

Aus der Universitätsklinik
Abteilung für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Jörg Schipper

**Der zeitliche Verlauf der Freisetzung
von Histamin und Zytokinen aus der
Nasenschleimhaut nach unilateraler Allergieprovokation
bei allergischer Rhinitis**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
vorgelegt von

Lars Schumacher

2009

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

gez: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Wagenmann
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Hänggi

Meinen Eltern.

Abkürzungen

ASS	Acetylsalicylsäure (Aspirin)
BE	Biologische Einheit (Allergenkonzentration in Extrakten)
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CT	Computertomographie
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor)
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist
MBP	<i>Major Basic Protein</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MWU	Mann-Whitney-U (Test)
n	Anzahl
NNH	Nasennebenhöhlen
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
RANTES <i>Secreted</i>	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and presumably</i> (C-C Chemokin)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i> (Adhäsionsmolekül)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Epidemiologie.....	6
1.2 Klinik der allergischen Rhinitis	6
1.3 Ätiologie und Pathogenese der allergischen Rhinitis.....	6
1.4 Therapie der allergischen Rhinitis.....	8
1.5 Ziele der Studie und Fragestellungen	10
2. Probanden und Methodik.....	11
2.1 Probandenauswahl	11
2.2 Versuchstermine	11
2.3 Nasale Provokation mittels Disk-Methode	11
2.4 Weiterverarbeitung der Kollektionsdisks	12
2.5 Symptomerfassung	14
2.6 Rhinomanometrie	14
2.7 Vorversuche zur Zytokinmessung.....	14
2.7.1 Ergebnisse des Vorversuchs Zytokinwiederfindung in Lavagen	15
2.7.2 Ergebnisse Vorversuch zur Wiederfindung von Zytokinen in Disks	15
2.8 Protokoll der nasalen Provokation	16
2.9 Mediator- und Zytokinmessung mittels ELISA	18
2.10 Konzentrationsbestimmung pro Disk	19
2.11 Statistik	19
3. Ergebnisse	19
3.1 Symptome	20
3.2 Sekretionsgewichte	20
3.3 Nasaler Atemwegswiderstand.....	21
3.4 Histamin	22
3.5 Interleukin-1 β	23
3.6 Interleukin-1Ra	25
3.7 Interleukin-8	25
3.8 Interleukin-4	27
4. Diskussion.....	27
5. Zusammenfassung	32
6. Literaturverzeichnis.....	33

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Die Allergische Rhinitis ist die häufigste atopische Erkrankung des Menschen. Man unterscheidet bei der Prävalenz zwischen Kindern und Erwachsenen. Die Prävalenz der allergischen Rhinitis bei Kindern liegt laut der ISAAC-Studie (ISAAC Steering Committee 1998), die weltweit in 57 verschiedenen Ländern erhoben wurde, zwischen 4 und 37 %. Deutschland liegt mit 13 % an 27. Stelle und nimmt einen mittleren Rangplatz ein. Die ICRHS-Studie untersucht junge Erwachsene von 20 bis 44 Jahren aus 22 Ländern Europas und einigen außereuropäischen Ländern im Hinblick auf die Häufigkeit der allergischen Rhinitis. Die Werte variieren zwischen 9,5 % und 40 %. Auch hier liegt Deutschland im mittleren Bereich um 20 %. Innerhalb Deutschlands ergeben sich Unterschiede; in Ostdeutschland leiden Erwachsene weniger häufig unter Allergien als Westdeutsche und sind seltener gegen Inhalationsallergene sensibilisiert. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass jeder fünfte bis sechste Deutsche an einer Allergie leidet.

1.2 Klinik der allergischen Rhinitis

Die saisonale allergische Rhinitis tritt in jahreszeitlicher Abhängigkeit auf, je nach Allergen. Leitsymptome der allergischen Rhinitis sind wässrige Sekretion und Nasenatmungsbehinderung, Niesreiz und Konjunktivitis wechselnder Ausprägung. Oft besteht bei den Allergikern eine Sensibilisierung mit ganzjähriger perennialer Symptomatik gegen Tierallergene, Hausstaubmilben und Schimmelsporen. Ein Teil der Patienten entwickelt eine bronchiale Hyperreaktivität, Asthma oder eine atopische Dermatitis. Daher wird die allergische Rhinitis von der *World Health Organization* (WHO) als eine chronische Atemwegserkrankung definiert. Es besteht bei allen Erkrankten eine erhebliche Beeinträchtigung der Lebensqualität. Sozio-ökonomische Folgen der allergischen Rhinitis ergeben sich nicht nur durch die direkten Arzt- und Arzneimittelkosten, sondern auch aufgrund von indirekten Kosten durch Arbeits- und Schulausfälle und durch Folgeerkrankungen.

Die Diagnostik der allergischen Rhinitis umfasst eine genaue Allergieanamnese, eine hals-nasen-ohrenärztliche Untersuchung einschließlich Endoskopie der Nase und des Rachens, Pricktests und nasale Allergenprovokation und ggf. die Messung des spezifischen IgEs zum Nachweis allergischer Sensibilisierungen.

1.3 Ätiologie und Pathogenese der allergischen Rhinitis

Beim Allergiker besteht eine genetische Disposition (Atopie), auf den Kontakt mit adäquaten Dosen eines Allergens in Form einer pathologischen Immunantwort zu reagieren. Die Allergene werden nach Kontakt mit der Haut oder Schleimhaut oder über die lymphatischen Organe des Waldeyer'schen Rachenrings von verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen, z.B. Makrophagen oder dendritische Zellen, aufgenommen. Hier werden die Allergene in kleinere Peptide gespalten und an MHC-Moleküle gebunden. Diese Zellen präsentieren das Antigen den körpereigenen T-Lymphozyten. Die so aktivierten T-Lymphozyten wiederum binden an B-Lymphozyten, welche sich in Plasmazellen umwandeln. Diese Plasmazellen synthetisieren spezifisches Immunglobulin E, welches an die hochaffinen FcεRI IgE-Rezeptoren der Mastzellen und basophilen Granulozyten bindet.

Bei erneutem Allergenkontakt kommt es zu einer Bindung des Allergens an die spezifischen IgE Moleküle und einem *Cross-Linking*, das die Degranulation und Aktivierung der Mastzellen bewirkt.

Bei der Mastzelldegranulation kommt es zu einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin und Tryptase sowie verschiedener Zytokine. Es erfolgt eine Induktion von Prostaglandinen und Leukotrienen. Bereits 30 Sekunden nach Allergenkontakt lassen sich diese in erhöhten Konzentrationen im Nasensekret nachweisen (Naclerio RM, et al. 1983; Wagenmann M, et al. 1994; Wagenmann M, et al. 1996).

Die Zytokine wirken als Stimulatoren der Endothelzellen, die als Antwort Chemokine freisetzen. Hierdurch wird die Expression von Adhäsionsrezeptoren induziert. Durch die Expression von Adhäsionsrezeptoren auf den Endothelzellen wird die Migration von eosinophilen und basophilen Granulozyten in die Schleimhaut wenige Stunden nach Allergenexposition eingeleitet. Durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1β und TNF-α werden auch die Th2-Lymphozyten aktiviert.

Bei der Differenzierung der T-Helferzellen hat das Konzept der Dichotomie (Mosmann TR, Coffmann RL. 1989) weite Anerkennung gefunden. Unter dem Einfluss von IL-4, welches von Th2-Zellen, Mastzellen oder Basophilen produziert wird, können Th0-Zellen zu Th2-Zellen differenzieren. Hingegen bewirkt IL-12 eine Differenzierung der Th0-Zellen zu Th1-Lymphozyten. Es ergeben sich zwei unterschiedliche Zytokinmuster: Während die Th1-Zellen bei der zellulär vermittelten Immunreaktion (Typ IV) vor allem Interleukin-2 und Interferon-Gamma produzieren, setzen die Th2-Lymphozyten bei der allergischen Sofortreaktion in erster Linie IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 frei.

Zytokine sind multifunktionelle Proteine. Grundsätzlich sind alle Zellarten zur Produktion von Zytokinen fähig. Relevante Quellen in der allergischen Nasenschleimhaut sind außer den T-Lymphozyten unter anderem Mastzellen, basophile und eosinophile Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen.

Unter der Kontrolle der Th2-Zellen kommt es etwa zwei bis sechs Stunden nach der Allergenprovokation, der vorgenannten **Spätphase**, zu einer Einwanderung von Eosinophilen, Basophilen und T-Lymphozyten in die Nasenschleimhaut. T-Lymphozyten synthetisieren weitere Zytokine wie IL-4 und IL-5; hierdurch werden auf basophilen und eosinophilen Granulozyten selektive Adhäsionsmechanismen induziert und eine selektive Migration der atopieassoziierten Zellen zusammen mit Chemokinen gesteuert. Noch Wochen nach dem Ende des Pollenflugs ist eine eosinophile Entzündungsreaktion in der Nasenschleimhaut nachweisbar (Durham SR, et al. 1992). Die Schleimhaut eines Patienten mit perennialer allergischer Rhinitis weist ein so genanntes Th2-Muster von Zytokinen auf, mit Exprimierung von IL-3, IL-4, IL-5 und GM-CSF.

