inkubiert und anschließend wieder über ein 100µm-Sieb filtriert.

Die so gewonnenen Zellen wurden durch Zugabe von Red cell lysing-buffer (Sigma) und anschließende Zentrifugation (1000 U/min, 5min, 20°C) von Erythrozyten befreit und in Medium (RPMI 1640, ICN, Costa Mesa, USA mit L-Glutamin, ICN und Penicillin/ Streptomycin, Gibco BRL, Paisley, UK) überführt.

Zytokinbestimmung mittels ELISPOT-Assay

Die Bestimmung der Zytokine und Immunglobuline erfolgte mittels des in unserem Labor etablierten ELISPOT-Assays [25]. Die dabei verwendeten Primär-, Sekundär- und Tertiärantikörper sind in folgenden Tabellen dargestellt (Tabelle 1 – 3):

Material und Methoden

Zytokin/ Immunglobulin	Primär-Antikörper	Bezugsquelle
IL-4	Anti human IL-4 (Kaninchen, polyklonal)	Chemicon, Hofheim/Ts
IL-8	Anti human IL-8 (Kaninchen, polyklonal)	Chemicon, Hofheim/Ts
IL-5	Anti human IL-5 (Maus, monoklonal)	R&D Systems, Wiesbaden
IL-12	Anti human IL-12/IL-23p40 (Maus, monoklonal)	R&D Systems, Wiesbaden
IFN- γ	Anti human IFN- γ (Maus, monoklonal)	R&D Systems, Wiesbaden
IL-13	Anti human IL-13 (Maus, monoklonal)	R&D Systems, Wiesbaden
IgE	Anti human IgE (Kaninchen, polyklonal)	DAKO, Hamburg

Tabelle 1: Primär-Antikörper für den ELISPOT-Assay.

Zytokin/ Immunglobulin	Sekundär-Antikörper	Bezugsquelle
IL-4	Anti human IL-4 (Ziege, polyklonal)	R&D Systems, Wiesbaden
IL-8	Anti human IL-8 (Ziege, polyklonal)	R&D Systems, Wiesbaden
IL-5	Anti human IL-5 (Ziege, polyklonal)	R&D Systems, Wiesbaden
IL-12	Anti human IL-12 (Ziege, polyklonal)	R&D Systems, Wiesbaden
IFN- γ	Anti human IFN- γ (Kaninchen, polyklonal)	R&D Systems, Wiesbaden
IL-13	Anti human IL-13 (Ziege, polyklonal)	R&D Systems, Wiesbaden
IgE	Peroxidase-konjugiert anti human IgE (Kaninchen)	DAKO, Hamburg

Tabelle 2: Sekundär-Antikörper für den ELISPOT-Assay.

Zytokin/ Immunglobulin	Tertiär-Antikörper	Bezugsquelle
IL-4	Peroxidase-konjugiert anti Ziege IgG (monoklonal)	Sigma, Deisenhofen
IL-8	siehe IL-4	
IL-5	siehe IL-4	
IL-12	siehe IL-4	
IFN- γ	siehe IL-4	
IL-13	siehe IL-4	
IgE	entfällt, da Sekundär-AK schon peroxidase-konjugiert	

Tabelle 3: Tertiär-Antikörper für den ELISPOT-Assay.

Die 96-well-Platten (Nunc MaxiSorp, Nunc, Wiesbaden) wurden hierbei zunächst mit dem Primär-Antikörper beschichtet und bei -18°C eingefroren.

Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblaufärbung (Gibco RBL, Paisley, UK) und Herstellung entsprechender Verdünnungen wurden die Zellsuspensionen auf die aufgetauten und ausgeschlagenen 96-well-Platten pipettiert. Hierbei fertigten wir für jedes Zytokin zwei Wells mit unterschiedlichen Zellzahlen in jeweils doppeltem Ansatz an, um Unregelmäßigkeiten innerhalb der Einzelzellsuspension auszugleichen. Pro Well wurden jeweils 100 μ l Zellsuspension eingesetzt, wobei wir für die unterschiedlichen Zytokine/ Immunglobuline die in der folgenden Tabelle aufgeführten Zellzahlen einsetzten (Tabelle 4):

Zytokin/ Immunglobulin	Zellen pro Well
IL-4, IL-5, IL-12, IFN- γ	50.000 und 100.000
IL-8	1.000 und 2.000
IL-13, IgE	5.000 und 10.000

Tabelle 4: Zellzahlen pro well für den ELISPOT-Assay.

Material und Methoden

Nach zweistündiger Inkubation der Zellsuspension im Brutschrank (37°, 5% CO₂, ohne Bewegung) wurden die Platten fünfmal mit Elispot-Puffer gewaschen und ausgeschlagen, bevor der Sekundär-Antikörper für jedes Zytokin pipettiert wurde. Auf die Wells der Negativkontrollen wurde hier kein Sekundärantikörper pipettiert, so dass man in den Wells bei der Auswertung einen Eindruck über das Ausmaß der unspezifischen Farbumschläge in jedem einzelnen Assay bekam. Damit die Wells der Negativkontrollen während der folgenden Inkubation nicht austrockneten wurde hier nur der AK-Puffer ohne zweiten Antikörper pipettiert. Die Inkubation erfolgte nun im Kühlschrank bei 4° über Nacht.

Am nächsten Tag nach erneutem fünfmaligem Waschen und Ausschlagen pipettierten wir eine Mischung aus warmer Agarose-Lösung und Blue substrate (ohne Luftblasen) auf die Platten. Nach weiterer einstündiger Inkubation bei 37° im Brutschrank ließen wir dann die Platten bei Raumtemperatur ausgetrocknen.

Außerdem fertigten wir für jedes Zytokin in jedem Assay zwei Medium- und zwei Positiv-Kontrollen an, in die Medium ohne Zellen (RPMI mit Glutamin, ICN & Penicillin/ Streptomycin) bzw. rekombinante Zytokine pipettiert wurden. Eine Aufstellung der Positivkontrollen ist in folgender Tabelle dargestellt (Tabelle 5):

Zytokin/ Immunglobulin	Reagenz	Bezugsquelle
IL-4	Q-Kit controls – Group 1	R&D Systems, Wiesbaden
IL-8	siehe IL-4	
IL-5	Recombinant human IL-5	R&D Systems, Wiesbaden
IL-12	Recombinant human IL-12/IL-23 p40	R&D Systems, Wiesbaden
IFN-γ	Recombinant human IFN-γ	R&D Systems, Wiesbaden
IL-13	Recombinant human IL-13	R&D Systems, Wiesbaden
IgE	Gepooltes Humanserum	Atopische Freiwillige

Tabelle 5: Reagenzien für die Positiv-Kontrollen des ELISPOT-Assays.

Auswertung

Die Auswertung der Platten erfolgte am dritten Tag im Labor unter dem Mikroskop. Hierzu wurden die Platten mit dem Boden nach oben unter dem Mikroskop betrachtet und die Spots in jedem Well unter Berücksichtigung von Artefakten ausgezählt.

Material und Methoden

Hieraus errechneten wir für jedes Zytokin die Anzahl der Spots für 10^5 Zellen, indem wir den Mittelwert aus allen für ein Zytokin/ Immunglobulin angelegten Wells bildeten. Damit stellen die angegebenen Werte für die einzelnen Zytokine jeweils die Anzahl an Zellen von 10^5 Zellen dar, die das entsprechende Zytokin während der Inkubation auf der 96-well-Platte sezerniert haben.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Prism (Version 4.0b; GraphPad Software, Inc.) auf einem Macintosh Computer.

Alle numerischen Werte sind, sofern nicht anders vermerkt, Mittelwerte plus/minus Standardfehler des Mittelwertes (SEM), so dass eine Einschätzung der Variabilität der Daten möglich ist.

Zur Analyse der Daten verwendeten wir nicht-parametrische statistische Verfahren; bei den angegebenen p-Werten handelt es sich um zweiseitige p-Werte mit einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$.

Ergebnisse

Flow vor und nach nasaler Allergenprovokation

Bei saisonalen Allergikern außerhalb der Saison sowie nicht-allergischen Patienten, die jeweils am Tag vor ihrer Operation eine nasale Allergenprovokation erhielten, bestimmten wir vor und nach Provokation den nasalen Flow mittels Rhinomanometrie bei 150 Pa (ccm/s).

Hier zeigten sich bei Patienten mit allergischer Rhinitis signifikant erniedrigte Werte ($p=0,0006$) des nasalen Flows nach Allergenprovokation im Vergleich zur Leermessung vor Provokation (Abbildung 1). AR vor NPT: $493,4 \pm 92,9$, AR nach NPT $194,6 \pm 23,0$, MWU: $p=0,0006$.

Bei Patienten ohne allergische Rhinitis wurde hingegen keine signifikante Reduktion ($p=0,7583$) des Flows nach nasaler Provokation im Vergleich zum Ausgangswert gemessen (Abbildung 1). Ko vor NPT: $418 \pm 75,5$, Ko nach NPT: $426,3 \pm 74,1$.

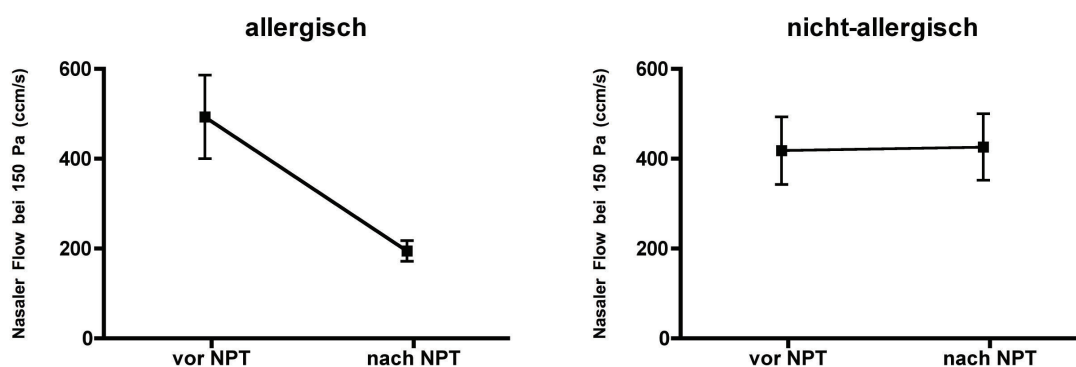


Abbildung 1: Nasaler Flow bei allergischen Patienten (n=14) und nicht-allergischen Patienten (n=13) vor und nach nasaler Allergenprovokation. (Median und SEM)

Zytokinproduktion nach nasaler Allergenprovokation

Die Zytokinmuster in der Nasenschleimhaut von Patienten mit allergischer Rhinitis und nicht allergischen Patienten jeweils nach nasaler Allergenprovokation bestimmten wir mit Hilfe des ELISPOT-Assays. Dabei untersuchten wir die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, die Th1-Zytokine IFN- γ und IL-12 sowie das Immunglobulin IgE und das Chemokin IL-8. Mit dieser Methode konnten wir alle gemessenen Zytokine in deutlich messbaren Konzentrationen nachweisen.

Th2-Zytokine: IL-4, IL-13 und IL-5

Für IL-4 ergaben sich signifikant erhöhte Werte bei allergischen Patienten während der Saison im Vergleich zu nicht-allergischen Kontrollen ($p=0,0006$), (Abbildung 2). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Allergikern nach nasaler Allergenprovokation, welche ebenfalls signifikant höhere IL-4 Konzentrationen in der Nasenschleimhaut zeigten als nasal provozierte Nicht-Allergiker ($p=0,0273$), (Abbildung 3). IL-4-produzierende Zellen/ 10^5 Zellen: Ko: $34,4 \pm 14,9$; Ko+NPT: $17,0 \pm 3,4$; AR+NPT: $37,9 \pm 7,2$; AR: $118,3 \pm 29,1$).

Die Messungen für IL-13 zeigten jeweils keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit allergischer Rhinitis und nicht-allergischen Kontrollpatienten. So konnten wir für Allergiker nach nasaler Allergenprovokation und nicht-allergische Patienten nach Allergenprovokation ähnlich hohe Werte messen ($p=0,2345$), (Abbildung 3). Auch in der Gruppe nicht provozierter Patienten ergab sich zwischen Allergikern und Nicht-Allergikern kein signifikanter Unterschied ($p=0,3017$), (Abbildung 2). IL-13-produzierende Zellen/ 10^5 Zellen: Ko: $676,8 \pm 246,8$; Ko+NPT: $1158 \pm 194,8$; AR+NPT: $836,8 \pm 135,5$; AR: $2126 \pm 991,4$.

Die Ergebnisse in der Messung für IL-5 zeigten ein ähnliches Bild wie bei IL-4. Patienten mit allergischer Rhinitis hatten hier in der Gruppe allergischer Patienten signifikant höhere Werte, als in der Kontrollgruppe nicht-allergischer Patienten. Dieses Phänomen war in gleicher Weise bei Patienten nach nasaler

Ergebnisse

Allergenprovokation ($p=0,0144$), (Abbildung 3) sowie bei nicht nasal provozierten Patienten ($p=0,0109$), (Abbildung 2) zu beobachten. IL-5-produzierende Zellen/ 10^5 Zellen: Ko: $12,2\pm6,1$; Ko+NPT: $18,7\pm6,3$; AR+NPT: $70,6\pm24,5$; AR: $69,4\pm31,1$.

Th1-Zytokine: IFN- γ und IL-12

Für das Th1-Zytokin IFN- γ zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen nasal provozierten Patienten und Patienten ohne nasale Allergenprovokation. Während der Vergleich von Allergikern in der Saison mit nicht-allergischen Kontrollen signifikant höhere Werte in der Gruppe der Allergiker ergab ($p=0,0002$), (Abbildung 2), zeigte sich beim Vergleich der beiden Gruppen nach nasaler Allergenprovokation kein signifikanter Unterschied ($p=0,7525$), (Abbildung 3). Beim Vergleich der Mittelwerte für IFN- γ fanden sich die höchsten Werte in der Gruppe der allergischen Patienten in der Saison. Allergiker und Nicht-Allergiker jeweils nach nasaler Allergenprovokation zeigten deutlich niedrigere Werte auf ähnlichem Niveau. IFN- γ -produzierende Zellen/ 10^5 Zellen: Ko: $21,4\pm8,4$; Ko+NPT $43,9\pm8,3$; AR+NPT: $54,1\pm16,3$; AR: $115,5\pm37,4$.

IL-12 war in allen Gruppen in deutlich messbaren Konzentrationen nachzuweisen. Signifikante Unterschiede gab es weder in der Gruppe der Patienten nach nasaler Allergenprovokation ($p=0,2649$), (Abbildung 3), noch in der Gruppe von Allergikern und Nicht-Allergikern ohne nasale Provokation ($p=0,1709$), (Abbildung 2). IL-12-produzierende Zellen/ 10^5 Zellen: Ko: $90,1\pm67,5$; Ko+NPT: $56\pm15,4$; AR+NPT: $107,4\pm34,3$; AR: $58,6\pm29,7$.