Bei der allergischen Rhinitis kommt es ebenso zu einer Reaktion der Nasennebenhöhlenschleimhaut, die nicht auf direktem Weg, d.h. durch unmittelbaren Kontakt mit dem Allergen zustande kommt. Eine ausschließlich nasale Provokation verursacht eine gesteigerte Mediatorproduktion sowie einen Einstrom von Eosinophilen in der Schleimhaut der Kieferhöhle (Baroody FM, et al. 2000). **Nasonasale Reflexe** führen parasympathisch vermittelt zu einem Anstieg der Sekretion auch auf der kontralateralen Seite (Wagenmann M, et al. 1994). Eine Neurektomie des *Nervus vidianus*, die zu einer Unterbrechung der parasympathischen Innervation der Nase führt, reduziert aber auch den Histamingehalt der Schleimhaut nach Allergenprovokation. Auch Neuropeptide sind an der Synthese von proinflammatorischen Zytokinen in der Nasenschleimhaut und dem kontralateralen Anstieg von Mediatoren mit Zytokinen und Zellen beteiligt (Arzubiaga C, et al. 1991).

1.4 Therapie der allergischen Rhinitis

Bei der Therapie der allergischen Rhinitis sind im Wesentlichen drei Säulen zu nennen: Allergenkarenz, Pharmakotherapie und spezifische Immuntherapie mit Allergenen (SIT).

Die nebenwirkungsärmste Therapie stellt die Allergenkarenz dar. Sie ist allerdings auch für die meisten Allergene nur begrenzt zu realisieren. Außerdem bedeutet es eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität des Patienten, im Sommer nicht das Haus zu verlassen oder bei geschlossenen Fenstern zu leben und ist beispielsweise bei einer Milbenallergie unmöglich. Eine Allergenkarenz scheint daher in vielen Fällen wenig praktikabel.

Die medikamentöse Therapie und somit die Auswahl des geeigneten Antiallergikums richtet sich nach dem Schweregrad und der Dauer der Symptome und der Art der vorherrschenden Symptome.

Cromone wirken mastzellstabilisierend, werden aufgrund ihrer schwachen Wirksamkeit bei der allergischen Rhinitis jedoch nur selten angewandt.

Systemische Antihistaminika der zweiten Generation wirken nicht mehr sedierend und sind Mittel der Wahl bei saisonalen oder intermittierend auftretenden perennialen Beschwerden ohne starke Obstruktion. Die topischen Antihistaminika wirken am Auge und an der Nase; oft werden sie in Kombination mit einem systemischen Antihistaminikum oder einem nasalen Glucocorticoidsteroid verordnet.

Topische Steroide stellen die potentesten Antiallergika bei allergischer Rhinitis dar. Vorteil: Topische Steroide reduzieren Symptome der allergischen Rhinitis einschließlich der Obstruktion. Moderne topische Steroide haben eine minimale systemische Absorption und einen hohen First-Pass-Effekt. Nachteile: Erst nach einigen Tagen stellt sich die Wirksamkeit ein. Bei Langzeitanwendung kann es zu einem Austrocknen der Nasenschleimhaut und gegebenenfalls zu Nasenbluten kommen.

Der orale Einsatz systemischer Glucocorticoidsteroiden ist nur in Einzelfällen vertretbar. Möglichst schnell sollte auf eine topische Gabe übergegangen werden. Des Weiteren können Alphasymphathomimetika und Anticholinergika gegeben werden. Alphasymphathomimetika werden überwiegend initial zur Abschwellung angewendet. Sie sollten nicht länger als zehn Tage gegeben werden (*Pravinismus*). Als Anticholinergikum kann Ipratropiumbromid gegeben werden. Es wirkt allerdings ausschließlich auf die Sekretion.

Die spezifische Immuntherapie (SIT) ist ein kausaler Therapieansatz. Dabei erfolgen subkutane Injektionen oder die sublinguale Applikation des relevanten Allergens in ansteigenden Dosierungen. Eine Verabreichung der ansteigenden Allergenmengen hemmt die allergiesteuernden Th2-Lymphozyten durch eine Induktion der regulatorischen T-Zellen (Durham SR, et al. 1996).

Voraussetzung für eine SIT ist eine nachgewiesene IgE-vermittelte allergische Reaktion als Verursacher der Beschwerden. Dadurch kann eine Ausbreitung des Allergenspektrums oder eine Erweiterung der Organmanifestationen verhindert werden.

1.5 Ziele der Studie und Fragestellungen

Ziel der Studie ist es, den zeitlichen Verlauf der Freisetzung des Entzündungsmediators Histamin und der Zytokine IL-1 β , IL-1Ra, IL-4 und IL-8 in der Sofort- und Spätphase nach unilateraler Allergenprovokation seitengetrennt zu messen. Durch die simultane Messung physiologischer Parameter wie Sekretionsgewichte und Atemwegswiderstand sowie der Erfassung von nasalen Symptomen nach Allergenprovokation können Symptome und Freisetzung der verschiedenen Zytokine dabei in Zusammenhang gestellt werden.

Das Zytokin IL-1 β besitzt entzündungsfördernde Effekte; es führt unter anderem zu einer Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten. Es ist außerdem an der Synthese weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α und GM-CSF beteiligt. IL-1 β spielt daher eine wichtige Rolle bei der Induktion entzündlicher Veränderungen an der Nasenschleimhaut bei allergischer Rhinitis. Es ist jedoch auch bei viraler Rhinitis und chronischer Sinusitis im Nasensekret nachgewiesen worden und nicht spezifisch für allergische Entzündungsreaktionen.

Der natürliche Antagonist von IL-1 β ist IL-1Ra, indem er an die gleichen Rezeptoren wie IL-1 β bindet, jedoch nicht zu einer Aktivierung dieses Rezeptortyps führt. Ziel der Studie ist es daher, zu erfahren, ob eine Freisetzung von IL-1Ra in zeitlichem Zusammenhang zum Zytokin IL-1 β erfolgt und somit die Nasenschleimhaut über Mechanismen verfügt, die die Reaktion der allergischen Rhinitis begrenzen.

Das Chemokin IL-8 ist der potenteste chemotaktische Faktor für neutrophile Granulozyten und aktiviert diese.

IL-4 ist ein bekanntes Th2-Zytokin, welches Th1-Zellen antagonisiert. Es wirkt mit an der Entzündungsreaktion der Spätphase, indem es VCAM-1 auf Endothelzellen trainiert und so den Einstrom von Eosinophilen, Basophilen und T-Zellen in der Nasenschleimhaut fördert. Bisher liegen keine Studien vor, die den zeitlichen Verlauf des Zytokins in Früh- und Spätphase in der Nasenschleimhaut messen. Für die Behandlung des allergischen *Asthma bronchiale* konnte die Wirksamkeit eines löslichen inhalierbaren IL-4-Rezeptors nachgewiesen werden (Borish LC, et al. 2001).

2. Probanden und Methodik

2.1 Probandenauswahl

Zwölf Probanden (acht weiblich und vier männlich, Alter 21 bis 29 Jahre) mit einer ausschließlich saisonalen allergischen Rhinitis nahmen an der Studie teil. Sie waren gegen Haselnuss, Birke oder Gräserpollen sensibilisiert. Als saisonale Allergiker wurden sie ausgewiesen aufgrund folgender Einschlusskriterien:

1. positive Anamnese
2. positiver Haut-Pricktest gegen mindestens eines der genannten Allergene
3. positive nasale Allergenprovokation.

Die Probanden waren zum Zeitpunkt der Studie asymptomatisch und hatten, außer teils Kontrazeptiva mindestens vier Wochen vor Beginn der Studie, keine Medikamente eingenommen. Probanden mit einer Sensibilisierung gegen perrenniale Allergene wie Hausstaubmilben wurden ausgeschlossen.

Weitere Ausschlusskriterien waren akute Atemwegsinfekte, chronische Rhinosinusitis, strukturelle Anomalien (z.B. ausgeprägte Septumdeviation) oder systemische Erkrankungen.

Die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität hatte die Studie zuvor genehmigt und jeder Teilnehmer schriftlich sein Einverständnis zur Teilnahme gegeben.

2.2 Versuchstermine

Die Probanden wurden an zwei Terminen im zeitlichen Abstand von 14 Kalendertagen einbestellt und nasal provoziert.

Die Pause von 14 Tagen zwischen den Terminen wurde eingelegt, um das physiologische Milieu der Nasenschleimhaut wiederherzustellen und Effekte des Allergens auf die Kontrollprovokation zu vermeiden.

2.3 Nasale Provokation mittels Disk-Methode

1. Mittels der **Disk-Methode** kann eine unilaterale Allergenprovokation der Nasenschleimhaut durchgeführt werden.
2. Die **Disk-Methode** ermöglicht die beidseitig getrennte Messung physiologischer Parameter (Sekretionsgewichte und Atemwegswiderstand), Mediator- und

Zytokinmengen im Nasensekret über Stunden im Verlauf. Hierdurch kann zwischen direkten und indirekten Effekten des Reizes unterschieden werden.

Die Disks wurden hergestellt, indem aus 1 mm dickem Filterpapier („*Shandon filter cards thick*“, Fa. Shandon, Frankfurt) kreisrunde Scheibchen mit einem Durchmesser von 10 mm gestanzt wurden.

Die folgende Grafik zeigt das Prinzip der nasalen Provokation und Kollektion von Nasensekret durch Disks, wie es in dieser Studie erfolgte:

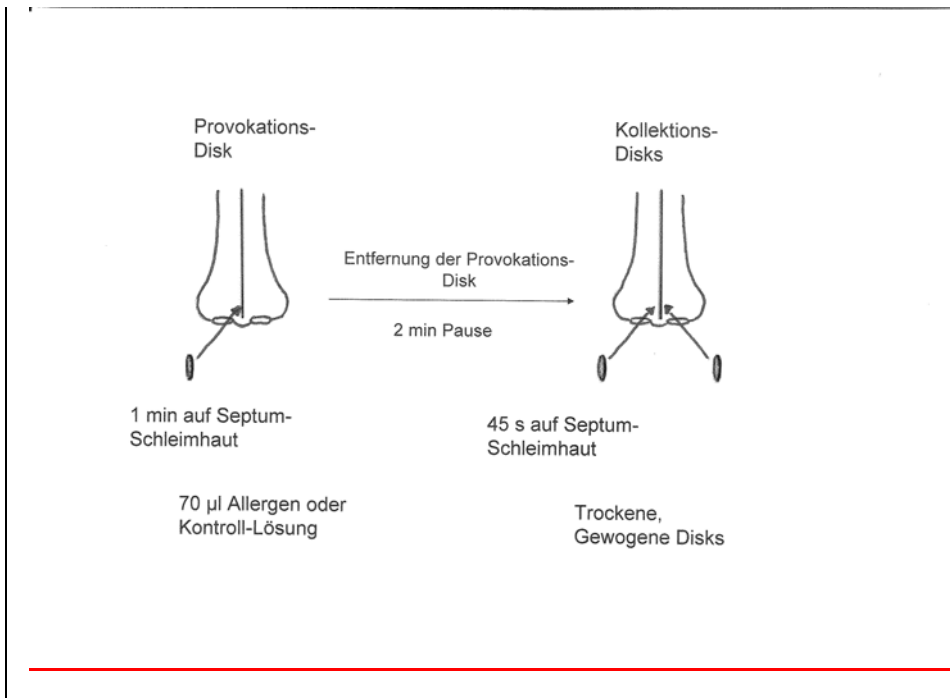


Abbildung 1: Darstellung der Disk-Applikation

Provokationsdisk: Auf die Provokationsdisk wurde 70 µl Lösungsmittel (NaCl mit 0,4 % Phenol) bzw. 70 µl Allergenlösung pipettiert. Allergenmenge: Die Allergenlösung wies eine Allergenkonzentration auf von 33.333 BU / ml. Eine Disk mit 70 µl Allergenlösung enthält damit 2500 BU. Dieses Flüssigkeitsvolumen liegt knapp unter der maximalen Aufnahmemenge der Filterpapierdisk. (Die maximale Aufnahmekapazität der Disk wurde in früheren Studien bestimmt.)

Die unilaterale Applikation der Disk erfolgte unter rhinoskopischer Kontrolle mit einer Hechtmaulzange auf den anterioren Anteil des Nasenseptums dorsal der mukokutanen Grenze.

Die Disk verblieb auf dem Septum für die Dauer von einer Minute und wurde danach verworfen. Die Provokation durch Disks mit Lösungsmittel und mit Allergen fand auf derselben Seite des Septums statt.

Kollektionsdisks: Das Nasensekret wurde beidseits seitengetreunt durch Disks gesammelt. Jede Kollektionsdisk wurde zuvor einzeln in einem Plastikröhrchen aufbewahrt und gewogen. Zur Kollektion von Nasensekret wurde die Disk für 45 Sekunden auf dasselbe Schleimhautareal gelegt, an der die Allergendisk lag (ipsilaterale Kollektion). Lag die Disk der Schleimhaut gut auf, wurde die Disk auf das korrespondierende Areal der Gegenseite platziert (kontralaterale Kollektion).

Die Disks wurden 45 Sekunden auf der Nasenschleimhaut belassen, um eine Übersättigung zu vermeiden. (Die Menge der maximalen Sekretaufnahme einer Disk dieser Größe war zuvor im Vorversuch zu dieser Studie ermittelt worden.)

Die Disks wurden vor und nach Verwendung mit Plastikröhrchen gewogen (Mettler Analyse Waage, Mettler Toledo AG, Schweiz). Durch Subtraktion des Ausgangsgewichts vom Gewicht nach Verwendung der Disk erhält man die Masse des gesammelten Nasensekrets.

Die Reproduzierbarkeit dieser Methode wurde zuvor von Baroody und Wagenmann in mehreren Studien belegt (Baroody FM, et al. 1993; Malmberg H, et al. 1989).

2.4 Weiterverarbeitung der Kollektionsdisks

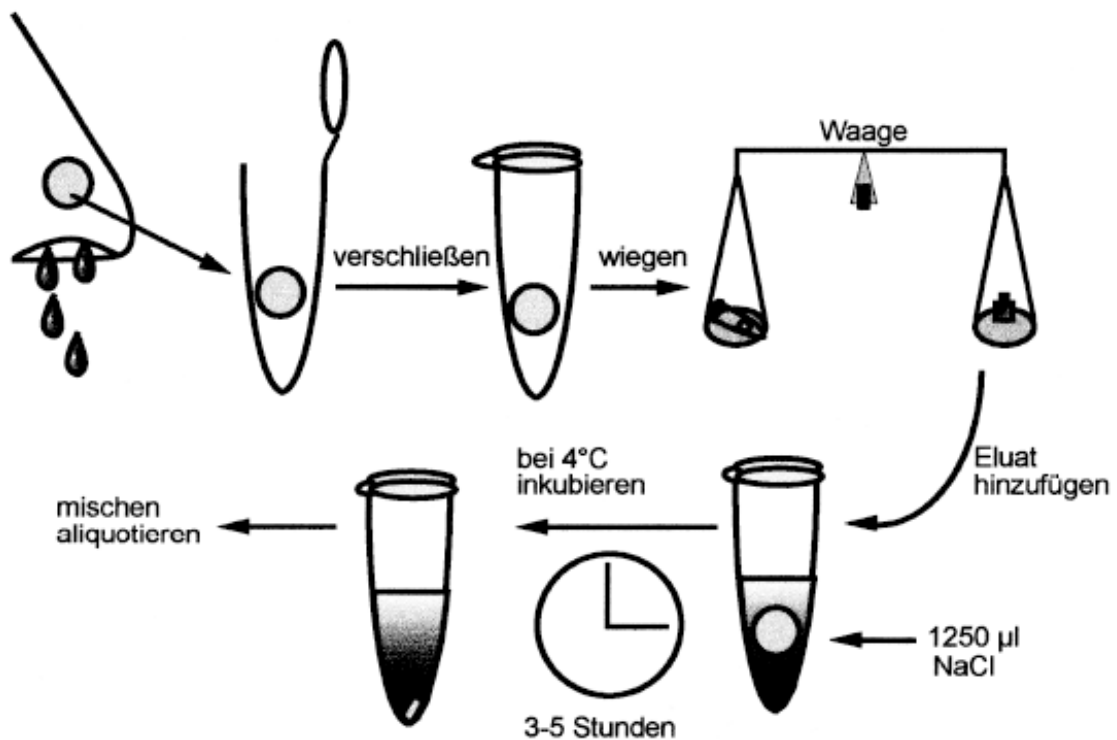


Abbildung 2: Weiterverarbeitung der Disks

Die Kollektionsdisks wurden nach Herausnahme aus der Nase in Reagenzgläser gesteckt; diese wurden verschlossen und gewogen. Die Menge der gewonnenen Sekrete konnte leicht bestimmt werden, da zuvor das Leergewicht des Röhrchens und der trockenen Disk ermittelt wurde. Unmittelbar danach wurde das Eluat (1250 µl 0,9 % NaCl-Lösung) der Disk zugesetzt. Die Reagenzgläser wurden zum Eluieren für drei Stunden im Kühlschrank (4°C) gelagert. Anschließend wurde diese Lösung auf einem Schüttelmixer gemischt, die Disks auf den Boden der Röhrchen gepresst und der Überstand zur Weiterverarbeitung in Portionen zu 250 µl bei -80°C Grad gelagert.

2.5 Symptomerfassung

Bei der Symptomerfassung mussten die Probanden zu jedem Messzeitpunkt die Ausprägung der Beschwerden Rhinorrhoe, Schwellung und Jucken der Nase auf einer Skala von 1 (minimal) bis 10 (maximal) als *Visual Analog Score* (VAS) angeben (siehe Anhang). Außerdem wurde die Häufigkeit des Niesens verzeichnet.

2.6 Rhinomanometrie

Als Standardmethode zur Ermittlung des nasalen Atemwegswiderstands gilt die anteriore Rhinomanometrie. Bei einer Schleimhautschwellung der Nase und einer damit verbundenen Zunahme des Widerstands in der Nase kommt es zu einer Abnahme des nasalen Flow-Volumens. Zur seitengetrenten Bestimmung des nasalen Flows verwendeten wir ein Atmos Rhinomanometer 300 (Atmos Medizin Technik GmbH & Co KG, Lenzkirch).

2.7 Vorversuche zur Zytokinmessung

Folgende Fragen stellten sich vor der Durchführung der Studie:

1. Sind Zytokine in der Nasenlavage reproduzierbar messbar und welcher Anteil von zugefügten Zytokinen ist messbar?
2. Lassen sich Zytokine mit Disks messen?