Ergebnisse

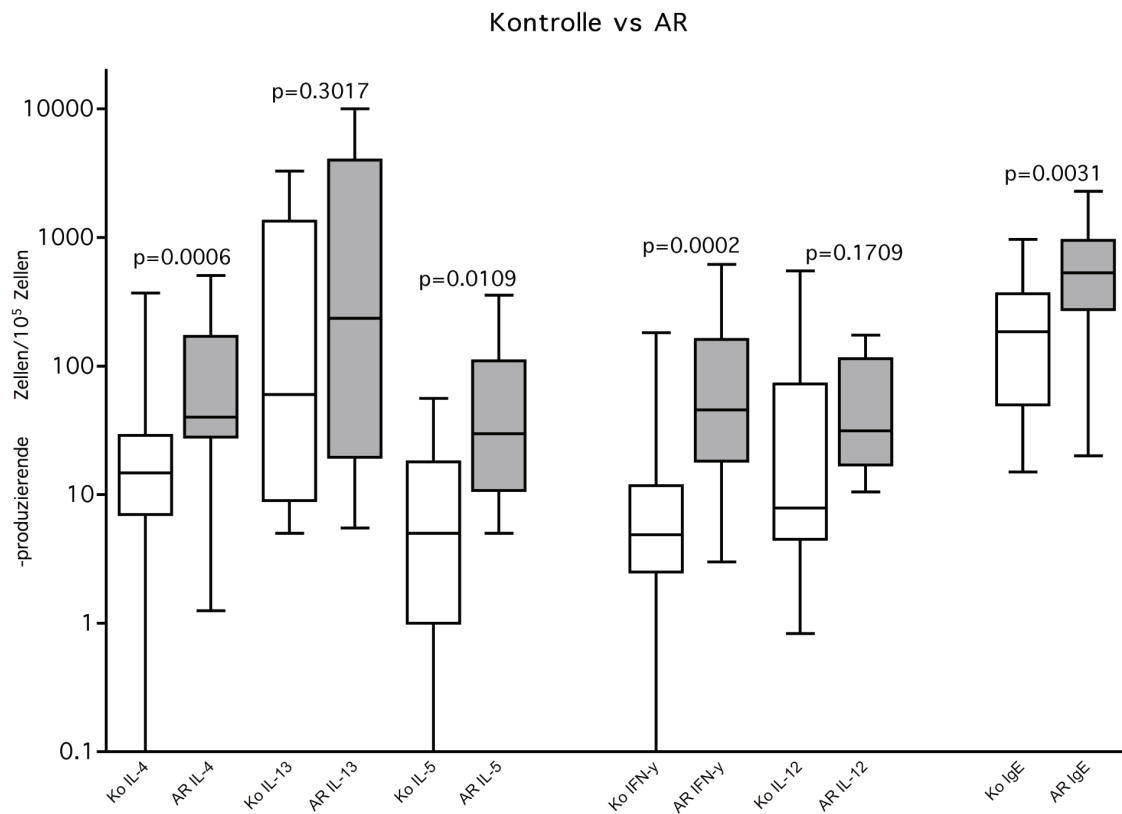


Abbildung 2: Anzahl zytokinproduzierender Zellen/ 10^5 Zellen in der Nasenschleimhaut **nicht-allergischer Patienten ohne nasale Allergenprovokation** (IL-4:n=26; IL-13:n=19; IL-5:n=8; IFN- γ :n=24; IL-12:n=8; IgE:n=27) und **allergischer Patienten innerhalb der Saison** (IL-4:n=23; IL-13:n=11; IL-5:n=11; IFN- γ :n=18; IL-12:n=5; IgE:n=23). (Boxplot: 10., 25., 50. (=Median), 75. und 90. Perzentile, logarithmische y-Achse, MWU-Test)

Ergebnisse

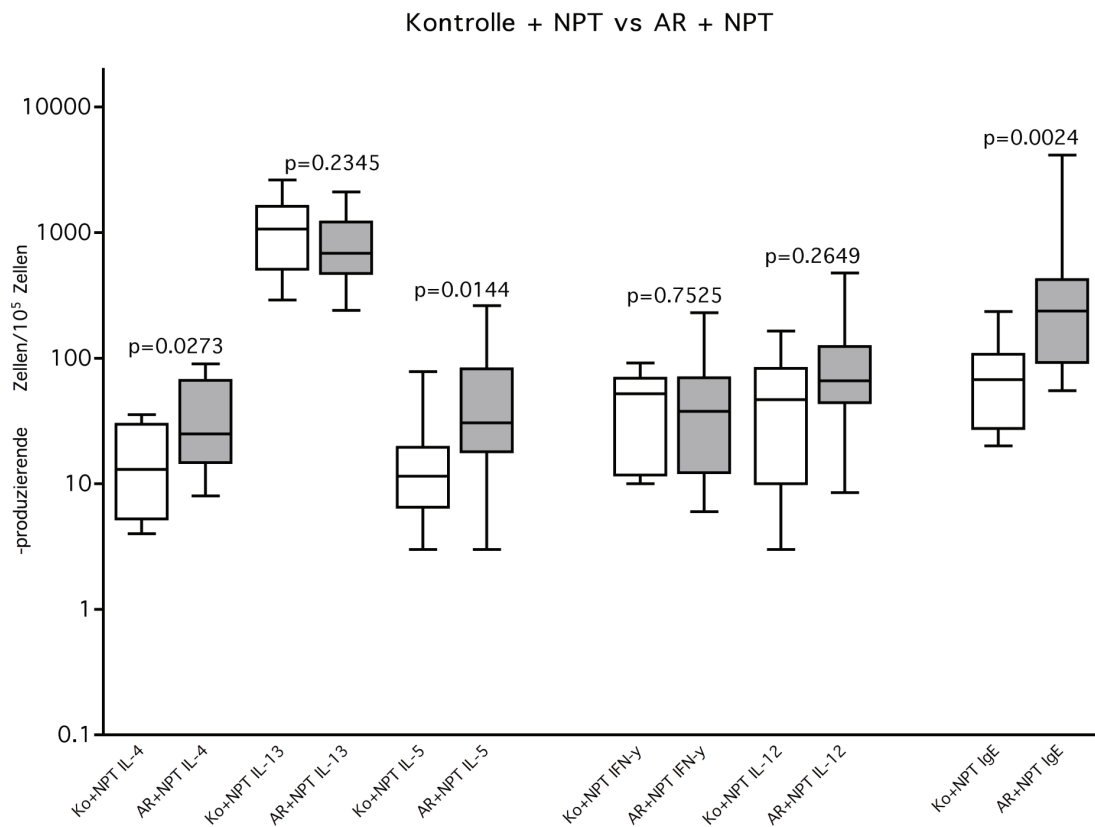


Abbildung 3: Anzahl zytokinproduzierender Zellen/ 10^5 Zellen in der Nasenschleimhaut **nicht-allergischer Patienten nach nasaler Allergenprovokation** (IL-4:n=13; IL-13:n=13; IL-5:n=12; IFN-γ:n=13; IL-12:n=12; IgE:n=12) und **allergischer Patienten nach nasaler Allergenprovokation** (IL-4:n=14; IL-13:n=14; IL-5:n=13; IFN-γ:n=14; IL-12:n=13; IgE:n=14). (Boxplot: 10., 25., 50. (=Median), 75. und 90. Perzentile, logarithmische y-Achse, MWU-Test)

IgE und IL-8

Die Anzahl IgE-produzierender Zellen in der Nasenschleimhaut allergischer Patienten in der Saison war signifikant höher als die der nicht-allergischen Kontrollpatienten ($p=0,0031$). Ein ähnliches Bild stellte sich in beim Vergleich von Allergikern und Nicht-Allergikern jeweils nach nasaler Allergenprovokation dar. Hier waren ebenfalls signifikant höhere Werte bei Patienten mit allergischer Rhinitis zu messen, als bei nicht-allergischen Kontrollpatienten ($p=0,0024$). IgE-produzierende Zellen/ 10^5 Zellen: Ko: $265,6 \pm 53,5$; Ko+NPT: $85,0 \pm 21,4$; AR+NPT: $528,9 \pm 282,3$ AR: $675,7 \pm 126$.

Für das Chemokin IL-8 zeigten sich in unseren Messungen keine wesentlichen Unterschiede zwischen allergischen und nicht allergischen Patienten jeweils nach nasaler Allergenprovokation. Hochsignifikant unterschieden sich hiervon jedoch die Werte für IL-8 bei Nicht-Allergikern ohne nasale Provokation sowie Allergikern während natürlicher 24-h-Allergenexposition, bei denen jeweils deutlich niedrigere Werte gemessen wurden (Abbildung 4). IL-8-produzierende Zellen/ 10^5 Zellen: Ko: $2213 \pm 867,6$; Ko+NPT: 9883 ± 1110 ; AR+NPT: 11198 ± 1033 ; AR: $2334 \pm 501,6$.

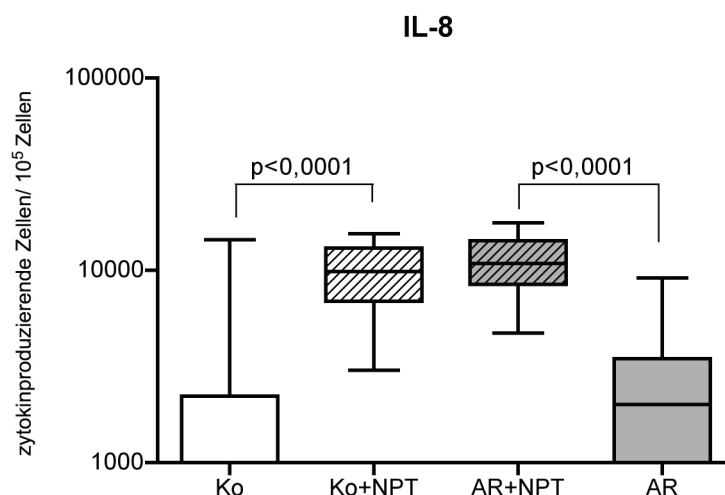


Abbildung 4: Anzahl IL-8-produzierender Zellen/ 10^5 Zellen in der Nasenschleimhaut nicht-allergischer Patienten ohne nasale Allergenprovokation ($n=20$), nicht-allergischer Patienten nach nasaler Allergenprovokation ($n=13$), Patienten mit allergischer Rhinitis nach Allergenprovokation ($n=14$) und allergischen Patienten innerhalb der Saison ($n=20$). (Boxplot: 10., 25., 50. (=Median), 75. Und 90. Perzentile, logarithmische y-Achse, MWU-Test)

Gewichtung der Th2- und Th1-Zytokine

Um einen besseren Eindruck von der Gewichtung der jeweiligen Zytokin-Subgruppen im Milieu der Nasenschleimhaut unserer Patienten zu bekommen, bildeten wir Quotienten aus Th2- und Th1-Zytokinen. Entsprechend der Fragestellung unserer Studie für den Vergleich von allergischen Patienten während kontinuierlicher natürlicher Allergenexposition in der Allergensaison mit allergischen Patienten nach einmaliger experimenteller Allergenprovokation. Dabei setzten wir die gemessenen Werte der Th2 -Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 ins Verhältnis zum Th1-Zytokin IFN- γ .

IL-4 / IFN- γ

Die Quotienten aus IL-4 und IFN- γ waren in der Gruppe allergischer Patienten in der Saison im Mittel etwas höher als bei den Allergikern nach nasaler Provokation, ein signifikanter Unterschied zeigte sich hier nicht ($p=0,1150$), (Abbildung 5). Verhältnis der Produktion von IL-4 zu IFN- γ : AR+NPT: $1,181 \pm 0,210$; AR: $2,331 \pm 0,506$.

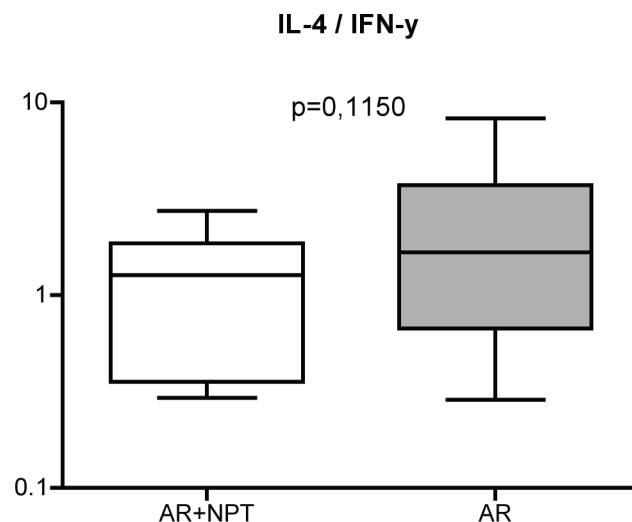


Abbildung 5: Verhältnis IL-4-produzierender Zellen/ 10^5 Zellen zu IFN- γ -produzierenden Zellen/ 10^5 Zellen in der Nasenschleimhaut Patienten mit allergischer Rhinitis nach Allergenprovokation ($n=14$) und allergischer Patienten innerhalb der Saison ($n=18$). (Boxplot: 10., 25., 50. (=Median), 75. Und 90. Perzentile, logarithmische y-Achse, MWU-Test)

Ergebnisse

IL-5 / IFN- γ

Der Vergleich der Quotienten aus IL-5 und IFN- γ zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen beiden untersuchten Gruppen mit niedrigeren Werten in der Gruppe der Allergiker in der Saison ($p=0,0202$), (Abbildung 6). Verhältnis der Produktion von IL-5 zu IFN- γ : AR+NPT: $1,917 \pm 0,5069$; AR: $0,5553 \pm 0,1098$.

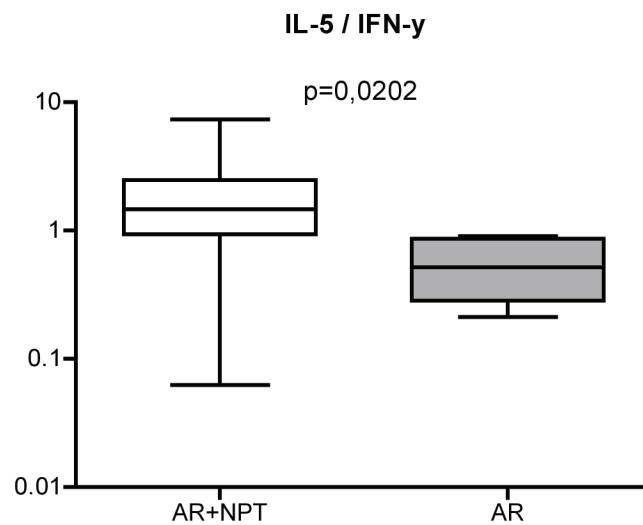


Abbildung 6: Verhältnis IL-5-produzierender Zellen zu IFN- γ -produzierenden Zellen in der Nasenschleimhaut Patienten mit allergischer Rhinitis nach Allergenprovokation ($n=13$) und allergischer Patienten innerhalb der Saison ($n=6$). (Boxplot: 10., 25., 50. (=Median), 75. Und 90. Perzentile, logarithmische y-Achse, MWU-Test)

IL-13 / IFN- γ

Die Quotienten aus IL-13 und IFN- γ waren in der Gruppe der Allergiker in der Saison ebenfalls signifikant kleiner als in der Gruppe allergischer Patienten nach einmaliger nasaler Allergenprovokation ($p=0,0401$), (Abbildung 7). Verhältnis der Produktion von IL-13 zu IFN- γ : AR+NPT: $39,34 \pm 12,20$; AR: $19,23 \pm 10,04$.