Eine unstimulierte Nasenlavage von 12 ml wurde in vier Teile zu 3 ml aufgeteilt, um jeweils eine Leermessung und Messungen nach Zusatz von zwei verschiedenen Zytokinen-Konzentrationen durchzuführen. Hierzu wurden rekombinante Zytokine in jeweils zwei Konzentrationen verwendet: IL-1 β , IL-1Ra, IL-4, IL-8, RANTES und TNF- α (R&D Systems, Wiesbaden).

Abgebildet in der Tabelle sind Mittelwerte in Prozent nach zwei unterschiedlich hohen Zugaben verschiedener Zytokine zu Lavagen von Nichtallergikern.

Die Messungen erfolgten mittels ELISA. Alle Messungen erfolgten in Duplikaten (vor dem ELISA).

2.7.1 Ergebnisse des Vorversuchs Zytokinwiederfindung in Lavagen

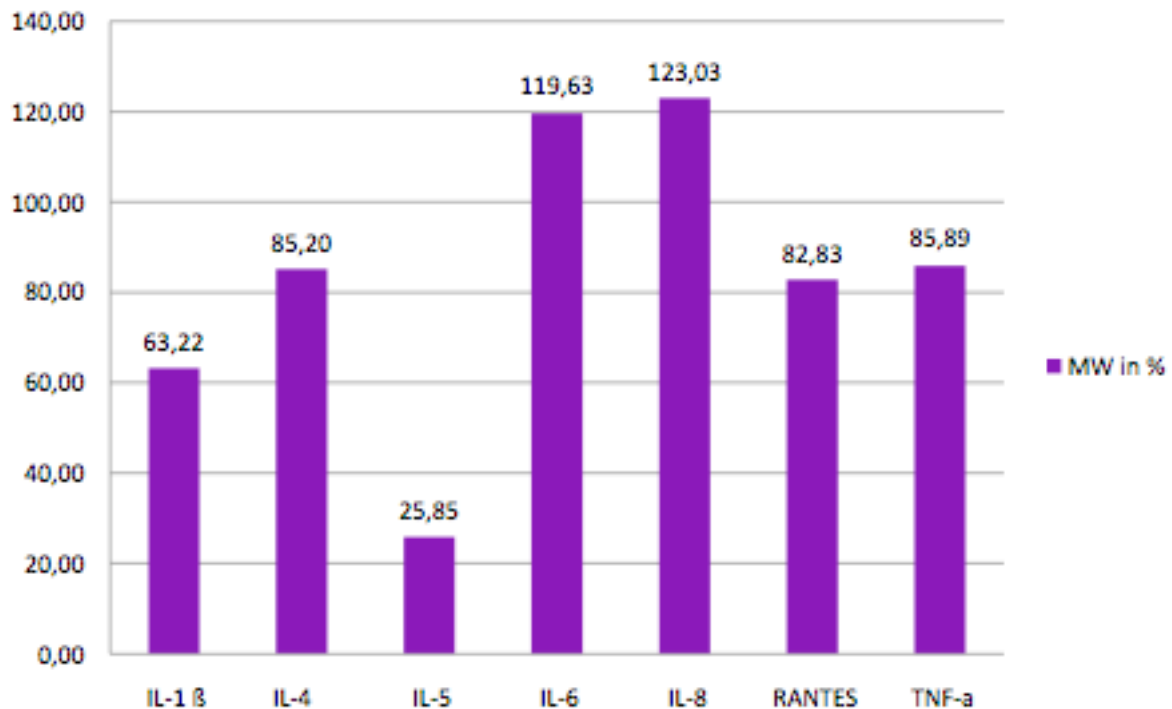


Abbildung 3: MW der Zytokinwiederfindung in Lavagen (in Prozent)

In den sechs Lavagen waren Zytokine reproduzierbar zu messen, dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent von der mittleren und der hohen Zugabe.

2.7.2 Ergebnisse Vorversuch zur Wiederfindung von Zytokinen in Disks

Von zwei Lavagen mit zwei unterschiedlich hohen Zytokinzugaben wurden je 50 µl entnommen und auf eine Disk geimpft, diese in ein Eppendorf-Röhrchen gelegt und anschließend 500 µl NaCl hinzugefügt, d.h. es fand eine zehnfache Verdünnung der Zytokine statt. Die Weiterverarbeitung erfolgte wie in Abbildung 2 beschrieben. Anschließend erfolgte die Messung mittels ELISA.

In diesen Versuchen zeigten sich Wiederfindungsraten von 13,2 bis 86,1 %. In Wiederholungsmessungen zeigte sich, dass die Wiederfindungsraten eine gute Reproduzierbarkeit aufwiesen (< 5 % für die individuellen Zytokine).

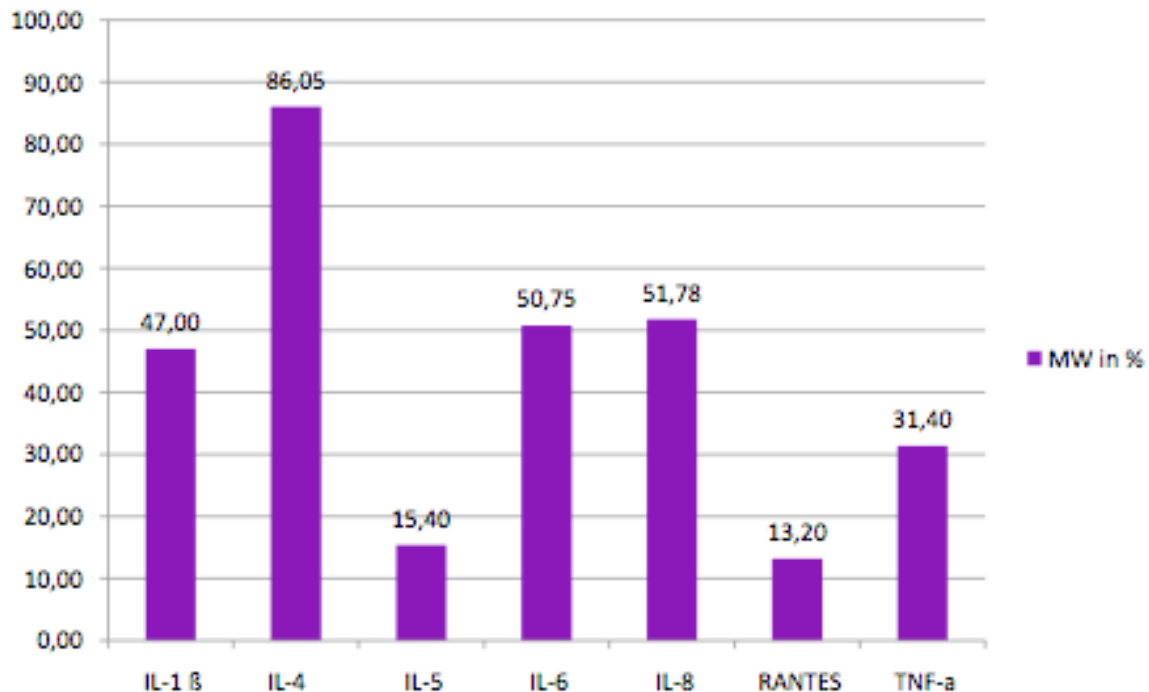


Abbildung 4: Wiederfindung von Zytokinen verschiedener Konzentrationen in Disks als Mittelwerte (in Prozent)

2.8 Protokoll der nasalen Provokation

Es wird unterschieden zwischen Provokations- und Kollektionsdisk (s.o.).

Provokationsdisk

Auf die Disk wurden 70 µl sterile, Phenol-gepufferte Kochsalzlösung bzw. Allergenlösung (jeweils Fa. Allergopharma, Reinbek) pipettiert. Dieses Volumen liegt knapp unter der maximalen Aufnahmemenge einer Disk. Mittels einer Hechtmaulzange wurde die Disk unilateral auf das anteriore Nasenseptum dorsal der mukokutanen Grenze aufgebracht.

Basiswert 1

Zur Feststellung der unprovoozierten Sekretion der Nasenschleimhaut fand die erste Kollektion von Nasensekret mittels Disks auf beiden Seiten statt.

Fünf nasale Lavagen

Durch die Lavagen sollte ein Auswaschen noch vorhandener Zytokine und Mediatoren aus der Nasenschleimhaut erreicht werden. Während der Proband den Kopf etwa 30 Grad dorsal beugte, wurden 10 ml einer 0,5 % NaCl-Lösung zu gleichen Teilen in beide Nasenhöhlen gefüllt. Nach zehn Sekunden wurde der Kopf wieder nach vorne gebeugt und das Gemisch aus Spülflüssigkeit und Nasensekret wurde aufgefangen. Dieser Vorgang fand insgesamt fünfmal statt.

Nach Beendigung der letzten Lavage wurde fünf Minuten gewartet.

Basiswert 2

Wiederum fand eine Kollektion von Nasensekret statt. Innerhalb von fünf Minuten nach Herausnahme der Kollektionsdisks wurde der Symptomscore erfasst und der nasale Atemwegswiderstand mittels anteriorer Rhinomanometrie gemessen.

Kontrollprovokation

Es fand eine einseitige nasale Kontrollprovokation mit 70 µl der sterilen, Phenol-gepufferten Kochsalzlösung (Allergopharma, Joachim Ganzer, Reinbek) statt. Die provozierte Seite wird als ipsilateral bezeichnet, die Gegenseite als kontralateral.

Zwei Minuten wurde nach Herausnahme der Disk gewartet.

Kollektion von Nasensekret

Dann wurde die Sekretion der Nase mit zwei Kollektionsdisks bestimmt. Nach Herausnahme der Disks wurden innerhalb von fünf Minuten die Symptomerfassung und die Messung des nasalen Atemwegswiderstands durchgeführt.

Allergenprovokation

Jetzt erfolgte die einseitige nasale Allergenprovokation. Zum Einsatz kamen Birke-, Hasel- oder Gräserallergene (lyophilisierte Testallergene, Allergopharma, Reinbek) in einer Konzentration von 33.333 BU / ml. Eine Disk mit 70 µl Allergenlösung enthält damit 2500 BU. Dies geschah auf derselben Seite und demselben Areal der Nasenscheidewand, auf dem vorher das Lösungsmittel allein verabreicht wurde.

Kollektion von Nasensekret

Nach Herausnahme der Disk wurde zwei Minuten gewartet, dann wurden zwei Kollektionsdisks für je 45 Sekunden in die Nase gelegt und anschließend gewogen. Danach wurden Symptomerfassung und Rhinomanometrie durchgeführt.

Stündliche Kollektion von Nasensekret

Beginnend 60 Minuten nach Allergenprovokation wurden stündlich Folgemessungen (Kollektion von Nasensekret und Symptomerfassung und Durchführung der anterioren Rhinomanometrie) bis einschließlich der 8. Stunde durchgeführt.

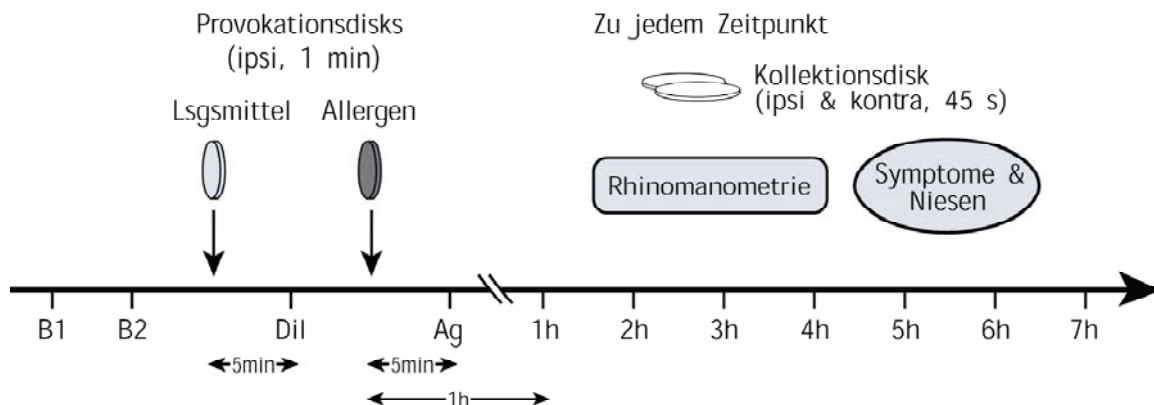


Abbildung 5: Protokoll zur Messung der Zytokin- und Histaminproduktion in der Spätphase nach unilateraler Allergenprovokation (Die Messpunkte befinden sich unterhalb der Zeitachse.)

Senkrechte Pfeile: Zeitpunkt der Kontrollprovokation mit Lösungsmittel allein (hellgraue Disk) bzw. der Allergenprovokation (dunkelgraue Disk)

2.9 Mediator- und Zytokinmessung mittels ELISA

Die Mediator- und Zytokinmessung erfolgte durch ELISA-Technik (*Enzyme-Linked-Immuno-Assay*). Nach dem Auftauen auf 20°C wurden die Aliquots in den entsprechenden Essay pipettiert. Die Standardkurven wurden entsprechend der Richtlinien der Hersteller angefertigt:

- für IL-1 β , IL-1Ra, IL-4 und IL-8 Essays des Herstellers R&D Systems, Wiesbaden
- für Histamin von Immunotech, Hamburg.

Folgende Nachweisgrenzen gelten für die einzelnen Zytokine und Histamin:

IL-1β:	0,083 pg/ml
IL-1Ra:	31,2 pg/ml
IL-8:	31,2 pg/ml
IL-4:	1,5 pg/ml
Histamin:	22,2 ng/ml

2.10 Konzentrationsbestimmung pro Disk

Die Zytokine wurden als Masse an Zytokinen pro Disk in pg angegeben und für Histamin in nM. Die Konzentrationseinheit für Histamin wurde zuvor über dessen spezifisches Gewicht von 111 g/mol in ng umgerechnet.

Die Berechnung erfolgte nach der Formel „ $m = c \cdot v$ “, wobei „m“ für die Masse des pro Disk gemessenen Zytokins steht, „c“ für die mit Assays gefundene Konzentration, „v“ ergibt sich durch Addition des der Disk zugesetzten Verdünnungsvolumens (Eluat) und dem in der Disk enthaltenden Volumen an Nasensekret.

$$\text{Masse des Mediators bzw. Zytokins} = c \cdot (v \text{ Nasensekret} + v \text{ Eluat})$$

2.11 Statistik

Durch den Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben wurden die Verlaufswerte sämtlicher gemessener Parameter mit demjenigen Wert des entsprechenden Parameters verglichen, der nach Kontrollprovokation mit dem Lösungsmittel allein gemessen wurde, und auf einen signifikanten Unterschied geprüft. Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug zweiseitig $p=0,05$. Die statistischen Tests wurden mit Hilfe von Apple Computern (Apple Computers, Cupertino, Kalifornien, USA) und dem Programm Statview 4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, Kalifornien, USA) erstellt.

Alle präsentierten Ergebnisse sind als Mittelwerte (MW) $\pm$ der Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

3. Ergebnisse

Die Kontrollprovokation ergab keine Veränderung der gemessenen Parameter.

3.1 Symptome

Unilaterale Allergenprovokation führte sofort zu einem signifikanten Anstieg des *Symptom Score* (Diluent $2,49 \pm 1,15$; Allergen (5 Minuten): $19,0 \pm 2,7$). In den folgenden Stunden sanken die Werte langsam wieder, blieben aber bis zur 6. Stunde statistisch signifikant erhöht ($5,9 \pm 1,6$).

Ebenso stieg die Häufigkeit des Niesens in den Minuten nach Allergenprovokation signifikant an. (Allergen: $6,9 \pm 1,5$; Kontrolle: 0 ± 0 , $p=0,0051$). Danach trat kein Niesreiz mehr auf.

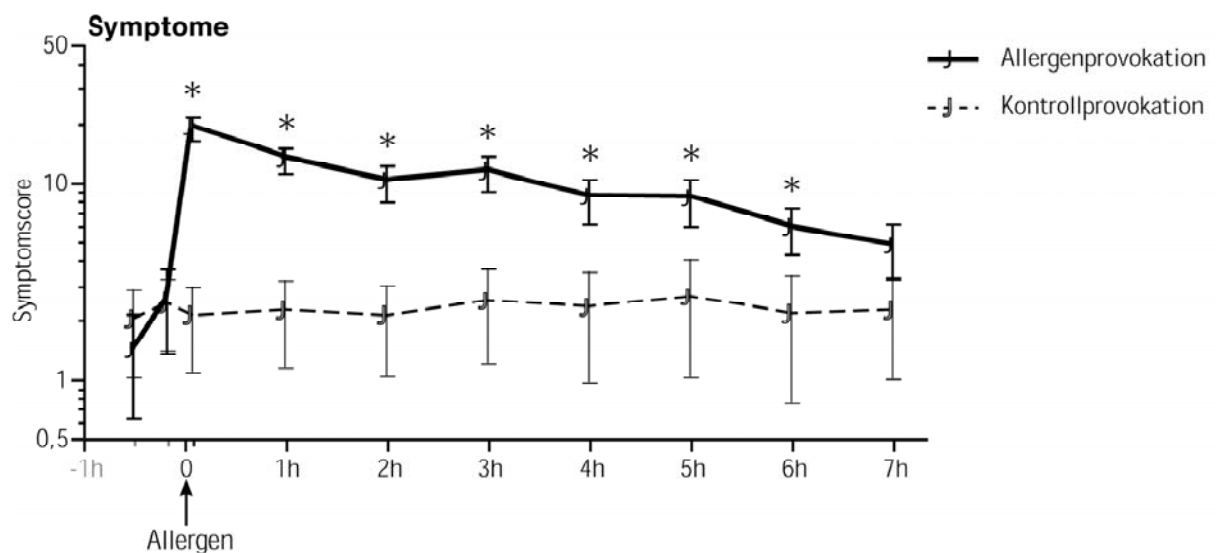


Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf des *Symptom Scores* nach einseitiger nasaler Provokation

Pfeil: Zeitpunkt der Allergenprovokation

Schwarze Kurve: Symptome nach Provokation

Gestrichelte Kurve: Verlauf der Symptome nach der Kontrollprovokation (Mittelwert $\pm$ SEM, $n=12$, $*= p < 0,05$)

3.2 Sekretionsgewichte

Nach unilateraler Allergenprovokation stiegen die Sekretionsgewichte auf beiden Seiten zum Zeitpunkt der ersten Messung signifikant an (ipsilateral: $71,7 \pm 5,7$ mg; kontralateral: $54,1 \pm 6,8$ mg).