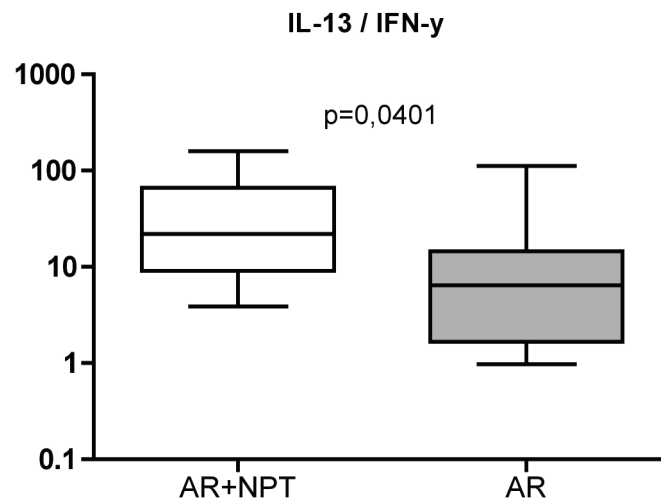


Abbildung 7: Verhältnis IL-13-produzierender Zellen zu IFN- γ -produzierenden Zellen in der Nasenschleimhaut Patienten mit allergischer Rhinitis nach Allergenprovokation ($n=14$) und allergischer Patienten innerhalb der Saison ($n=11$). (Boxplot: 10., 25., 50. (=Median), 75. Und 90. Perzentile, logarithmische y-Achse, MWU-Test)

Zytokinproduktion der provozierten versus der nicht provozierten Nasenseite

Bei 11 nasal mit Allergen provozierten Patienten mit allergischer Rhinitis verglichen wir außerdem die Zytokinproduktion der provozierten Nasenseite mit der unprovozierten Gegenseite und stellten diese den Werten der nicht provozierten nicht-allergischen Kontrollpatienten gegenüber.

Th2-Zytokine: IL-4, IL-13 und IL-5

Die Messung von synthetisiertem IL-4 ergaben bei den untersuchten allergischen Patienten signifikant höhere Werte auf der provozierten im Gegensatz zur nicht provozierten Nasenseite ($p=0,0278$). Ebenfalls signifikant unterschieden sich die Werte der provozierten Nasenseite von Allergikern im Vergleich zu nicht allergischen unprovozierten Kontrollpatienten ($p=0,0481$), (Abbildung 8). Zytokinproduzierende Zellen/ 10^5 Zellen: NPT-Seite: $35,4 \pm 7,8$; Gegenseite: $19,2 \pm 5,2$; Kontrolle: $34,4 \pm 14,9$.

Das Zytokin IL-13 konnte bei unseren Messungen auf der provozierten sowie der unprovozierten Nasenseite im Mittel in ähnlicher Höhe nachgewiesen werden ($p=0,6936$). Signifikant niedriger waren die Werte für nicht-allergische unprovozierte Kontrollpatienten, sowohl im Vergleich zur provozierten Nasenseite ($p=0,0389$), als auch zur nicht provozierten Nasenseite ($p=0,0432$) allergischer Patienten (Abbildung 8). Zytokinproduzierende Zellen/ 10^5 Zellen: NPT-Seite: $929,1 \pm 162,3$; Gegenseite: $953,6 \pm 145,2$; Kontrolle: $676,8 \pm 246,8$.

Die gemessenen IL-5-Werte waren bei allergischen Patienten auf der provozierten Nasenseite im Mittel etwas höher als auf der Gegenseite, unterschieden sich jedoch nicht signifikant ($p=0,5767$). Deutlicher, aber ebenfalls nicht signifikant, unterschieden sich die Werte der unprovozierten Gegenseite allergischer Patienten von denen nicht provozierten nicht-allergischer Kontrollpatienten ($p=0,1488$). Den deutlichsten Unterschied konnten wir beim Vergleich der provozierten Nasenseite allergischer Patienten mit nicht allergischen unprovozierten Kontrollpatienten messen. Hier lagen die IL-5-Werte bei den nasal provozierten Allergikern im Mittel

Ergebnisse

wesentlich höher, eine Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht ($p=0,0527$), (Abbildung 8). Zytokinproduzierende Zellen/ 10^5 Zellen: NPT-Seite: $110,3 \pm 58,0$; Gegenseite: $62,1 \pm 26,3$; Kontrolle: $12,2 \pm 6,1$.

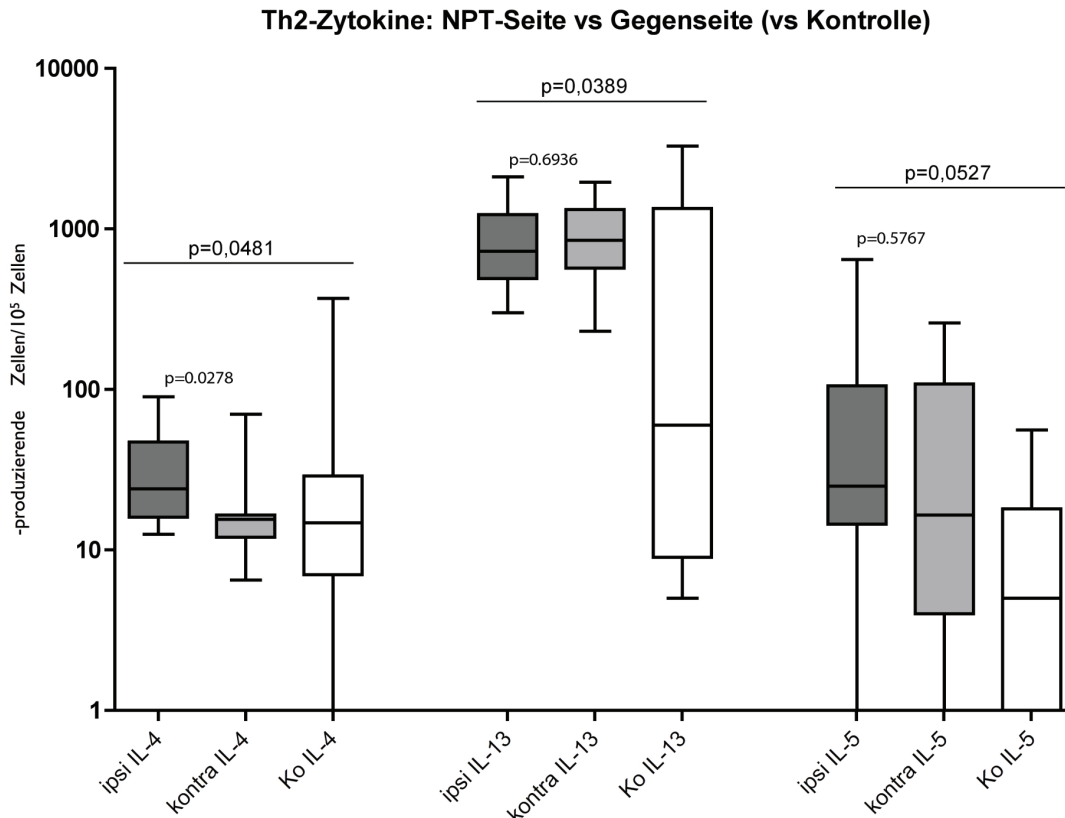


Abbildung 8: Anzahl zytokinproduzierender Zellen/ 10^5 Zellen in der Nasenschleimhaut allergischer Patienten der provozierten Nasenseite (ipsi) (IL-4:n=11; IL-13:n=11; IL-5:n=11), der nicht provozierten Gegenseite (kontra) (IL-4:n=11; IL-13:n=11; IL-5:n=11) und in der Nasenschleimhaut unprovozierter nicht-allergischer Kontrollpatienten (Ko) (IL-4:n=26; IL-13:n=19; IL-5:n=9). (Boxplot: 10., 25., 50. (=Median), 75. Und 90. Perzentile, logarithmische y-Achse, MWU-Test)

Th1-Zytokine: IFN- γ und IL-12

Die Werte für synthetisiertes IFN- γ ergaben im Mittel die höchsten Werte auf der provozierten Nasenseite allergischer Patienten. Diese unterschieden sich nicht signifikant von den etwas niedrigeren Werten der nicht provozierten Gegenseite ($p=0,5991$). Signifikant niedriger waren die Werte bei den nicht provozierten nicht-allergischen Kontrollpatienten sowohl im Vergleich zur provozierten ($p=0,0012$) als auch zur nicht provozierten ($p=0,0047$) Nasenseite allergischer Patienten (Abbildung 9). Zytokinproduzierende Zellen/ 10^5 Zellen: NPT-Seite: $62,9 \pm 21,8$; Gegenseite: $49,1 \pm 19,1$; Kontrolle: $21,4 \pm 8,4$.

Die höchsten IL-12-Werte wurden im Mittel auf der provozierten Nasenseite der allergischen Patienten gemessen. Die gemessenen Werte der Gegenseite waren dagegen etwas niedriger, unterschieden sich jedoch nicht signifikant von der provozierten Nasenseite ($p=0,7676$). Der Vergleich mit den IL-12-Werten bei unprovozierten Nicht-Allergikern zeigte den deutlichsten Unterschied zur provozierten Nasenseite allergischer Patienten, der jedoch ebenfalls nicht signifikant war ($p=0,1604$), (Abbildung 9). Zytokinproduzierende Zellen/ 10^5 Zellen: NPT-Seite: $115,7 \pm 43,5$; Gegenseite: $85,3 \pm 26,73$; Kontrolle: $90,1 \pm 67,5$.

Ergebnisse

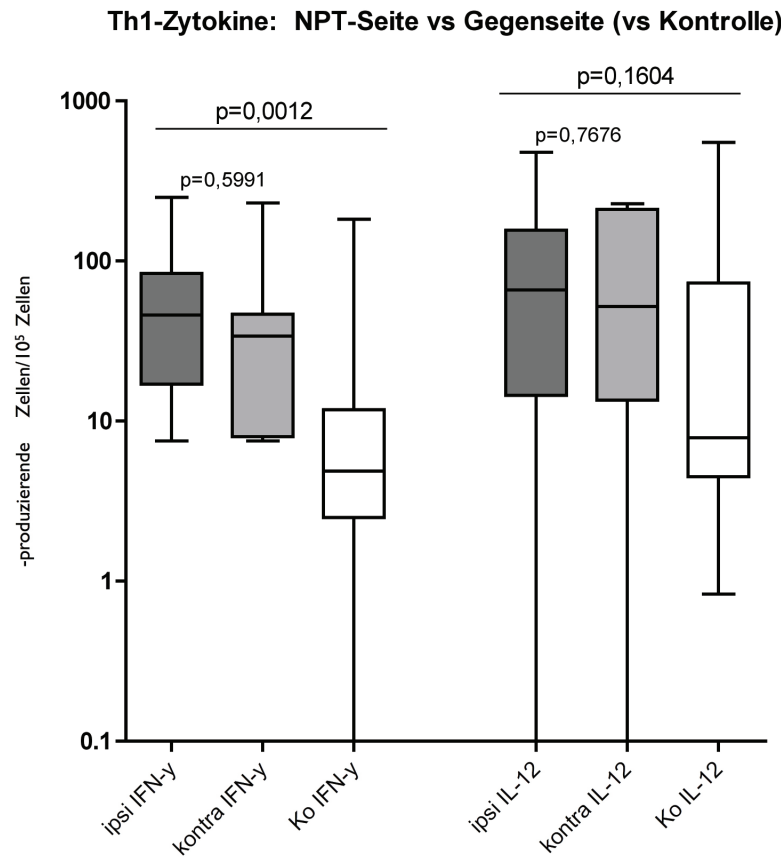


Abbildung 9: Anzahl zytokinproduzierender Zellen in der Nasenschleimhaut allergischer Patienten der provozierten Nasenseite (ipsi) (IFN-γ:n=11; IL-12:n=11), der nicht provozierten Gegenseite (kontra) (IFN-γ:n=11; IL-12:n=11) und in der Nasenschleimhaut unprovozierter nicht-allergischer Kontrollpatienten (Ko) (IFN-γ:n=24; IL12:n=8). (Boxplot: 10., 25., 50. (=Median), 75. Und 90. Perzentile, logarithmische y-Achse, MWU-Test)

IgE und IL-8

Die Werte für das Immunglobulin IgE zeigten im Mittel die höchsten Werte auf der provozierten Nasenseite allergischer Patienten. Auf der nicht provozierten Gegenseite waren die Werte im Mittel deutlich kleiner, unterschieden sich aber nicht signifikant ($p=0,1485$). Ebenfalls nicht signifikant unterschieden sich hiervon die IgE-Werte nicht provozierter nicht-allergischer Kontrollpatienten ($p=0,5094$). Ein signifikanter Unterschied stellte sich uns somit zwischen keiner der drei untersuchten Gruppen dar (Abbildung 10). Zytokinproduzierende Zellen/ 10^5 Zellen: NPT-Seite: $605,9 \pm 358,4$; Gegenseite: $515,0 \pm 409,9$; Kontrolle: $265,6 \pm 53,5$.

Für das Chemokin IL-8 zeigten sich auf der provozierten Nasenseite höhere Werte als auf der unprovozierten Gegenseite, eine Signifikanz wurde hier jedoch verfehlt ($p=0,5546$). Hochsignifikant unterschieden sich hingegen sowohl die nasal provozierte ($p<0,0001$) als auch die unprovozierte ($p=0,0001$) Nasenseite von nicht-allergischen unprovozierten Kontrollpatienten (Abbildung 10). Zytokinproduziernede Zellen/ 10^5 Zellen: NPT-Seite 11445 ± 1274 ; Gegenseite: 10482 ± 1979 ; Kontrolle: $2213 \pm 867,9$.

Ergebnisse

IL-8 und IgE: NPT-Seite vs. Gegenseite (vs Kontrolle)

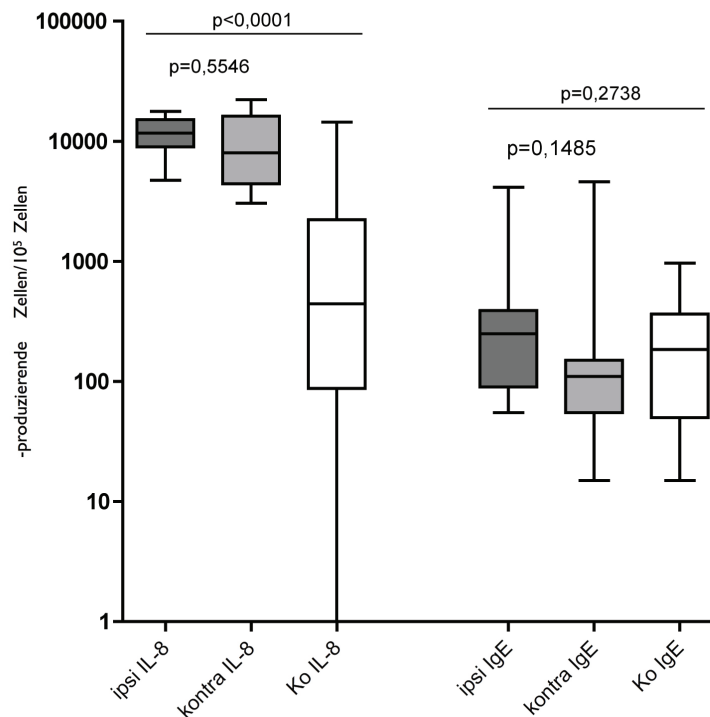


Abbildung 10: Anzahl zytokinproduzierender Zellen in der Nasenschleimhaut allergischer Patienten der provozierten Nasenseite (ipsi) (IL-8:n=11; IgE-13:n=11), der nicht provozierten Gegenseite (kontra) (IL-8:n=11; IgE:n=11) und in der Nasenschleimhaut unprovozierter nicht-allergischer Kontrollpatienten (Ko) (IL-8:n=20; IgE:n=27). (Boxplot: 10., 25., 50. (=Median), 75. Und 90. Perzentile, logarithmische y-Achse, MWU-Test)

Diskussion

Effekt der nasalen Allergenprovokation

In unserer Studie führten wir präoperativ eine nasale Allergenprovokation mit lyophilisierter Allergenlösung in Form von Nasensprays durch. Bei der Durchführung und Auswertung orientierten wir uns an den offiziellen Kriterien der DGAKI und AGAI [13], wobei wir uns auf eine einmalige Provokation mit 50.000 BE auf der Nasenseite mit dem höheren Flow in der Leermessung ohne vorherige Provokation mit NaCl-Lösung beschränkten. Wir applizierten die Allergenlösung mit einem Zerstäuber auf den Kopf der unteren Nasenmuschel einer Nasenseite und dokumentierten die allergische Reaktion der Nasenschleimhaut durch Flow-Messung mittels Rhinomanometrie. Somit gelang es uns bei allen Patienten eine vergleichbare und gleichzeitig ausreichend starke, kurzzeitige Exposition gegenüber dem Allergen zu erzeugen. Dies zeigte sich bei Patienten mit allergischer Rhinitis durch eine deutliche Abnahme des nasalen Flows auf der provozierten Seite. Demgegenüber konnten wir bei nicht allergischen Kontrollpatienten keine wesentliche relevante oder signifikante Flow-Änderung nach der Provokation beobachten. Wir erhielten auf diese Weise zwei Patientengruppen (Allergiker und Nicht-Allergiker), die über einen sehr kurzen, klar definierten Zeitraum einer festgelegten Allergenkonzentration ausgesetzt waren. Diese experimentell erzeugten Gruppen konnten wir mit Allergikern während dauerhafter, natürlicher Allergenexposition sowie mit einer Gruppe nicht-allergischer unprovozierter Kontrollpatienten vergleichen, um Unterschiede in den Zytokinprofilen zu detektieren.