In der 1. Stunde nach Allergenprovokation fielen die Sekretionswerte zwar auf beiden Seiten deutlich ab, blieben jedoch beidseits signifikant erhöht. Ipsilateral setzte sich diese signifikante Erhöhung bis einschließlich zur 8. Stunde fort, kontralateral mit Ausnahme der 6. und 7. Stunde ebenso. Die Sekretionsgewichte auf der kontralateralen Seite blieben gegenüber der Gegenseite erniedrigt.

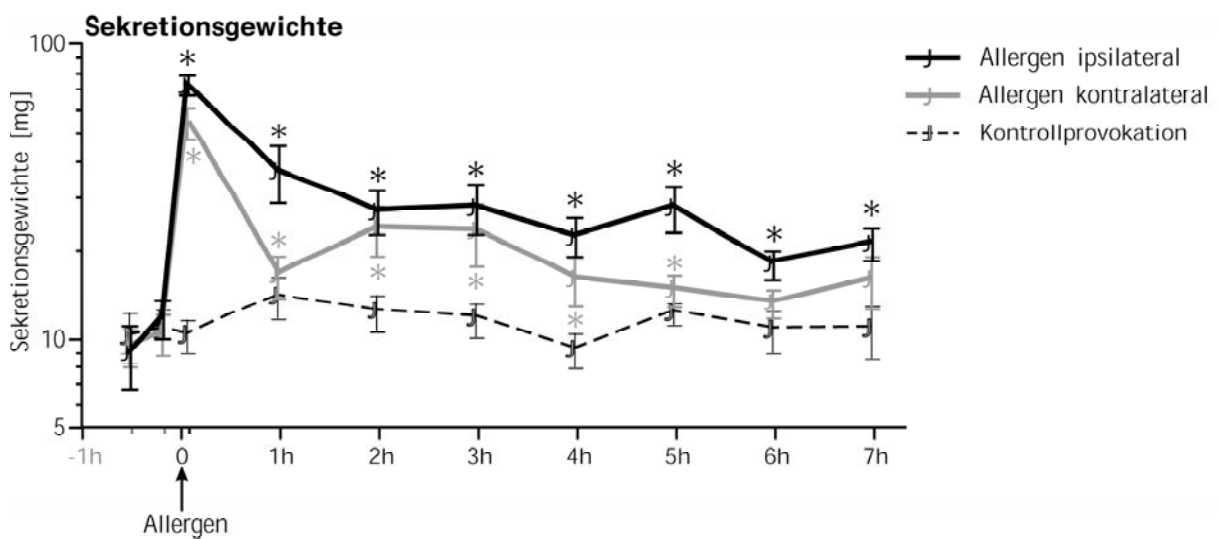


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der beidseitigen nasalen Sekretion nach einseitiger nasaler Provokation

Pfeil: Zeitpunkt der Allergenprovokation

Schwarze Kurve: Verlauf der provozierten Seite

Graue Kurve: Verlauf der Gegenseite

Gestrichelte Kurve: Verlauf nach der Kontrollprovokation

(Mittelwert $\pm$ SEM, n=12, *= $p < 0,05$ versus Kontrollprovokation)

3.3 Nasaler Atemwegswiderstand

Der mittels anteriorer Rhinomanometrie gemessene nasale Atemwegswiderstand verschlechterte sich direkt nach Allergenprovokation signifikant auf der provozierten Seite. Dabei kam es zu einer Abnahme des nasalen Durchflussvolumens von $272,7 \pm 24,5 \text{ cm}^3/\text{s}$ (Diluent) zu $135,3 \pm 23,2 \text{ cm}^3/\text{s}$ fünf Minuten nach der Allergenprovokation. Auch in den folgenden zwei Stunden blieben die Durchflussvolumina ipsilateral signifikant erniedrigt (1. Stunde $196,4 \pm 31,8 \text{ cm}^3/\text{s}$, 2. Stunde $152,7 \pm 24,4 \text{ cm}^3/\text{s}$).

Der Atemwegswiderstand nahm in der 6. Stunde erneut signifikant zu ($201,1 \pm 33,8 \text{ cm}^3/\text{s}$). Kontralateral waren die Änderungen der Durchflussvolumina weniger ausgeprägt, wenngleich noch statistisch signifikant erniedrigt ($181,5 \pm 37,4 \text{ cm}^3/\text{s}$).

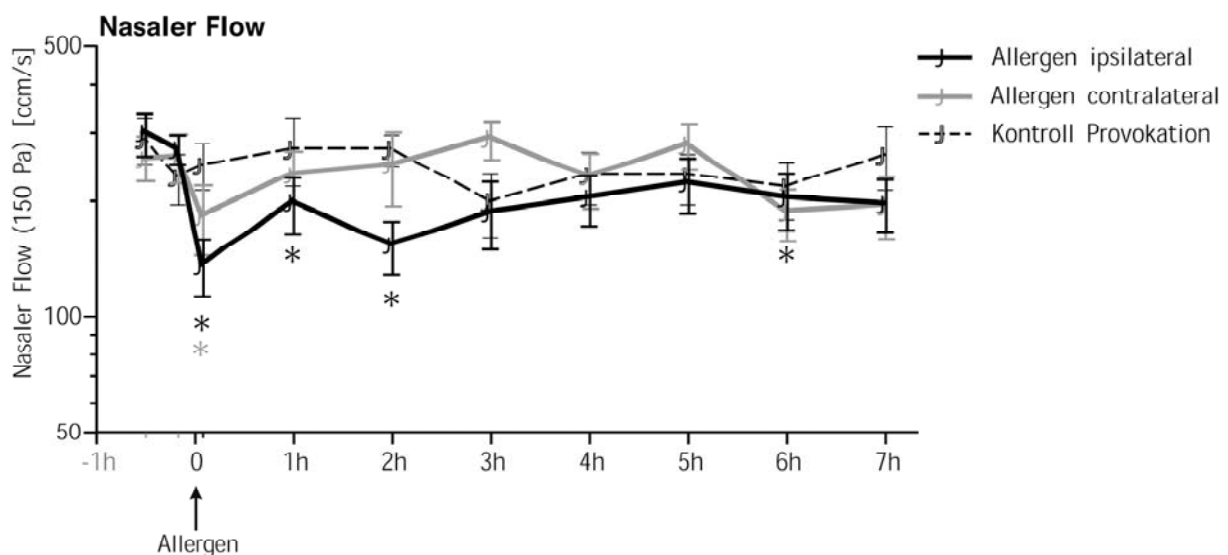


Abbildung 8: Seitengetrennter zeitlicher Verlauf des nasalen Atemwegswiderstands (mit der anterioren Rhinomanometrie gemessen) nach unilateraler Allergenprovokation

Schwarze Kurve: Verlauf der provozierten Seite

Graue Kurve: Verlauf der Gegenseite

Gestrichelte Kurve: Verlauf nach der Kontrollprovokation

(Mittelwert $\pm$ SEM, n=12, *=p<0,05 versus Kontrollprovokation)

3.4 Histamin

Nach unilateraler Allergenprovokation stieg Histamin beidseits signifikant an (ipsilateral: $13,4 \pm 4,3$ ng, kontralateral: $2,2 \pm 0,8$ ng). Schon in der folgenden Stunde kam es beidseits zu einer Reduzierung der gemessenen Histaminkonzentrationen auf die Ausgangswerte vor Provokation. Ab der 5. Stunde nach Provokation trat beidseits ein zweiter signifikanter Histaminanstieg auf, mit einem Maximum in der 5. Stunde ipsilateral ($6,4 \pm 2,7$ ng) und einem kontralateralen Maximum in der 6. Stunde ($3,2 \pm 1,1$ ng). Dabei wurde in der 5., 6. und 7. Stunde kontralateral mehr Histamin freigesetzt als in den Minuten nach Allergenprovokation.

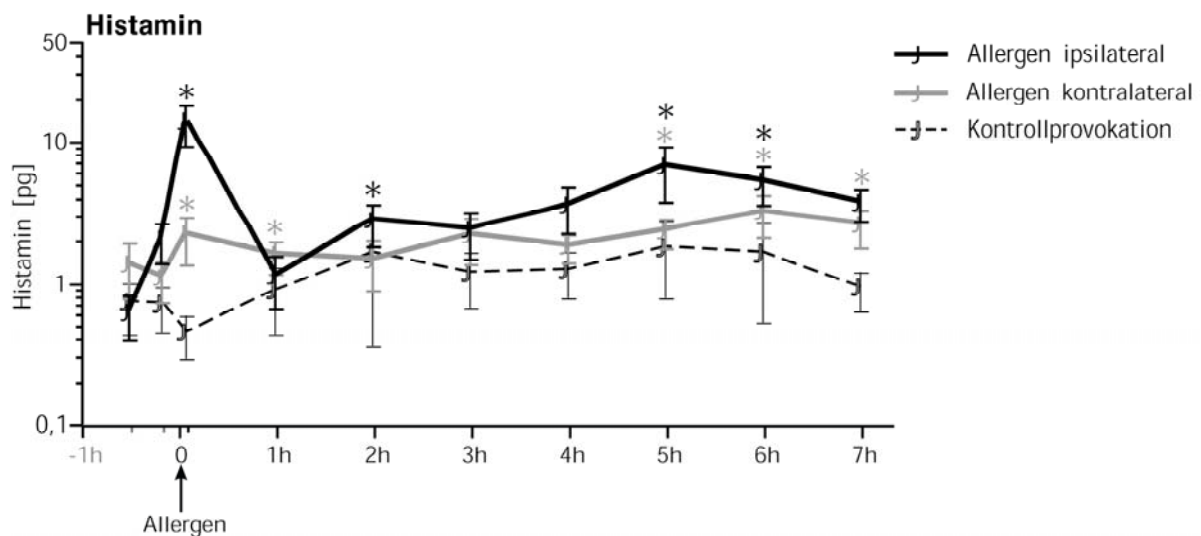


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der beidseitigen Histaminfreisetzung nach einseitiger nasaler Provokation