Dieser Versuchsaufbau bot uns die Möglichkeit zur in-vivo-Allergen-Stimulation mit anschließendem Nachweis sezernierter Zytokine in der Nasenschleimhaut. Dies erschien uns besonders sinnvoll, da in Studien gezeigt werden konnte, dass es nach nasaler Allergenexposition zu einer massiven Rekrutierung von Entzündungszellen aus dem gesamten Körper und dem Knochenmark kommt, die in die allergische Nasenschleimhaut einwandern [27, 28]. Da eine in-vitro-Stimulation diese natürlichen Gegebenheiten im menschlichen Körper nicht korrekt abbildet, und man so nur Annäherungswerte für die tatsächlichen Vorgänge und Zytokinmuster nach

allergischer Stimulation erhält, wählten wir für unsere Fragestellung die etwas aufwändigere in-vivo Allergen-Provokation am Tag vor der Operation unserer Patienten.

Weiterverarbeitung der Zellen

Die Conchotomie-Präparate der Patienten (untere Nasenmuschel) bekamen wir seitengetrennt in NaCl-Lösung direkt aus dem OP ins Labor geschickt, wo eine sofortige Weiterverarbeitung der Zellen erfolgte. Dass wir in unsere Studie nur Patienten einschlossen, die eine Conchotomie im Rahmen einer Operation erhielten, und nicht das Material in Form einer Kürretage gewonnen, hatte mehrere Vorteile: Zum einen konnten wir auf diese Weise eine ausreichende Anzahl an lebenden Zellen separieren, so dass uns die Messung von sieben unterschiedlichen Zytokinen gleichzeitig gelang. Zum anderen erreichten wir auch Zellen aus tieferen Schichten der Nasenschleimhaut, was im Hinblick auf die unterschiedlichen Quellen der Zytokine aus verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlicher Lokalisation in der Nasenschleimhaut sinnvoll erschien. So vermieden wir einen potentiellen systematischen Fehler durch Selektion bestimmter Zelltypen aus oberflächlichen Schichten der Nasenschleimhaut in unseren Messwerten.

Durch den zeitlichen Abstand von nasaler Allergen-Provokation und Operation der Patienten (10 bis 24 Stunden) erhielten wir in unseren Messungen Werte für die Zytokinproduktion im Rahmen der Spätphasereaktion der allergischen Rhinitis. Demonstriert wurde die Spätphasereaktion bereits an den unterschiedlichen Effektororganen für allergische Reaktionen wie der Haut, der Nase und der Lunge nach experimenteller Allergenprovokation. Diese Spätphasereaktion zeigt eine deutlich bessere Korrelation zum natürlichen Verlauf allergischer Reaktionen als die Sofortphase. So sind die klinischen Symptome allergischer Patienten, die oft über Stunden und Tage anhalten und nur langsam auf die Wirkung topischer Steroide ansprechen [29], durch die allergische Sofortreaktion alleine nicht zu erklären. Auch die Rekrutierung weiterer Zellen, insbesondere eosinophiler Granulozyten, die infolge der Allergenstimulation in die Nasenschleimhaut einwandern und ihrerseits die

Diskussion

Entzündungsreaktion beeinflussen, würde durch die Sofortreaktion alleine nicht in ausreichendem Maße erfasst. So gestalteten auch wir unseren Versuchsaufbau zeitlich so, dass wir die Zytokinmuster in der Spätphase nach der experimentellen Allergenprovokation abbildeten.

Die Herstellung der Einzelzellsuspension erfolgte in einem mechanisch-enzymatischen Verfahren, bei dem die intraoperativ gewonnenen Gewebeteile so verarbeitet wurden, dass wir eine hohe Zahl an lebenden immunkompetenten Zellen erhielten. Diese Viabilität der Zellen überprüften wir bei gleichzeitiger Zellzahlbestimmung nach Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Zählkammer. Dass wir hierbei nur viable Zellen erfassten, war für die Auswertung der später entstandenen Spots von maßgeblicher Bedeutung, denn die gemessenen Werte geben die Anzahl der Zellen pro 10^5 Zellen an, die das entsprechende Zytokin/Immunglobulin nach Gabe auf die 96-well-Platte produziert haben. So erhielten wir für jeden einzelnen Patienten vergleichbare Werte und eine Quantifizierung der gebildeten Interleukine in der Nasenschleimhaut der einzelnen Patienten. Anschließend fertigten wir einen ELISPOT-Assay separat für jede Seite an, um die Zytokine der provozierten und der unprovozierten Seite unabhängig voneinander zu messen.

Messung der Zytokine in der Nasenschleimhaut

Die Produktion der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, der Th1-Zytokine IL-12 und IFN- γ , sowie dem Chemokin IL-8 und dem Immunglobulin IgE in der Nasenschleimhaut bestimmten wir mithilfe des in unserem Labor etablierten ELISPOT-Assays [25]. Erstmals wurde der ELISPOT-Assay von Czerkinsky und Sedgwick [30, 31] beschrieben und beruht auf einem modifizierten ELISA, mit dem es möglich ist, Zytokinproduktion auf der Ebene einzelner Zellen nachzuweisen. Dies bietet den Vorteil, dass auch Zytokine mit sehr kurzer Halbwertszeit nachweisbar sind, da diese direkt nach ihrer Sekretion an den auf der Platte fixierten Primär-Antikörper binden und so nachgewiesen werden können. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens, insbesondere im Vergleich zum Zytokinnachweis mittels PCR und in-

situ-Hybridisierung, liegt in dem Nachweis des Zytokins auf der Proteinebene, also dem Nachweis des aktiven Metaboliten und nicht nur der mRNA des gesuchten Zytokins. Ein Nachteil des Verfahrens, der sich insbesondere bei der Untersuchung größerer Patientenkollektive darstellt, ist der große zeitliche Aufwand. So dauert der gesamte Assay, von der Entnahme der Zellen bis zum Auszählen der Ergebnisse, drei Tage.

In unserer Studie gelang es uns mithilfe des ELISPOT-Assays alle gemessenen Zytokine auf der Proteinebene nachzuweisen. Auch die sonst schwierig nachweisbaren Th1-Zytokine IL-12 und IFN- γ konnten wir in der Nasenschleimhaut der untersuchten Patienten messen. Diese hohe Sensitivität des Testverfahrens erschien uns gerade in Hinblick auf die Beantwortung der Fragestellung nach der Gewichtung von Th1- und Th2-Zytokinen bei Allergikern in der Saison im Vergleich zu kurzzeitig allergenexponierten allergischen Patienten essentiell.

Zytokinproduktion in der Nasenschleimhaut nach nasaler Allergenprovokation

Th2-Zytokine: IL-4, IL-13 und IL-5

Es besteht kein Zweifel mehr daran, dass IL-4 als typisches Th2-Zytokin eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie allergischer Erkrankungen spielt. IL-4 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für B-Zellen und in der Lage den Isotypen-Switch von IgM zu IgE zu induzieren. Zusammen mit anderen Zytokinen wie IL-2, IL-5 und IL-6 führt IL-4 zu einer erhöhten IgE-Sekretion, wobei IL-4 für diese essentiell ist. [32] Außerdem führt IL-4 zur Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 auf Endothelzellen und fördert damit den selektiven Einstrom von Eosinophilen, Basophilen und T-Zellen ins Gewebe [33]. Bereits im Gewebe vorhandenes IL-4 führt zur Ausdifferenzierung noch undifferenzierter Th0-Zellen zu Th2-Zellen [34].

Trotz dieser recht eindeutigen Rolle von IL-4 in der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis ist die Anzahl der Studien, in denen IL-4 in der Nasenschleimhaut allergischer Patienten oder in nasalem Sekret nachgewiesen werden konnte, relativ

überschaubar. Besondere Herausforderungen stellt der Nachweis von IL-4 an die Methodik des Nachweisverfahrens. So existieren mehr Studien, in denen die mRNA von IL-4 nachgewiesen wurde, als das Protein selbst. Erstmals gelang Durham der Nachweis von IL-4 mRNA in Biopsien der menschlichen Nasenschleimhaut nach Allergenprovokation [35]. Den immunhistochemischen Nachweis IL-4-positiver Zellen in der Nasenschleimhaut allergischer Patienten erbrachte Bradding, der später eine Typisierung der Mastzellen aufgrund ihres Zytokingehaltes vornahm [36, 37]. Mittels kommerzieller ELISA-Assays gelang später in der eigenen Arbeitsgruppe auch der Nachweis von IL-4 in seinem zeitlichen Verlauf in nasalem Sekret nach Allergenprovokation mit Hilfe der Disc-Methode [26]. Für die Untersuchung mehrerer Zytokine gleichzeitig war dieses Verfahren jedoch aufgrund der geringen Sekretmengen nicht geeignet, so dass wir für die Zytokinmessungen im Rahmen unserer Studie den später in unserem Labor speziell für die Verarbeitung von Nasenschleimhautzellen modifizierten ELISPOT-Assay wählten.

So konnten wir in unserer Studie IL-4 in allen Patientengruppen nachweisen. Dabei zeigten Allergiker in der Saison sowie Allergiker nach nasaler Allergenprovokation jeweils signifikant höhere Werte als die verglichenen Kontrollgruppen nicht-allergischer Patienten mit und ohne nasale Allergenprovokation. Diese Ergebnisse untermauern die zentrale Bedeutung des Th2-Zytokins IL-4 im Rahmen der Spätphasereaktion der allergischen Rhinitis. So konnten wir durch eine experimentelle kurzzeitige Allergenprovokation eine erhöhte Produktion des Zytokins induzieren und erhielten hierbei ein ähnliches Bild wie unter natürlichen Gegebenheiten der kontinuierlichen Allergenexposition bei Allergikern in der Saison. Dass IL-4 auch in Hinblick auf therapeutische Ansätze besonders interessant ist, zeigt eine Studie, in der nach Steroidtherapie, mit der sich in vielen Fällen eine deutliche Besserung der klinischen Symptomatik allergischer Patienten herbeiführen lässt, eine Reduktion der Sekretion von IL-4, -5 und -13 gemessen wurde [38]. Eine spezifischere Therapie, die nur auf das Zytokin IL-4 abzielt, konnte durch die Wirksamkeit eines inhalativ verabreichten löslichen IL-4-Rezeptors bisher nur für die Behandlung des allergischen Asthma bronchiale gezeigt werden [39]. Ein derartiger Therapieansatz wäre nach den Ergebnissen unserer Studie jedoch auch für die Anwendung bei der allergischen Rhinitis denkbar.

IL-13 ist zu 30% homolog zu IL-4 und hat daher viele ähnliche Wirkungen auf mononukleäre phagozytierende Zellen und B-Zellen, nicht jedoch auf T-Zellen [40]. IL-13 ist auch in der Lage, die Expression von VCAM-1 zu induzieren und somit die Adhäsion von Granulozyten an der Endotheloberfläche zu ermöglichen [41]. Wichtige Unterschiede liegen in verschiedenen Mechanismen transkriptioneller Regulation. So wird IL-4 früher und mit längerer Persistenz in der entzündlichen Nasenschleimhaut sezerniert. Beide Zytokine sind Produkte von Th2-Zellen und Mastzellen, wobei IL-13 außerdem von Th1-Zellen synthetisiert werden kann. Dass IL-13 in der allergischen Rhinitis trotz vieler ähnlicher Wirkungen nicht die gleich bedeutsame Rolle wie IL-4 zukommt, mag an der mangelnden Fähigkeit von IL-13 liegen, eine Differenzierung von Th0-Zellen in Richtung Th2 zu induzieren.

Besonders interessant in diesem Zusammenhang erscheint die Beobachtung der IL-13-Produktion der immunkompetenten Zellen in der Nasenschleimhaut im Rahmen unserer Studie. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Allergikern und nicht-allergischen Patienten, weder unter natürlichen Gegebenheiten der Allergenexposition in der Saison, noch nach experimenteller nasaler Allergenprovokation. Auffällig war jedoch, dass die IL-13-Werte in beiden nasal provozierten Gruppen im Mittel signifikant höher waren, als unter natürlichen Bedingungen. In einer Studie von Ghaffar konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich die Werte für IL-13 mRNA bei allergischen Patienten ohne nasale Provokation von denen nicht-allergischer Kontrollpatienten initial nicht signifikant unterscheiden. Erst eine Allergenprovokation führte hier zum Anstieg der IL-13-mRNA-Produktion, die sich durch topische Steroide hemmen ließ [42]. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen, welches mit den Ergebnissen unserer Studie übereinstimmt, könnte in den Mastzellen als wichtige Quelle für IL-13 liegen, so dass allein der Stimulus der nasalen Allergenprovokation zu einer Degranulation und damit zur gesteigerten Sekretion von IL-13 führt. In der Gruppe der nicht-allergischen Kontrollpatienten ohne nasale Allergenprovokation, bei denen dieser Stimulus fehlt, sowie in der Gruppe der Allergiker in der Saison, bei denen sich bereits eine chronische Entzündungsreaktion etabliert hat, scheint somit die Ausschüttung von IL-13 eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

Das Interleukin IL-5 spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Nasenschleimhaut allergischer Patienten. Die wichtigste Quelle für IL-5 sind Mastzellen und T-Lymphozyten, von denen es nach Allergenkontakt im Rahmen der allergischen Spätphasereaktion ausgeschüttet wird. IL-5 ist in der Lage die Bildung von Eosinophilen sowie deren Aktivierung und Überleben zu induzieren, da unreife Vorläuferzellen sich in einer IL-5-dominierten Umgebung vermehrt in Eosinophile ausdifferenzieren [43, 44]. Darüber hinaus kommt IL-5 eine entscheidende Rolle als potentes Chemokin zu, so dass es im Rahmen der allergischen Spätreaktion zu einer Einwanderung von Entzündungszellen, insbesondere Eosinophilen, in die entzündliche Nasenschleimhaut kommt.

Wir wiesen IL-5 in deutlich messbaren Konzentrationen in der Nasenschleimhaut aller unserer Patienten nach. Dabei war die Anzahl IL-5 produzierender Zellen bei Allergikern in der Saison sowie nach nasaler Allergenprovokation jeweils signifikant höher als bei den verglichenen nicht-allergischen Kontrollpatienten.

An den Ergebnissen unserer Untersuchungen wird deutlich, dass neben IL-4 auch IL-5 eine wesentliche Rolle im Zytokinprofil von Patienten mit allergischer Rhinitis zukommt, da sich sowohl bei kontinuierlicher Allergenexposition während der Saison, als auch nach einmaliger experimenteller Allergenprovokation eine vermehrte Ausschüttung von IL-5 nachweisen ließ. Unsere Ergebnisse weisen somit in eine ähnliche Richtung wie vorherige Studien, in denen IL-5 ebenfalls nach Allergenprovokation in Form von mRNA [35] oder Protein [45] sowie unter natürlichen Umständen der saisonalen Allergenexposition [29] nachgewiesen werden konnte. In Untersuchungen von Wilson konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine Verbesserung der klinischen Symptomatik der Patienten nach Hyposensibilisierungstherapie mit einer Abnahme an IL-5-mRNA sowie einer verminderten Gewebeeosinophilie zu korrelieren scheinen [46]. Einschränkend ist hierbei jedoch zu sehen, dass IL-5 keineswegs ein spezifisches Zytokin für die allergische Rhinitis ist. So spielt IL-5 auch in der Pathophysiologie der chronischen Sinusitis, insbesondere mit Polyposis nasi, eine Rolle. Dies konnte bereits in Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden, bei denen sich in Polypen mit dem ELISPOT-Assay sehr viel höhere Konzentrationen an IL-5 nachweisen ließen, als in der Nasenschleimhaut allergischer Patienten [25].

Th1-Zytokine: IFN- γ und IL-12

IFN- γ ist in der Lage die Th2-getragene allergische Immunantwort zu antagonisieren und eine Reduktion der IgE-Produktion zu bewirken, indem es die IL-4-vermittelte Expression von niedrigaffinen IgE-Rezeptoren und den Isotypen-Switch zu IgE hemmt. Außerdem aktiviert es Makrophagen und Monozyten und führt somit zu einer zellvermittelten Immunantwort. Gebildet wird IFN- γ zum größten Teil von Th1-Zellen, zytotoxischen T-Zellen sowie natürlichen Killerzellen [32].

Trotz dieser gegenseitigen Antagonisierung von Th-1- & Th2-Zytokinen ist die Studienlage auf diesem Gebiet alles andere als eindeutig. Während in einigen Studien eine deutliche Dominanz von Th2-Zytokinen bei allergischen Patienten nachgewiesen werden konnte [47], zeigten andere Studien, dass eine Allergenstimulation von PBMCs allergischer Patienten keineswegs nur zu erhöhter Produktion von IL-4 und IL-5 führt, sondern sich ebenfalls erhöhte Werte für IFN- γ nachweisen lassen [23].

In unserer Studie konnten wir in allen Gruppen IFN- γ nachweisen. Dabei waren die gemessenen Konzentrationen in der Gruppe der Allergiker in der Saison signifikant höher als bei Nicht-Allergikern. Patienten nach nasaler Allergenprovokation hatten ähnlich hohe Konzentrationen von IFN- γ in der Nasenschleimhaut. Diese Beobachtungen unterstreichen die Annahme, dass eine allergische Reaktion des Immunsystems nicht allein als Th2-getragene Immunantwort zu sehen ist, sondern es gleichzeitig zur Produktion und Sekretion von Th1-Zytokinen kommen kann. Dass dies möglich ist konnte in einer Studie demonstriert werden, in denen PBMCs von Allergikern nach einer in-vitro-Stimulation sowohl eine Steigerung der IL-4-, als auch der IFN- γ -Produktion zeigten [48].

Dass wir signifikant höhere IFN- γ -Konzentrationen nur bei Allergikern in der Saison im Vergleich zu nicht-allergischen Kontrollpatienten nachweisen konnten während sich die Werte der beiden nasal provozierten Gruppen kaum unterschieden, lässt sich am ehesten durch die Chronizität der entzündlichen Reaktion der Nasenschleimhaut von Patienten während der natürlichen Allergenexposition erklären. Durch eine kontinuierliche Exposition gegenüber dem Allergen, wie sie bei Patienten mit allergischer Rhinitis insbesondere während der Saison vorkommt, wird

Diskussion

eine Entzündungsreaktion der Nasenschleimhaut über einen langen Zeitraum aufrecht erhalten. Dieses chronisch entzündliche Geschehen erlaubt ein paralleles Vorkommen von Th1- und Th2-Zytokinen in der Nasenschleimhaut allergischer Patienten. Ein denkbarer Mechanismus wäre hierbei, dass nach initial primärer Th2-Antwort sich im weiteren Verlauf eine zusätzliche Produktion von Th1-Zytokinen etabliert, ohne die gleichzeitige Produktion von Th2-Zytokinen effektiv zu supprimieren. Ein derartiger Mechanismus wurde in Untersuchungen mit Patchtests bei atopischer Dermatitis beschrieben. Auch hier kam es initial zu einer Steigerung der IL-4-Produktion und erst mit großer zeitlicher Verzögerung ließ sich eine zusätzliche Produktion von IFN- γ nachweisen [49].

Da jedoch in unserer Studie das Zytokinprofil und die Menge an gemessenen Zytokinen interindividuell sehr unterschiedlich waren, verglichen wir zur besseren Darstellung der Relationen von Th1- und Th2-Zytokinen die jeweiligen Ratios für jeden Patienten der unterschiedlichen Gruppen miteinander (siehe unter „Gewichtung der Th1- und Th2-Zytokine“).

IL-12, welches vorwiegend von Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und Eosinophilen produziert wird, stimuliert T-Zellen und natürliche Killerzellen zu maximaler IFN- γ -Produktion und ist somit in der Lage eine Th1-Antwort zu induzieren. Außerdem kann es die Differenzierung von unreifen Th0-Zellen zu Th2-Zellen sowie die Produktion von IgE unterdrücken [50, 51]. Bereits ausdifferenzierte Th2-Zellen hingegen sind gegen den Einfluss von IL-12 resistent [52]. Bisher ist die Produktion von IL-12 in der entzündlichen Nasenschleimhaut allergischer Patienten nur wenig untersucht, lediglich in einer Studie zeigte sich eine Suppression der IL-12-Produktion in der in-situ Hybridisierung bei allergischen Patienten 24 Stunden nach Allergenprovokation im Vergleich zu Kontrollen [53]. Demgegenüber konnte jedoch gezeigt werden, dass sich mit dem in unserem Labor etablierten ELISPOT-Assay sehr wohl erhöhte Produktionen von IL-12 bei Patienten mit allergischer Rhinitis nachweisen lassen [25]. Aufgrund dieser widersprüchlichen Studienlage erschien es uns sinnvoll, die IL-12-Produktion an größeren Patientenkollektiven mit unterschiedlichen Bedingungen der Allergenexposition (kurzzeitige

Allergenprovokation vs. Dauerexposition während der Allergensaison) genauer zu untersuchen.

In unserer Untersuchung konnten wir ebenfalls erhöhte Werte für IL-12 messen, sowohl in der Gruppe allergischer Patienten nach nasaler Allergenprovokation als auch in der Saison jeweils im Vergleich zu nicht allergischen Patienten. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich hier jedoch nicht.

Die Ergebnisse unserer Studie stehen somit in erneutem Widerspruch zu Untersuchungen, die bei allergischen Patienten erniedrigte Werte für IL-12 nachwiesen. Ein möglicher Grund hierfür könnte in der unterschiedlichen Sensitivität verschiedener Nachweisverfahren liegen. Durch den Nachweis der Zytokine mittels ELISPOT-Assay war es uns möglich die Zytokine beinahe unabhängig von ihrer Stabilität oder Halbwertszeit zu messen, da diese direkt nach ihrer Produktion an den Primärantikörper binden konnten und somit als aktive Metabolite auf der Proteinebene nachgewiesen wurden. So konnten wir mit unserem Verfahren IL-12 nachzuweisen, wo andere Nachweisverfahren unter Umständen Lücken in der Detektion aufwiesen.

Diese Untersuchung demonstriert erneut die mangelnde Fähigkeit von IL-12 eine bereits etablierte Th2-Reaktion effektiv zu antagonisieren, da auch in unserer Studie das Zytokin parallel zum bereits bestehenden Th2-Zytokinmilieu in Form von IL-4 und IL-5 nachgewiesen werden konnte. Dass der Vergleich der Konzentrationen von IL-12 deutlich höhere Werte bei Allergikern nach nasaler Allergenprovokation im Vergleich zu Allergikern in der Saison zeigt, lässt sich dadurch erklären, dass IL-12 primär eine Th1-induzierende Wirkung besitzt und bei etablierter Th1-Antwort wieder abfällt.

IgE und IL-8

Über die Bedeutung und das Ausmaß der lokalen Synthese des Immunglobulins IgE in der Nasenschleimhaut allergischer Patienten herrscht keine einheitliche Meinung. Während sich in früheren Untersuchungen kein Hinweis auf das vermehrte Vorkommen IgE produzierender Zellen in der Nasenschleimhaut darstellen ließ [54], konnte man in der Zwischenzeit zumindest auf der Transkriptionsebene ein

Diskussion

Nachweis für die lokale IgE-Synthese finden [55]. Mit dem in unserem Labor etablierten ELISPOT-Assay gelang in jüngster Zeit nun auch ein Nachweis einer IgE-Produktion in der Nasenschleimhaut auf Proteinebene [25]. Trotz dieser uneinheitlichen Studienlage gibt es Grund zur Annahme, dass es bei Patienten mit allergischer Rhinitis neben dem Serum-IgE auch zu einer lokalen Synthese von spezifischem IgE in den Erfolgsorganen (Bronchien, Lunge, Nase) kommt. So würde dies beispielsweise das Vorkommen allergischer Reaktionen der Nase bei gleichzeitig normwertigen Serumspiegeln für spezifisches IgE erklären [56].

Besonders interessant erschien uns daher die Untersuchung verschiedener Patientengruppen mit dem ELISPOT-Assay.

Hier zeigten sich in beiden Gruppen allergischer Patienten (in Saison und nach nasaler Allergenprovokation) jeweils signifikant höhere Werte im Vergleich zu Patienten ohne allergische Sensibilisierung. Damit konnten wir erneut demonstrieren, dass sich mit ausreichend sensitiven Verfahren bei Patienten mit allergischer Rhinitis eine erhöhte Sekretion von IgE in der Nasenschleimhaut nachweisen lässt.

Die Ergebnisse unserer Studie unterstreichen somit die Bedeutung einer lokalen Therapie, die gerade auch bei Patienten ohne systemischen Allergienachweis ihre Berechtigung hat.

Das Chemokin IL-8, welches zur C-X-C-Familie gehört, wird in der Nasenschleimhaut primär von Epithelzellen und Mastzellen produziert und sezerniert [37, 57]. Es hat den größten chemotaktischen Einfluss auf neutrophile Granulozyten, welche durch dieses Chemokin aktiviert werden [32].

In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sich erhöhte IL-8-Produktionen sowohl bei akuter Sinusitis in Nasennebenhöhlenschleimhaut [58] als auch bei Patienten mit allergischer Rhinitis nach nasaler Allergenprovokation in der Nasenlavage nachweisen lassen [58, 59].

In unserer Studie konnten wir ebenfalls erhöhte Werte für IL-8 finden. Dabei waren die gemessenen Produktionen in beiden nasal provozierten Gruppen (Allergiker und Nicht-Allergiker) ähnlich hoch und unterschieden sich hochsignifikant von den niedrigeren Werten der nicht nasal provozierten nicht-allergischen Kontrollen sowie Allergikern in der Saison.

Die Beobachtungen der erhöhten IL-8-Produktion nach nasaler Allergenprovokation unserer Studie gehen konform mit den Ergebnissen früherer Studien, in denen IL-8 ebenfalls in erhöhter Konzentration in nasalem Sekret bei Allergikern nach Allergenprovokation nachgewiesen wurde [26]. Hier zeigte sich, dass IL-8 nach nasaler Allergenprovokation nicht nur initial in ähnlicher Weise wie Histamin ansteigt, sondern auch noch nach längerer Zeit in signifikant erhöhtem Maße gebildet wird. Die Ähnlichkeit des Kurvenverlaufes von IL-8 und Histamin legt die Vermutung nahe, dass auch IL-8 in präformierten Zellgranula vorkommt und auf einen bestimmten Reiz hin ausgeschüttet wird. Die Ergebnisse unserer Studie, in der in beiden nasal provozierten Patientengruppen (Allergiker und Nicht-Allergiker) signifikant erhöhte Werte für IL-8 gefunden wurden, spricht ebenfalls für das Vorliegen von präformiertem IL-8 in Zellgranula, welches auf einen bestimmten Stimulus (hier der Allergenprovokation) hin ausgeschüttet wird. In-vitro konnte gezeigt werden, dass IL-8 in solchen Granula zum Beispiel in Mastzellen vorliegt und nach crosslinking der IgE-Rezeptoren plötzlich freigesetzt wird [60]. Die genaue Ursache für die erhöhte Produktion von IL-8 bei nicht-allergischen, allergenprovozierten Patienten, lässt sich aus unseren Ergebnissen nicht erkennen. Möglicherweise spiegelt sie die Aktivierung von Epithelzellen in dieser Gruppe wieder.

Dass dem Chemokin IL-8 in der Pathophysiologie des chronischen Verlaufs der allergischen Rhinitis keine entscheidende Rolle zuzukommen scheint, zeigt sich in unserer Studie an den sehr niedrigen Werten für IL-8 bei allergischen Patienten in der Saison. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in einer Studie von Bachert beschrieben, in der sich keine signifikante Änderung der IL-8-Produktion bei Allergikern in der Allergensaison im Vergleich zu nicht-allergischen Kontrollpatienten fand. [61] Außerdem konnte in einer anderen Untersuchung demonstriert werden, dass die Blockade von IL-8 mit spezifischen Antikörpern dessen chemotaktische Aktivität auf Granulozyten nur unwesentlich reduzierte [59]. Zusammenfassend scheint daher vieles darauf hinzuweisen, dass IL-8 im Rahmen der allergischen Rhinitis nicht das wesentliche Chemokin zur Chemotaxis eosinophiler Granulozyten ist, sondern eher Chemokine der CC-Familie eine Rolle zu spielen scheinen [62, 63].

Gewichtung der Th1- und Th2-Zytokine

Da wir in unserer Studie sowohl erhöhte Produktionen von Th2- als auch von Th1-Zytokinen nachweisen konnten, diese aber in den einzelnen Gruppen eine relativ große Streuung zeigten, erschien uns neben der isolierten Betrachtung der Produktion einzelner Zytokine, eine relative Betrachtung der unterschiedlichen Zytokinsubgruppen sowie deren Gewichtung sinnvoll. In verschiedenen Studien wurde bereits auf den Stellenwert der Balance zwischen den beiden T-Helfer-Zell-Subgruppen mit den von ihnen produzierten Zytokinen für den Verlauf der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis verwiesen. So wurde die Balance von Th1- und Th2-Zytokinen bereits von Moverare in PBMC-Kulturen allergischer Patienten untersucht, wobei sich hier eine stärkere Gewichtung der Th2-Zytokine nach in-vitro-Stimulation mit Allergenen zeigte [47].