Pfeil: Zeitpunkt der Allergenprovokation

Schwarze Kurve: Verlauf der provozierten Seite

Graue Kurve: Verlauf der Gegenseite

Gestrichelte Kurve: Verlauf nach der Kontrollprovokation

3.5 Interleukin-1 β

IL-1 β zeigte unmittelbar nach Allergenprovokation keine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollprovokation allein. Erst in den folgenden Stunden kam es beidseits zu einem kontinuierlichen Anstieg von IL-1 β mit signifikant erhöhten Werten in der Spätphase der Reaktion. Ipsilateral war IL-1 β von der 2. Stunde an bis zum Ende der Messungen in der 7. Stunde signifikant erhöht, mit einem Maximum in der 5. Stunde mit $6,7 \pm 1,7$ pg. Kontralateral zeigte IL-1 β , verglichen mit der Provokation durch Lösungsmittel, einen ähnlichen Verlauf, jedoch ausschließlich in der 6. Stunde nach Allergenprovokation einen signifikant erhöhten Wert ($3,6 \pm 1,2$ pg).

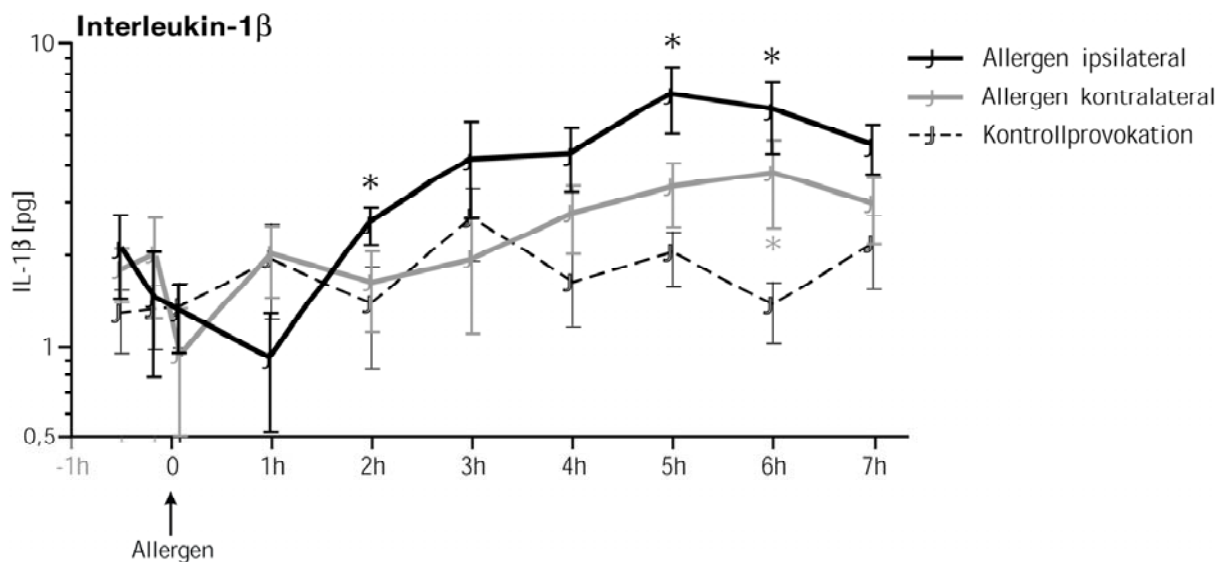


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der beidseitigen Freisetzung von IL-1 β nach einseitiger nasaler Provokation

Pfeil: Zeitpunkt der Allergenprovokation

Schwarze Kurve: Verlauf der provozierten Seite

Graue Kurve: Verlauf der Gegenseite

Gestrichelte Kurve: Verlauf nach der Kontrollprovokation

3.6 Interleukin-1Ra

IL-1Ra wurde in sehr hohen Konzentrationen in der nasalen Sekretion gemessen und stieg ipsilateral mäßig nach fünf Minuten und in der 2. bzw. 3. Stunde nach Allergenprovokation signifikant an.

(Diluent: 5408 ± 1139 pg, fünf Minuten nach Allergenprovokation: 7219 ± 1240 pg)

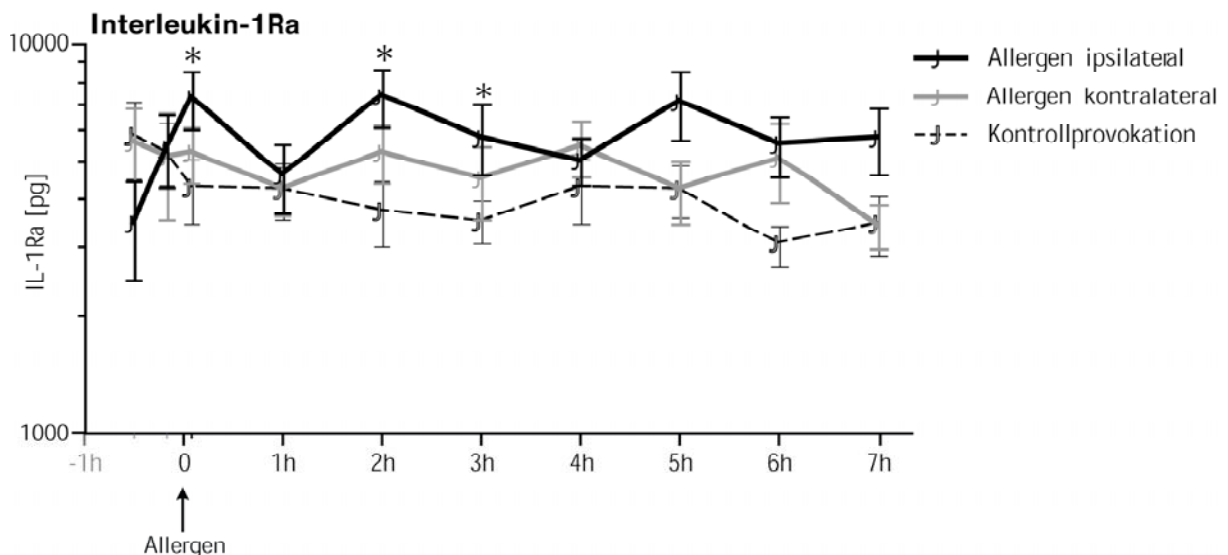


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der beidseitigen Freisetzung von IL-1Ra nach einseitiger nasaler Provokation

Pfeil: Zeitpunkt der Allergenprovokation

Schwarze Kurve: Verlauf der provozierten Seite

Graue Kurve: Verlauf der Gegenseite

Gestrichelte Kurve: Verlauf nach der Kontrollprovokation

3.7 Interleukin-8

Das Chemokin IL-8 wurde nach unilateraler Allergenprovokation ipsi- und kontralateral signifikant vermehrt freigesetzt. Der Anstieg von IL-8 war zweigipflig: fünf Minuten nach Allergenprovokation (ipsilateral: $336,2 \pm 199,9$ pg; kontralateral: $153,0 \pm 32,6$ pg) und fünf Stunden später auf der ipsilateralen Seite ($429,6 \pm 136,7$ pg) bzw. drei Stunden später kontralateral ($250,9 \pm 93,9$ pg).

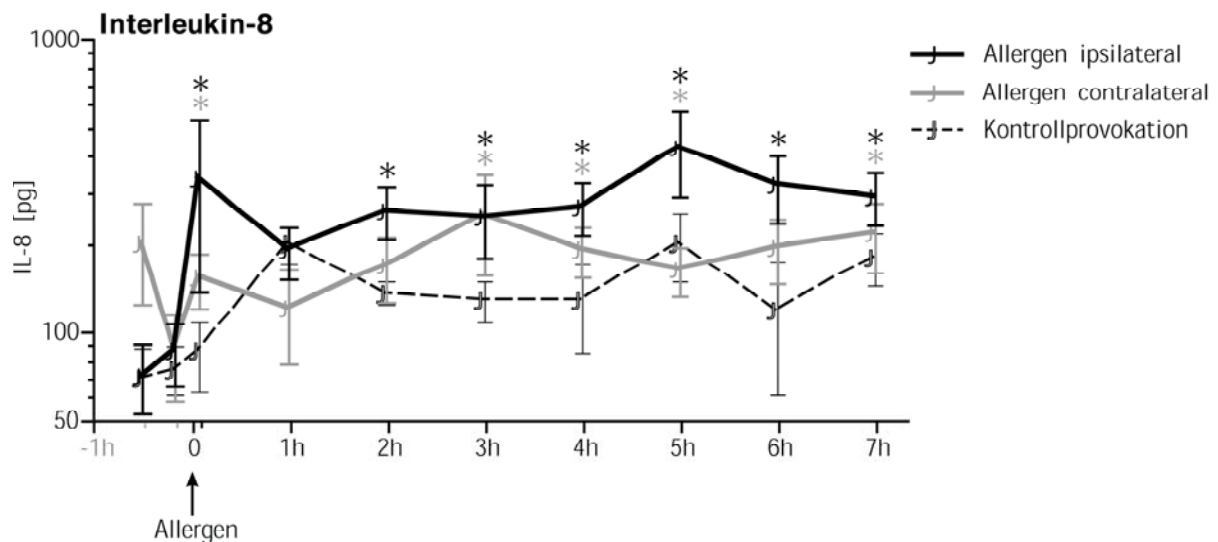


Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der beidseitigen Freisetzung von IL-8 nach einseitiger nasaler Provokation

Pfeil: Zeitpunkt der Allergenprovokation

Schwarze Kurve: Verlauf der provozierten Seite

Graue Kurve: Verlauf der Gegenseite

Gestrichelte Kurve: Verlauf nach der Kontrollprovokation

3.8 Interleukin-4

IL-4 wurde in relativ niedrigen Konzentrationen gemessen. Signifikant erhöhte Werte wurden fünf Stunden ($1,29 \pm 0,78$ pg) und sieben Stunden nach Provokation ipsilateral gemessen. Kontralateral war IL-4 gegenüber dem Diluent ($0,18 \pm 0,09$ pg) nach fünf Minuten ($0,32 \pm 0,11$ pg), sowie nach zwei und drei Stunden signifikant erhöht.