Wir bildeten die Quotienten aus den Th2-Zytokinen IL-4, IL-5 und IL-13 und dem Th1-Zytokin IFN- γ für jeden einzelnen Patienten, um so einen Eindruck über das gesamte Zytokinmilieu der allergisch entzündeten Nasenschleimhaut unserer Patienten zu bekommen. Dabei zeigten sich signifikant niedrigere Werte für die Quotienten IL-5/IFN- γ und IL-13/IFN- γ in der Gruppe allergischer Patienten in der Saison im Vergleich zu einmalig provozierten Allergikern, also eine gegenüber der einmalig nasal provozierten Patientengruppe stärkere Gewichtung des Th1-Zytokins IFN- γ . Der Quotient aus IL-4 und IFN- γ zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Diese Ergebnisse bekräftigen die von uns aufgestellte Hypothese, dass eine kontinuierliche 24-Stunden-Allergen-Exposition, wie sie typischerweise bei Patienten mit allergischer Rhinitis während der Allergensaison anzutreffen ist, eher zu einer erhöhten Produktion von Th1-Zytokinen führt, als eine kurzzeitige experimentell erzeugte Allergenexposition. Dies zeigt, dass die Dauer der Exposition gegenüber einem Allergen bei Patienten mit allergischer Rhinitis einen wichtigen Faktor für die Ausbildung eines bestimmten Zytokinmilieus darstellt. So konnten wir durch unsere Untersuchungen zeigen, dass auch nach in-vivo-Stimulation (in Form der nasaler Allergenprovokation) sich keine klare Trennung zwischen Th1- und Th2-Zytokinen vollziehen lässt, sondern es auch in dieser Situation zu einer parallelen Produktion beider Zytokinsubgruppen nebeneinander kommen kann, ohne dass es zu einer

Diskussion

direkten Antagonisierung kommt. Eine ähnliche Sichtweise wurde bereits in einer Studie von Laaksonen formuliert, da auch hier nach in-vitro-Allergen-Stimulation von PBMCs allergischer Patienten sowohl erhöhte Werte für IL-4 als auch für IFN- γ nachgewiesen werden konnten [23].

Zytokinproduktion der provozierten versus der nicht provozierten Nasenseite

Neben der alleinigen Untersuchung der Zytokinprofile in der Nasenschleimhaut unserer Patienten nach nasaler Allergenprovokation untersuchten wir bei 11 Patienten mit allergischer Rhinitis darüber hinaus die nicht provozierte Gegenseite. Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Zytokinausschüttung in nasalem Sekret nach unilateraler Allergenprovokation legten bereits den Verdacht nahe, dass es neben der Reaktion der ipsilateralen Nasenseite ebenfalls zu einer Mitreaktion der nicht provozierten Gegenseite kommt [26].

Der Vergleich der provozierten Nasenseite mit der nicht provozierten Gegenseite erbrachte bei den von uns untersuchten Patienten mit allergischer Rhinitis außer für IL-4 ($p=0,0278$) keine signifikanten Unterschiede. Bei allen anderen Zytokinen, außer bei IL-13, lagen die gemessenen Werte der nicht provozierten Seite im Mittel etwas unterhalb der Werte der provozierten Nasenseite, ohne sich signifikant zu unterscheiden. Diese Beobachtungen zeigen, dass es nach unilateraler Allergenprovokation bei allergischen Patienten nicht nur zu erhöhten Zytokinausschüttungen der provozierten, sondern ebenfalls der nicht provozierten Nasenseite kommt.

Diese Beobachtungen bekräftigen vorherige Untersuchungen, bei denen ebenfalls eine erhöhte Sekretion von Zytokinen [26] sowie Prostaglandin D₂ [17] und Histamin [16] in nasalem Sekret nach unilateraler Allergenprovokation nachgewiesen werden konnten. Eine mögliche Erklärung für die Reaktion der Gegenseite wird in der Auslösung neuronaler Reflexe gesehen, die durch die nasale Allergenstimulation ausgelöst werden [64, 65]. Den größten Hinweis darauf, dass eine nervale Beteiligung bei der allergischen Rhinitis eine Rolle zu spielen scheint, geben Studien, in denen eine Neurektomie des Nervus canalis pterigoidei durchgeführt wurde. Eine derartige Unterbrechung der parasympathischen Innervation führte hier zu einer verminderten Histamin-Sekretion nach nasaler Allergenprovokation [66]. Während sich die gesteigerte nasale Sekretion sowie die Obstruktion der Luftpassage durch die Nase der Gegenseite in der Spätphasereaktion durch derartige Reflexe in hinreichender Weise erklären lassen, erscheint demgegenüber die Ursache für die

Diskussion

Einwanderung von Entzündungszellen in die Schleimhaut der kontralateralen nicht provozierten Nasenseite dadurch nicht direkt erklärbar.

Es konnte jedoch in Studien gezeigt werden, dass eine nasale Allergenstimulation neben den lokalen Effekten an der Nasenschleimhaut auch systemische Reaktionen zur Folge hat. Diese präsentieren sich insbesondere in einem Einstrom von Vorläuferzellen der basophilen und eosinophilen Linie aus dem Knochenmark in den systemischen Blutkreislauf, von wo aus sie durch Chemokine gesteuert in entsprechende Regionen des Effektororgans der Nasenschleimhaut gelangen [28].

Die Mitbeteiligung der kontralateralen Nasenseite nach unilateraler Allergenprovokation lässt sich somit am wahrscheinlichsten durch eine Kombination beider Mechanismen erklären, also neuronalen Reflexen der Gegenseite in Kombination mit einer gesteigerten Ausschwemmung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den systemischen Kreislauf. Aufgrund einer gesteigerten Gefäßpermeabilität infolge der Vasodilatation im Rahmen der allergischen Rhinitis wird in der Folge eine Diapedese dieser Zellen in die entzündliche Nasenschleimhaut begünstigt. Darüber hinaus muss man davon ausgehen, dass sich bei allergischen Patienten auch außerhalb der Saison eine nicht unerhebliche Anzahl „ruhender“ Entzündungszellen in der Nasenschleimhaut befindet, welche durch neuronale Reflexe aktiviert werden können und ihrerseits die Ausbildung eines bestimmten Zytokinmilieus induzieren. Andererseits lässt sich auch durch den Versuchsaufbau unserer Studie mit einer Allergenprovokation mittels Nasenspray ein Kontakt der nicht primär provozierten Nasenschleimhaut mit dem Allergen nicht vollständig ausschließen. Dass die Relevanz eines solchen Allergenkontakts zur nicht stimulierten Nasenseite als Störfaktor aber eher als gering einzustufen ist, zeigt die Ähnlichkeit unserer Ergebnisse mit Studien, bei denen die Allergenapplikation mittels der Disc-Methode erfolgte [26].

Somit sprechen auch die Ergebnisse unserer aktuellen Untersuchung dafür, dass die allergische Rhinitis keine Erkrankung ist, die auf eine Region begrenzt bleibt, sondern auch Teile der Nasenschleimhaut mit einbezieht, die primär keinen Kontakt zum Allergen hatten.

Zusammenfassung

Die allergische Rhinitis stellt mit einer Prävalenz von 15 – 25 % ein immer größer werdendes sowohl individualmedizinisches als auch sozioökonomisches Problem dar. Daher erscheint ein möglichst exaktes Verständnis der immunologischen Zusammenhänge unabdingbar, insbesondere in Hinblick auf die Entwicklung neuer, spezifischer wirkender Therapien mit möglichst geringem Nebenwirkungsspektrum.

Das Ziel unserer Studie war daher die Untersuchung der Zytokinprofile in der Nasenschleimhaut allergischer Patienten mittels der sensitiven Methode des ELISPOT-Assay unter verschiedenen Bedingungen der Allergenexposition. Im Zentrum der Fragestellung stand dabei die Hypothese, dass es im Rahmen einer kontinuierlichen Allergenexposition in der Saison zu einer verstärkten Synthese und Sekretion von Th1-Zytokinen kommt, während die kurzzeitige einmalige experimentelle Allergenprovokation eher zu einer verstärkten Th2-Zytokin-Produktion führt.

Darüber hinaus untersuchten wir bei den nasal provozierten Patienten auch die Zytokinproduktion der Gegenseite mit der Fragestellung: Führt eine einseitige nasale Allergenprovokation neben der Zytokinsynthese auf der ipsilateralen Nasenseite auch zu einer gesteigerten Synthese von Zytokinen auf der nicht provozierten Gegenseite?

Wir untersuchten die mittels Conchotomie im Rahmen einer Operation gewonnene Nasenschleimhaut allergischer Patienten und nicht-allergischer Kontrollen während der Allergensaison bzw. nach experimenteller nasaler Allergenprovokation auf folgende Zytokine: Die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, die Th1-Zytokine IL-12 und IFN- γ , sowie das Chemokin IL-8 und das Immunglobulin IgE.

Wir konnten mit unserem Verfahren in allen Patientengruppen alle gemessenen Zytokine in deutlich messbaren Konzentrationen in der Nasenschleimhaut nachweisen. Dabei zeigten sich deutlich höhere Werte in den Gruppen allergischer Patienten im Vergleich zu nicht-allergischen Kontrollen sowohl bei den Th2-

Zusammenfassung

Zytokinen IL-4 und IL-5, als auch bei den Th1-Zytokinen IL-12 und IFN- γ sowie dem Immunglobulin IgE. Bis auf IL-12 lagen von diesen Zytokinen die Produktionen bei den Allergikern in Saison im Allgemeinen etwas höher als bei einmalig nasal provozierten Allergikern, ein signifikanter Unterschied zeigte sich hier aber in keinem Fall. Diese Ergebnisse unterstreichen nochmals die Bedeutung der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 in der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis, stehen jedoch in Widerspruch zu Studien, in denen keine oder gar eine supprimierte Synthese von Th1-Zytokinen bei Patienten mit allergischer Rhinitis nachgewiesen wurde. Wir konnten somit zeigen, dass sich mit ausreichend sensitiven Verfahren sowohl erhöhte Th2- als auch Th1-Zytokine bei Allergikern mit symptomatischer allergischer Rhinitis nachweisen lassen, ohne dass diese sich gegenseitig effektiv antagonisieren.

Die Zytokinproduktion der nicht nasal provozierten Gegenseite lag in unserer Studie bei den meisten Zytokinen (außer IL-13) etwas unterhalb der Produktion der provozierten Nasenseite, unterschied sich aber – außer bei IL-4 – bei keinem Zytokin signifikant. Somit zeigen die Ergebnisse unserer Studie eindrücklich, dass sich nach einseitiger nasaler Allergenprovokation nicht nur – wie in vorherigen Studien gezeigt – erhöhte Zytokinwerte in nasalem Sekret der unprovozierten Gegenseite nachweisen lassen, sondern sich hierfür ebenfalls ein entsprechendes Korrelat des vorliegenden Zytokinprofils in der Nasenschleimhaut findet.

Die gebildeten Ratios von Th1- und Th2-Zytokinen erbrachten einen besseren Überblick über die Gewichtung der Zytokinsubgruppen bei den einzelnen Patienten. Dabei zeigten sich signifikant höhere Werte für IL-5 / IFN- γ sowie für IL-13 / IFN- γ in der Gruppe nasal provozierter Allergiker, also eine stärkere Gewichtung des Th1-Zytokins IFN- γ bei den Allergikern in der Saison gegenüber einmalig nasal provozierten allergischen Patienten. Diese Beobachtung bestärkt unsere Hypothese, dass eine kontinuierliche, chronische Exposition gegenüber dem sensibilisierten Allergen bei Patienten mit allergischer Rhinitis zu einer in Relation zur Th2-Zytokin-Produktion verstärkten Synthese von Th1-Zytokinen führt. Diese Daten weisen somit erneut darauf hin, dass eine allergische Reaktion der Nasenschleimhaut nicht allein als Th2-getragene Immunreaktion zu verstehen ist, sondern es vor allem bei Langzeitexposition gegenüber dem Allergen ebenfalls zu einer vermehrten Synthetisierung von Th1-Zytokinen kommt. Ein therapeutischer Ansatz, der also nur

Zusammenfassung

gegen Th2-Zytokine gerichtet ist oder gar den Th1-Zytokinen antiinflammatorisches Potential in der allergisch entzündeten Nasenschleimhaut zuweist, stellt nach den Ergebnissen unserer Studie daher nicht den korrekten Weg dar, eine allergische Reaktion der Nasenschleimhaut im Rahmen der allergischen Rhinitis effektiv und nachhaltig zu antagonisieren. Vielmehr sollte es das Ziel einer modernen Therapie sein, das ursprüngliche Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zytokinen wiederherzustellen.

Literaturverzeichnis

1. Bousquet, J., P. Van Cauwenberge, and N. Khaltaev, *Allergic rhinitis and its impact on asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(5 Suppl): p. S147-334.
2. Bauchau, V. and S.R. Durham, *Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe*. Eur Respir J, 2004. **24**(5): p. 758-64.
3. Maziak, W., et al., *Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Munster, Germany*. Allergy, 2003. **58**(7): p. 572-9.
4. Verlato, G., et al., *Is the prevalence of adult asthma and allergic rhinitis still increasing? Results of an Italian study*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(6): p. 1232-8.
5. Kaiser, H.B., *Risk factors in allergy/asthma*. Allergy Asthma Proc, 2004. **25**(1): p. 7-10.
6. Nicolai, T., et al., *Increased prevalence of sensitization against aeroallergens in adults in West compared with East Germany*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**(8): p. 886-92.
7. Kay, A.B., *Allergy and allergic diseases. First of two parts*. N Engl J Med, 2001. **344**(1): p. 30-7.
8. Maurer, M. and T. Zuberbier, *Undertreatment of rhinitis symptoms in Europe: findings from a cross-sectional questionnaire survey*. Allergy, 2007. **62**(9): p. 1057-63.
9. Ciprandi, G., I. Cirillo, and A. Pistorio, *Impact of allergic rhinitis on asthma: effects on spirometric parameters*. Allergy, 2008. **63**(3): p. 255-60.
10. Cookson, W., *The alliance of genes and environment in asthma and allergy*. Nature, 1999. **402**(6760 Suppl): p. B5-11.
11. Bachert, C. and P. van Cauwenberge, *The WHO ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma) initiative*. Chem Immunol Allergy, 2003. **82**: p. 119-26.
12. Van Hoecke, H., et al., *Classification and management of allergic rhinitis patients in general practice during pollen season*. Allergy, 2006. **61**(6): p. 705-11.
13. Riechelmann, H., et al., *[Application of the nasal provocation test on diseases of the upper airways. Position paper of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (ENT Section) in cooperation with the Working Team for Clinical Immunology]*. Laryngorhinootologie, 2003. **82**(3): p. 183-8.
14. Turner, H. and J.P. Kinet, *Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI*. Nature, 1999. **402**(6760 Suppl): p. B24-30.
15. Williams, C.M. and S.J. Galli, *The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(5): p. 847-59.
16. Wagenmann, M., et al., *Bilateral increases in histamine after unilateral nasal allergen challenge*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(2): p. 426-31.
17. Wagenmann, M., et al., *Unilateral nasal allergen challenge leads to bilateral release of prostaglandin D2*. Clin Exp Allergy, 1996. **26**(4): p. 371-8.
18. Naclerio, R.M., et al., *Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis*. N Engl J Med, 1985. **313**(2): p. 65-70.

19. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. 1986. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 5-14.
20. Constant, S.L. and K. Bottomly, *Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 297-322.
21. Rogers, P.R. and M. Croft, *Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1205-13.
22. Akdis, M., K. Blaser, and C.A. Akdis, *T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(5): p. 961-8; quiz 969.
23. Laaksonen, K., et al., *In vitro kinetics of allergen- and microbe-induced IL-4 and IFN-gamma mRNA expression in PBMC of pollen-allergic patients*. Allergy, 2003. **58**(1): p. 62-6.
24. Durham, S.R., et al., *Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **97**(6): p. 1356-65.
25. Wagenmann, M., et al., *Der ELISPOT-Assay, eine hochsensitive Methode zur Untersuchung der Zytokinproduktion der Nasenschleimhaut*. Allergologie, 2005. **28**(10): p. 401-411.
26. Wagenmann, M., L. Schumacher, and C. Bachert, *The time course of the bilateral release of cytokines and mediators after unilateral nasal allergen challenge*. Allergy, 2005. **60**(9): p. 1132-8.
27. Lampinen, M., et al., *Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease*. Allergy, 2004. **59**(8): p. 793-805.
28. Denburg, J.A., *Bone marrow in atopy and asthma: hematopoietic mechanisms in allergic inflammation*. Immunol Today, 1999. **20**(3): p. 111-3.
29. Masuyama, K., et al., *Nasal eosinophilia and IL-5 mRNA expression in seasonal allergic rhinitis induced by natural allergen exposure: effect of topical corticosteroids*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **102**(4 Pt 1): p. 610-7.
30. Czerkinsky, C.C., et al., *A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 109-21.
31. Sedgwick, J.D. and P.G. Holt, *A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells*. J Immunol Methods, 1983. **57**(1-3): p. 301-9.
32. Borish, L. and L.J. Rosenwasser, *Cytokines in allergic inflammation*. Allergy, Principles & Practice. St. Louis: Mosby, 1998. **Fifth Edition**: p. 108-123.
33. Moser, R., J. Fehr, and P.L. Bruijnzeel, *IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals*. J Immunol, 1992. **149**(4): p. 1432-8.
34. Abehsira-Amar, O., et al., *IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells*. J Immunol, 1992. **148**(12): p. 3820-9.
35. Durham, S.R., et al., *Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia*. J Immunol, 1992. **148**(8): p. 2390-4.

36. Bradding, P., et al., *Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation.* J Immunol, 1993. **151**(7): p. 3853-65.
37. Bradding, P., et al., *Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content.* J Immunol, 1995. **155**(1): p. 297-307.
38. Erin, E.M., et al., *Topical corticosteroid inhibits interleukin-4, -5 and -13 in nasal secretions following allergen challenge.* Clin Exp Allergy, 2005. **35**(12): p. 1608-14.
39. Borish, L.C., et al., *Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma.* J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(6): p. 963-70.
40. Zurawski, G. and J.E. de Vries, *Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells.* Immunol Today, 1994. **15**(1): p. 19-26.
41. Bochner, B.S., et al., *IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells.* J Immunol, 1995. **154**(2): p. 799-803.
42. Ghaffar, O., et al., *IL-13 mRNA and immunoreactivity in allergen-induced rhinitis: comparison with IL-4 expression and modulation by topical glucocorticoid therapy.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(1): p. 17-24.
43. Clutterbuck, E.J., E.M. Hirst, and C.J. Sanderson, *Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GM-CSF.* Blood, 1989. **73**(6): p. 1504-12.
44. Broide, D.H., *Molecular and cellular mechanisms of allergic disease.* J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(2 Suppl): p. S65-71.
45. Sim, T.C., et al., *Proinflammatory cytokines in nasal secretions of allergic subjects after antigen challenge.* Am J Respir Crit Care Med, 1994. **149**(2 Pt 1): p. 339-44.
46. Wilson, D.R., et al., *Grass pollen immunotherapy: symptomatic improvement correlates with reductions in eosinophils and IL-5 mRNA expression in the nasal mucosa during the pollen season.* J Allergy Clin Immunol, 2001. **107**(6): p. 971-6.
47. Moverare, R., et al., *Study of the Th1/Th2 balance, including IL-10 production, in cultures of peripheral blood mononuclear cells from birch-pollen-allergic patients.* Allergy, 2000. **55**(2): p. 171-5.
48. Imada, M., et al., *Allergen-stimulated interleukin-4 and interferon-gamma production in primary culture: responses of subjects with allergic rhinitis and normal controls.* Immunology, 1995. **85**(3): p. 373-80.
49. Grewe, M., et al., *Analysis of the cytokine pattern expressed in situ in inhalant allergen patch test reactions of atopic dermatitis patients.* J Invest Dermatol, 1995. **105**(3): p. 407-10.
50. Grewe, M., et al., *Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses.* J Immunol, 1998. **161**(1): p. 415-20.
51. Stern, A.S., J. Magram, and D.H. Presky, *Interleukin-12 an integral cytokine in the immune response.* Life Sci, 1996. **58**(8): p. 639-54.
52. Hilkens, C.M., et al., *Lack of IL-12 signaling in human allergen-specific Th2 cells.* J Immunol, 1996. **157**(10): p. 4316-21.

53. Wright, E.D., et al., *Expression of interleukin (IL)-12 (p40) and IL-12 (beta 2) receptors in allergic rhinitis and chronic sinusitis*. Clin Exp Allergy, 1999. **29**(10): p. 1320-5.
54. Bachert, C. and U. Ganzer, *[Demonstration of IgE associated cells in atopic nasal mucosa using the immunoperoxidase method]*. Laryngol Rhinol Otol (Stuttg), 1987. **66**(11): p. 573-6.
55. Durham, S.R., et al., *Expression of epsilon germ-line gene transcripts and mRNA for the epsilon heavy chain of IgE in nasal B cells and the effects of topical corticosteroid*. Eur J Immunol, 1997. **27**(11): p. 2899-906.
56. Fokkens, W.J., J.G. Vinke, and A. KleinJan, *Local IgE production in the nasal mucosa: a review*. Am J Rhinol, 2000. **14**(5): p. 299-303.
57. Nonaka, M., et al., *GM-CSF, IL-8, IL-1R, TNF-alpha R, and HLA-DR in nasal epithelial cells in allergic rhinitis*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(5): p. 1675-81.
58. Rudack, C., et al., *[Cytokine pattern in various forms of sinusitis]*. Laryngorhinootologie, 1998. **77**(1): p. 34-7.
59. Gosset, P., et al., *Interleukin-8 secretion in patients with allergic rhinitis after an allergen challenge: interleukin-8 is not the main chemotactic factor present in nasal lavages*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**(4): p. 379-88.
60. Tachimoto, H., et al., *Reciprocal regulation of cultured human mast cell cytokine production by IL-4 and IFN-gamma*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(1 Pt 1): p. 141-9.
61. Bachert, C., M. van Kempen, and P. Van Cauwenberge, *Regulation of proinflammatory cytokines in seasonal allergic rhinitis*. Int Arch Allergy Immunol, 1999. **118**(2-4): p. 375-9.
62. Weido, A.J., et al., *Intranasal fluticasone propionate inhibits recovery of chemokines and other cytokines in nasal secretions in allergen-induced rhinitis*. Ann Allergy Asthma Immunol, 1996. **77**(5): p. 407-15.
63. Minshall, E.M., et al., *Eotaxin mRNA and protein expression in chronic sinusitis and allergen-induced nasal responses in seasonal allergic rhinitis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(6): p. 683-90.
64. Baroody, F.M., M. Wagenmann, and R.M. Naclerio, *Comparison of the secretory response of the nasal mucosa to methacholine and histamine*. J Appl Physiol, 1993. **74**(6): p. 2661-71.
65. Wagenmann, M., et al., *The effect of terfenadine on unilateral nasal challenge with allergen*. J Allergy Clin Immunol, 1994. **93**(3): p. 594-605.
66. Rucci, L., et al., *Vidian nerve resection, histamine turnover and mucosal mast cell function in patients with chronic hypertrophic non-allergic rhinitis*. Agents Actions, 1989. **28**(3-4): p. 224-30.

Anhang

Anamnesebogen

Allergie-Anamnese

Studie: Zytokinprofile bei natürlicher und experimenteller Allergenprovokation

Name:	
Vorname:	
Geb.-Datum:	
Test-Datum:	

FA – Allergien
Asthma
Ekzeme

EA – Kindheit: Allergien
Milchschorf Ekzeme
Atemwegserkrankungen
Operationen der Nase, NNH:

Medikamente:
Allergieteste:

Hyposensibilisierungen:

JA – Hauptsymptome: Rhinitis wässrig, grün-gelb Schleimhautschwellung
Niesreiz Juckreiz Konjunktivitis
Asthma Gastrointestinale Erkrankungen
Hauterscheinungen
Andere Symptome:

Jahreszeitliche Abhängigkeit:
Tageszeitliche Abhängigkeit:
Örtliche Abhängigkeit:
Wohnverhältnisse:

Haustiere:
Beruf:

Hobbys:
Nahrungsmittelunverträglichkeiten:
Medikamentenunverträglichkeiten:

NPT:

Besonderes:

Einverständniserklärung für die Teilnahme an der Studie



Einverständniserklärung zur

- Durchführung nasaler Allergenprovokationen
- Verwendung von während der OP entnommenem Gewebe

für Zwecke medizinischer Forschung

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

im Rahmen unserer Studien zur Untersuchung der allergischen Rhinitis möchten wir bei Ihnen eine nasale Provokation mit Allergenen durchführen.

Dazu werden wir am Nachmittag vor ihrer OP eine Lösung aus Allergenen - das sind natürlich vorkommende Substanzen (z.B. aus Gräserpollen gewonnen), die die allergische Reaktion Ihrer Nase auslösen - auf die Nasenschleimhaut auftragen. Dies geschieht mit einem Spray. Kurz nach dem Auftragen werden die Ihnen bekannten Symptome der allergischen Rhinitis auftreten: Sie werden niesen, Ihre Nase wird laufen und die Nasenatmung erschwert sein. Außerdem kann es zu Jucken in den Augen, zu Tränenfluss und zu einem Jucken im Rachenbereich kommen. Diese Beschwerden können einige Stunden anhalten.

Nach der Provokation werden wir eine Messung der Nasenatmung durchführen, um die Symptomatik objektiv zur Darstellung bringen zu können.

Gewebeteile Ihrer Nasenschleimhaut, die am nächsten Tag während der OP anfallen und keiner weiteren Untersuchung im Pathologie-Labor unserer Klinik bedürfen, werden ins HNO-Forschungslabor geschickt. Diese Gewebe möchten wir feingeweblich und molekularbiologisch untersuchen, um Zellpopulationen und entsprechende Botenstoffe zu identifizieren, die maßgeblich zur Entstehung und Aufrechterhaltung allergischer Entzündungen beitragen.

Diese Untersuchungen dienen ausschließlich der Grundlagenforschung. Ein unmittelbarer Nutzen aus solchen Untersuchungen ist für Sie selbst oder für die behandelnden Ärzte nicht zu erwarten. Die Ergebnisse werden jedoch möglicherweise in Zukunft zu verbesserten Behandlungsmethoden führen.

Teilnahme an der Untersuchung

Ihr Einverständnis zur Nutzung der bei Ihnen entnommenen Gewebe zu Forschungszwecken ist selbstverständlich rein freiwillig. Sie können jederzeit ohne Angaben von Gründen widerrufen. Für die Behandlung entstehen Ihnen dadurch natürlich keine Nachteile.

Risiken

- Allergenprovokation -

In seltenen Fällen kann es nach einer Allergenprovokation der Nase zum Auftreten von Schwellungen im Rachenbereich oder des Gaumenzäpfchens (Uvula) kommen. Sehr selten kommt es zu Beschwerden im Bereich der unteren Atemwege im Sinne eines Asthma bronchiale mit Atemnot. Dies ist wahrscheinlicher, wenn Sie früher bereits asthmatische Beschwerden hatten. Diese vorübergehende Verengung der Atemwege kann durch die Anwendung von Bronchienerweiternden Medikamenten rückgängig gemacht werden. Unsere Mitarbeiter sind mit der Anwendung und Indikation solcher Therapeutika gut vertraut.



MEDIZINISCHE EINRICHTUNGEN
Hals-, Nasen- und Ohrenklinik
Direktor: Universitätsprofessor Dr. J. Schipper

Extrem selten kann es nach einer nasalen Allergenprovokation zum Auftreten von Allgemeinsymptomen im Sinne eines anaphylaktischen Schocks kommen. Anzeichen für die Entwicklung eines anaphylaktischen Schocks wären ein Hautausschlag, Jucken der Handflächen, Atemnot, Kurzatmigkeit, schneller Pulsschlag, Unruhe. Dieses akute und lebensbedrohliche Krankheitsbild muss durch die Verabreichung von Adrenalin und eventuell weiterer auch intravenös verabreichter Medikamente behandelt werden. Auch darin sind unsere Mitarbeiter geschult.

Falls bei Ihnen Gegenanzeigen zur Anwendung solcher Medikamente bestehen, sollten Sie uns dies bitte jetzt mitteilen. Auch über Medikamentenunverträglichkeiten bitten wir Sie, uns in Kenntnis zu setzen.

- Entnahme von Gewebe -

Es wird Ihnen während Ihrer Operation kein zusätzliches Gewebe entnommen. Wir verwenden lediglich Gewebe, welches während der OP anfällt und nicht zur weiteren Diagnostik benötigt wird. Für die Operation und deren Risiken erhalten Sie eine separate Aufklärung.

Vertraulichkeit der Daten und Datenschutz

Alle im Rahmen der Untersuchungen erhobenen personenbezogenen Daten werden entsprechend der ärztlichen Schweigepflicht und den gesetzlichen Bestimmungen des Datenschutzes vertraulich behandelt. Die Weitergabe von Daten und ihre wissenschaftliche Auswertung erfolgt anonymisiert, d.h. ohne Angabe Ihres Namens und werden niemandem als (auf Ihren Wunsch hin) Ihnen selbst zugänglich gemacht. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf hat dieses Projekt beurteilt und festgestellt, dass keine ethischen oder rechtliche Bedenken gegen die Durchführung dieser Untersuchungen bestehen.

Einwilligungserklärung

Über den Inhalt, Ablauf und Tragweite der geplanten Untersuchungen wurde ich aufgeklärt. Ich habe diese Patienteninformation gelesen, verstanden und alle meine Fragen klären können. Hiermit stimme ich der Durchführung nasaler Allergenprovokationen im Rahmen der mir geschilderten Studien zu. Ich bin damit einverstanden, dass die gewonnenen Untersuchungsmaterialien (Nasenschleimhautzellen) für Zwecke medizinischer Forschung verwendet werden.

Name _____

Ort und Datum _____ Unterschrift _____

Die Aufklärung erfolgte durch:

Name _____

Ort und Datum _____ Unterschrift _____

Publikationen

S276 Abstracts

J ALLERGY CLIN IMMUNOL
FEBRUARY 2008**1064 Nerve Growth Factor Modulates Toll-like Receptor Expression In A Human Conjunctival Epithelial Cell Line**

A. Micera^{1,2}, A. Lambiase², B. Stampachiachiere^{1,2}, S. Bonini^{3,4}, S. Bonini²; ¹IRCCS-G.B. Bietti Eye Foundation, Rome, ITALY, ²CIR Dept. Ophthalmology University Campus Bio-Medico, Rome, ITALY, ³Internal Medicine, Second University of Naples, Naples, ITALY, ⁴Institute of Neurobiology and Molecular Medicine, National Research Council, Rome, ITALY.

RATIONALE: Toll-like receptors (TLRs) are expressed in healthy human conjunctiva and undergo changes during inflammatory states. Growth factors might modulate the local immune response and TLR expression. The aim of this study was to verify the capacity of Nerve Growth Factor (NGF), a pleiotropic factor involved in both allergic inflammation and associated tissue remodelling, to influence TLR expression in a human conjunctival epithelial cell line.

METHODS: A human conjunctival epithelial cell line (CjEC) was exposed to increasing NGF concentrations (0-250 ng/mL NGF). Periodic Acid Schiff staining was performed to prove CjEC differentiation. At different time-points, total RNA and proteins were extracted and analysed for $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$, p75^{NTR} and TLR2/4/9 expression by real-time PCR, FACS, Western blot and confocal analysis. The MTS/ki67/TUNEL analysis was also performed to verify the cell behaviour (cell cycle/apoptosis). Statistical analysis was according to the ANOVA test.

RESULTS: CjEC expressed both $\text{trkA}^{\text{NGFR}}$ and p75^{NTR} receptors at differentiation. NGF (1-10 ng/mL) induced a decrease of TLR2/TLR4 while TLR9 did not change ($p < .05$). More specifically, 100-250 ng/mL NGF increased both TLR2 and TLR9 expression without affecting TLR4 expression ($p < .05$). This expression is particularly intra-cytoplasm and associated with p75^{NTR} expression ($p < .05$). Molecular and biochemical data were aligned.

CONCLUSIONS: Our data demonstrate that NGF might influence local immune innate response via TLR expression. Interestingly, the association of p75^{NTR} with TLR2/TLR9 might indicate further specific roles for NGF during ocular surface inflammation. Particularly, the NGF-induced TLR9 expression might induce different profile of immune activation in response to different ligands.

Funding: IRCCS GB Bietti Eye Foundation

1065 Th2-Cytokines Dominate the Allergic Inflammation after Nasal Allergen Provocation while Chronic Natural Allergen Exposure also induces Th1-Cytokines

M. Wagenmann, A. Pohle, K. Scheckenbach, A. Chaker; Heinrich-Heine University Duesseldorf, Duesseldorf, GERMANY.

RATIONALE: Although Th2-cytokines are regarded as a hallmark of allergic inflammation, we demonstrated in previous studies that both Th2- and Th1-cytokines are increased in the nasal mucosa of allergic rhinitis during natural allergen exposure. To test the hypothesis that the increased production of Th1-cytokines might be related to the chronicity of the disease we analyzed the production of Th2- and Th1-cytokines after a single nasal allergen provocation (NAP) in allergics out of season.

METHODS: NAP was performed in 14 patients with intermittent (seasonal) allergic rhinitis out of season and 13 non-allergic controls. Lower turbinate specimen were obtained one day later. Single cell suspensions were prepared from the surgical material and analyzed with specific ELISPOT-assays to determine the number of cytokine producing cells.

RESULTS: NAP induced significant increases in symptoms, sneezes, and nasal airway resistance in allergics only. The number of IL-4 (38 ± 7 vs. 17 ± 3 -producing cells/100,000 cells, $p = 0.027$ (mean $\pm$ SEM, Wilcoxon-test)) and IL-5 (71 ± 25 vs. 27 ± 10 , $p = 0.04$) producing cells was significantly elevated in allergics compared to controls. No significant differences were found for IFN-gamma (54 ± 16 vs. 44 ± 8 , $p = 0.75$) and IL-12 (107 ± 34 vs. 56 ± 15 , $p = 0.27$).

CONCLUSIONS: This study demonstrates that NAP leads to an increased production of Th2- but not of Th1-cytokines. Since both Th2- and Th1-synthesis was increased during natural allergen exposure, the

chronicity of the natural disease seems to increase the Th1-cytokine synthesis and thus modify the inflammatory response. These results underline the relevance of the experimental conditions under which cytokines are measured and might have relevance to therapeutic strategies for allergic rhinitis.

Funding: Heinrich-Heine-University Duesseldorf

1066 Time Course of Nasal Release of Inflammatory Mediators and Specific-IgE after Nasal Challenge with Grass Pollen in Idiopathic Rhinitis

C. Rondon¹, J. J. Romero¹, M. J. Torres¹, P. Campo¹, C. Mayorga², I. Doña¹, D. Ruiz¹, M. Blanca¹; ¹ALLERGY SERVICE, CARLOS HAYA HOSPITAL, MALAGA, SPAIN, ²RESEARCH LABORATORY, CARLOS HAYA HOSPITAL-FUNDACION IMABIS, MALAGA, SPAIN.

RATIONALE: A new form of localized nasal mucosal allergic disease in the absence of atopy has been proposed. However, the immunological mechanisms involved are not completely understood. The purpose of this study was to evaluate the effect of nasal exposure to grass pollen in intermittent idiopathic rhinitis (IIR) patients who referred symptoms only during spring.

METHODS: Nasal allergen provocation test with grass pollen (NAPT-grass) was performed in 32 subjects with IIR and 50 healthy controls. Symptom scores, acoustic rhinometry, and nasal lavage were performed at baseline, and 15 min, 1, 6 and 24 hours post NAPT. Tryptase, eosinophil cationic protein (ECP), total and specific-IgE to grass pollen were measured in nasal lavage by immunoassays.

RESULTS: NAPT-grass was positive in 20/32 IIR patients (62.5%) and negative in 100% of healthy controls. We detected significant increases of tryptase and ECP in 40% and 45% of NAPT-grass positive patients respectively at 15 min, 1, 6 and 24 hours post NAPT ($p < 0.05$). Specific-IgE was increased in 35% of NAPT-grass positive patients at 1 hour ($p < 0.05$) and 24 hour ($p = 0.02$) post NAPT, while total IgE was not increased. No significant changes in inflammatory mediators or IgE were detected in the NAPT-grass negative patients.

CONCLUSIONS: Monitoring of mediators and specific-IgE release in nasal secretions after NAPT showed local production of specific-IgE, and mast cell/eosinophil activation in IIR patients. These results support the existence of a new form of "local allergic rhinitis" in patients with idiopathic rhinitis.



[Home](#) | [Über das Meeting](#) | [Kontakt](#) | [Impressum](#) | [Englisch](#)

erschienen bei

**79. Jahresversammlung der Deutschen
Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-
Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V.
30.04. bis 04.05.2008, Bonn**



Konferenz

HNO 2008

[Suche in HNO 2008](#)

[Email diesen Artikel](#)

[Ausgabe Formate](#)

[XML](#)

Meeting Abstract

Unterschiedliche Zytokinprofile nach nasaler Allergenprovokation und während natürlicher Allergenexposition

- ✉ **Martin Wagenmann** - HNO-Universitätsklinik, Düsseldorf
- ✉ **Alexander Pohle** - HNO-Universitätsklinik, Düsseldorf
- ✉ **Kathrin Scheckenbach** - HNO-Universitätsklinik, Düsseldorf
- ✉ **Adam Chaker** - HNO-Universitätsklinik, Düsseldorf

Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 79. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Bonn, 30.04.-04.05.2008. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2008. Doc 08hnod023

Die elektronische Version dieses Artikels ist vollständig und ist verfügbar unter:

<http://www.egms.de/en/meetings/hnod2008/08hnod023.shtml>

Veröffentlicht: 22-04-2008

© 2008 Wagenmann et al.

Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel und steht unter den Creative Commons Lizenzbedingungen (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.de>).

Sie dürfen vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden, vorausgesetzt dass Autor und Quelle genannt werden.

[Suche in Medline nach](#)

[Wagenmann M](#)

[Pohle A](#)

[Scheckenbach K](#)

[Chaker A](#)

Gliederung

[Top](#)

[Text](#)

Text

Einleitung: Die Freisetzung von Th2-Zytokinen gilt als typisches Merkmal der Allergie. Dennoch zeigten wir in vorangehenden Studien, dass bei allergischer Rhinitis während natürlicher Allergenexposition sowohl Th2- als auch Th1-Zytokine vermehrt produziert werden. Um die Hypothese zu überprüfen, dass dies im Zusammenhang mit der Chronizität der Erkrankung steht, untersuchten wir die Produktion von Th2- und Th1-Zytokinen in der Nasenschleimhaut nach einer nasalen Allergenprovokation (NPT) allergischer Patienten.

Methoden: Bei 14 Patienten mit einer intermittierenden (saisonalen) allergischen Rhinitis und bei 13 nicht-allergischen Kontrollpatienten führten wir einen NPT außerhalb der Saison durch. Am darauf folgenden Tag wurden Proben aus der unteren Nasenmuschel gewonnen. Daraus wurden Einzelzellsuspensionen angefertigt und mit ELISPOT-Assays die Anzahl der zytokinproduzierenden Zellen bestimmt.

Ergebnisse: NPT verursachte nur bei Allergikern

signifikante Anstiege in Symptomen, Niesen und nasalem Atemwegswiderstand. Die Anzahl der IL-4 ($p=0,027$) und IL-5 ($p=0,04$) produzierenden Zellen war bei Allergikern im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht. Für IL-12 ($p=0,27$) und IFN- γ ($p=0,75$) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Schlussfolgerungen: Diese Studie zeigt, dass NPT zu einer gesteigerten Produktion der Th2- aber nicht der Th1-Zytokine führt. Da hingegen bei natürlicher Allergenexposition sowohl die Th2- als auch die Th1-Synthese vermehrt ist, scheint die Chronizität der natürlichen Erkrankung zu einem Anstieg der Th1-Zytokine zu führen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der experimentellen Bedingungen unter denen Zytokine gemessen werden und könnten zudem relevant für neue Behandlungsstrategien sein.

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Martin Wagenmann, für die Überlassung des Themas sowie die konstruktiven Anregungen und die fortwährende Unterstützung.

Dem Direktor der Hals-Nasen-Ohrenklinik Düsseldorf, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Schipper, sowie dem früheren Direktor, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Uwe Ganzer, danke ich für die Förderung und die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Homey, dem kommissarischen Leiter der Hautklinik Düsseldorf, danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonderer Dank gilt außerdem Frau Maria Gärtner-Akerboom und Frau Petra Helmig aus dem HNO-Forschungslabor für die freundschaftliche Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung.

Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. med. Peter Sommer aus der HNO-Praxis am Schadowplatz, Düsseldorf für die Mithilfe bei der Rekrutierung von Patienten.

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern Doris und Erich Pohle, meinem Bruder Sebastian Pohle und meiner lieben Freundin Jenny für den stetigen Rückhalt, die unendliche Geduld und motivierende Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich - Alexander Pohle - die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ich habe die vorliegende Dissertation weder in der vorliegenden noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf im Dezember 2008.

Alexander Pohle

Lebenslauf

Alexander Pohle

- Curriculum vitae -



Persönliche Angaben:

Geburtsdatum/-ort	03.11.1981 in Wesel
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Erich Pohle (Rektor einer Grundschule), Doris Pohle (Hausfrau)
Bruder	Sebastian Pohle (Arzt)

Ausbildung:

1988 – 1992	Gemeinschaftsgrundschule Alpen (D)
1992 – 2001	Friedrich-Spee-Gymnasium Geldern (D)
2001	Abitur
2001 – 2002	Zivildienst Internistische Intensivstation Krankenhaus Bethanien Moers (D)
seit 2002	Medizinstudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (D)
2004	Physikum (1. Ärztliche Prüfung)
2007-2008	<u>Praktisches Jahr:</u> 1. Tertial: Innere Medizin, Uniklinik Düsseldorf (D) 2. Tertial: Urologie, Kantonsspital Baden (CH) 3. Tertail: Chirurgie, Kantonsspital Baden (CH)
Herbst 2008	Staatsexamen Medizin (2. Ärztliche Prüfung)

Tätigkeiten neben dem Studium:

2002 – 2008	Studentische Aushilfe in der Krankenpflege/ Krankenhaus Bethanien Moers (D)
seit 2003	Tutor in der AG Medizindidaktik der HHU Düsseldorf (für Ultraschall-, FKDS-, und Röntgen-Thorax-Kurse für Ärzte und Studenten)
seit 2005	Promotionsarbeit in der HNO-Klinik der HHU Düsseldorf zum Thema: „Zytokinprofile bei natürlicher und experimenteller Allergenexposition“
seit 2007	verschiedene Dozententätigkeiten an der HHU Düsseldorf (u.a. Tischdozent im anatomischen Präparierkurs, Didaktiktrainings für Ärzte)

Famulaturen:

- Ultraschallambulanz St.Josef-Krh. Haan (D)
- HNO-Klinik der HHU Düsseldorf (D)
- Urologische Klinik Marienhospital Düsseldorf (D)
- Innere Medizin St.Martinushospital Düsseldorf (D)

Sprachkenntnisse:

Latein (grosses Latinum)
Englisch (Schulkenntnisse)
Französisch (Schulkenntnisse)

Ehrenamtliche Tätigkeiten:

- Soziale Arbeit mit Kindern und Jugendlichen bei der
- Ev. Kirchengemeinde Alpen
- Ausbildung zum Gruppen- und Freizeitleiter
- Betreuung von zahlreichen Kinder- und Jugendfreizeiten

Hobbies:

Segeln, Gitarre spielen, Skifahren, Wandern

Zusammenfassung

Zusammenfassung:

Zytokinprofile bei natürlicher und experimenteller Allergenprovokation

Die allergische Rhinitis stellt mit einer Prävalenz von 15 – 25 % ein immer größer werdendes individualmedizinisches und sozioökonomisches Problem dar. Um dieser Erkrankung mit möglichst spezifischen, nebenwirkungsarmen Therapien begegnen zu können, erscheint ein exaktes Verständnis der immunologischen Zusammenhänge unabdingbar. Dass es im Rahmen der allergischen Reaktion der Nasenschleimhaut zu einer vermehrten Sekretion von Th2-Zytokinen wie IL-4 und IL-5 kommt, wurde in verschiedenen Studien gezeigt und ist nicht mehr zweifelhaft. Über das Ausmaß der Th1-Zytokinproduktion bei allergischen Patienten finden sich jedoch widersprüchliche Aussagen. So schreiben einige Autoren den Th1-Zytokinen anti-inflammatorisches Potential zu, während in anderen Studien eine erhöhte Produktion von Th1-Zytokinen bei PBMCs nach Allergenstimulation nachgewiesen werden konnte. Ziel unserer Studie war daher die Überprüfung der Hypothese, dass eine einmalige nasale Allergenprovokation zu einer primären Th2-Zytokinproduktion führt, während es bei chronisch Allergen-exponierten Allergikern in der Saison zu einer zusätzlichen Produktion von Th1-Zytokinen kommt. Wir untersuchten hierfür die Zytokinproduktion in der Nasenschleimhaut von Allergikern und Nicht-Allergikern nach einmaliger nasaler Allergenprovokation und verglichen die Ergebnisse mit allergischen Patienten in der Saison, also während kontinuierlicher Allergenexposition. Durch diesen Versuchsaufbau konnten wir erneut die vermehrte Produktion von Th2-Zytokinen wie IL-4 und IL-5 in der Gruppe allergischer Patienten nachweisen. Jedoch fanden sich auch Th1-Zytokine wie IL-12 und IFN- γ in deutlich messbaren Konzentrationen. Die Berechnung der Ratios der verschiedenen Th2-Zytokine im Verhältnis zum Th1-Zytokin IFN- γ detektierte eine stärkere Gewichtung der Th1-Zytokine bei Allergikern in der Saison im Vergleich zu einmalig nasal provozierten allergischen Patienten. Somit können wir nach Betrachtung der Ergebnisse unserer Studie die aufgestellte Hypothese bekräftigen, dass eine chronische Allergenexposition zu einer im Verhältnis stärkeren Th1-Zytokinproduktion führt, als die einmalige, experimentelle Allergenprovokation. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Chronizität der allergischen Rhinitis einen nicht zu vernachlässigenden Effekt auf das Zytokinmilieu der Nasenschleimhaut zu haben scheint. Eine Therapie, die sich nur gegen Th2-Zytokine richtet oder Th1-Zytokinen sogar anti-inflammatorisches Potential zuspricht, stellt somit nach den Ergebnissen unserer Studie nicht den richtigen Weg zu einer nachhaltigen Therapie der allergischen Rhinitis dar. Vielmehr sollte eine moderne Therapie versuchen, das ursprüngliche Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zytokinen wieder herzustellen.



Priv.-Doz. Dr. med. Martin Wagenmann