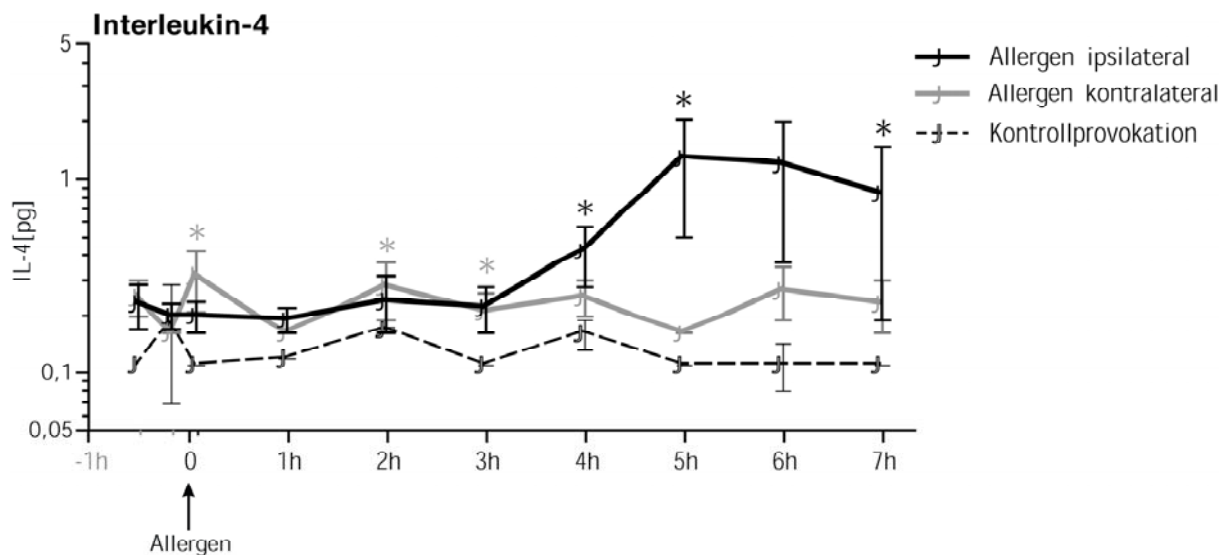


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der beidseitigen Freisetzung von IL-4 nach einseitiger nasaler Provokation

Pfeil: Zeitpunkt der Allergenprovokation

Schwarze Kurve: Verlauf der provozierten Seite

Graue Kurve: Verlauf der Gegenseite

Gestrichelte Kurve: Verlauf nach der Kontrollprovokation

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, nach einer streng einseitigen nasalen Provokation bei zwölf saisonalen Allergikern die Mediator- und Zytokinfreisetzung der Nasenschleimhaut in der Früh- und Spätphase zu messen und mit den subjektiven Symptomen, der nasalen Sekretion und dem nasalen Flow in Beziehung zu setzen.

Der Vorteil der in dieser Studie angewandten Disk-Methode liegt darin, dass sie gegenüber der Provokation mit Spray und der anschließenden Nasenlavage eine einseitig steuerbare Provokation der Nasenschleimhaut und seitengetrennte Messung der Entzündungsreaktionen in der Nasenschleimhaut erlaubt. Hierdurch können direkte und indirekte Effekte unterschieden werden.

Ein weiterer Vorteil der Disk-Methode ist, dass zu gleichen Messzeitpunkten Mediatoren, Zytokine und der nasale Atemwegswiderstand sowie die Symptome der Probanden gemessen werden können. Die Menge des gesammelten Nasensekrets kann exakt bestimmt werden, indem man die gemessenen Mediator- und Zytokinkonzentrationen mit dem Volumen, in dem sie sich befinden, in Bezug setzt.

Als Nachteil unserer Studie kann die relativ geringe Anzahl des Patientenkollektivs gesehen werden. Weiterhin kann es als nachteilig angesehen werden, dass die Symptome Rhinorrhoe und Juckreiz der Nase auf einer subjektiven Einschätzung der Probanden beruhen.

Die Probanden reagierten sofort nach Allergenprovokation mit einem signifikanten Anstieg der Symptome Rhinorrhoe, Juckreiz der Nase und Niesen, einem signifikanten ipsi- und kontralateralen Anstieg der nasalen Sekretion sowie mit einem signifikanten Abfallen des ipsilateralen nasalen Flows.

Obwohl die höchsten Werte in der Sofortphase messbar waren, blieben die Symptome bis in die Spätphase hinein sechs Stunden lang und die Sekretionsgewichte ipsilateral acht Stunden lang signifikant erhöht. Im gleichen Zeitraum blieb der nasale Flow ipsilateral zwei Stunden lang signifikant erniedrigt und erneut in der 6. Stunde nach Provokation.

Die unilaterale Provokation mit der Diskmethode führte sowohl in der Frühphase in den Minuten nach Allergenkontakt als auch Stunden später zu einer signifikanten Erhöhung der Sekretionsgewichte auch auf der kontralateralen Seite, die keinen Allergenkontakt hatte. In früheren Studien wiesen Wagenmann und Baroody einen parasymphatisch vermittelten naso-nasalen Reflex nach, der zu einem gegenseitigen Anstieg der nasalen Sekretion führt, was in dieser Studie nochmals bestätigt wurde (Baroody FM, et al. 1993; Wagenmann M, et al. 1994).

In unserer Studie konnten wir zusätzlich zeigen, dass eine unilaterale Allergenprovokation zu einer beidseitigen Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Zytokinen führt.

Nach der nasalen Provokation kommt es wie in früheren Studien (Baroody FM, et al. 1993; Wagenmann M, et al. 1994) zu einem Sofortanstieg des Entzündungsmediators Histamin. Dies geschieht mittels direkter Aktivierung von Mastzellen via *IgE-cross-linking* durch das Allergen. Nachdem es zu einem vorübergehenden Absinken der Histaminkonzentration im Nasensekret eine Stunde nach Allergenprovokation gekommen ist, beobachten wir einen zweiten Anstieg zwischen der 2. und 6. Stunde nach Provokation. Auch in früheren Studien konnte dieser zeitliche Verlauf beobachtet werden (Naclerio RM, et al. 1985; Wagenmann M, et al. 1997).

Die Histaminfreisetzung in der Spätphase wird nicht durch Mastzellen ausgelöst, sondern durch die Aktivierung von Basophilen, welche die nasale Schleimhaut infiltrieren (Wagenmann M, et al. 1997). Eine Korrelation der Histaminfreisetzung in der Spätphase der allergischen Reaktion mit Symptomen, Sekretionsgewichten oder dem nasalen Atemwegswiderstand findet sich wie in vorangegangenen Studien auch in dieser Untersuchung nicht. Antihistaminika haben keinen Effekt auf die Mediatorfreisetzung in der Spätphase der allergischen Reaktion (Zweimann B, et al. 1995; Saengpanich S, et al. 2002).

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β wird in verschiedenen Formen der Entzündungsreaktion freigesetzt. In der Nase ist es bei der akuten viralen Rhinitis (Proud D, et al. 1994; Röseler S, et al. 1995) und chronischen Sinusitis (Rudack C, et al. 1998) gemessen worden. In unserer Studie wurden ab der 2. Stunde nach Allergenprovokation signifikant erhöhte IL-1 β -Werte im Nasensekret gemessen. Das Maximum lag hier in der 5. Stunde nach Provokation. In der Frühphase der allergischen Reaktion wurden im Gegensatz zu früheren Studien (Bachert C et Ganzer U. 1993; Sim TC, et al. 1994) keine erhöhten IL-1 β -Werte gemessen. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass der erste Messzeitpunkt unserer Studie mit fünf Minuten im Vergleich wesentlich früher nach Allergenprovokation liegt.

IL-1 β wird nicht nur im Rahmen von allergischen Reaktionen im Körper freigesetzt, sondern bei sehr vielen Entzündungsreaktionen unterschiedlicher Ursachen (Rosenwasser LJ, 1998).

Eine Reduzierung von IL-1 β in der Nasenschleimhaut wird durch die topische Gabe von Steroiden und nach einer spezifischen Immuntherapie bei allergischer Rhinitis beobachtet (Weido AJ, et al. 1996; Hauser U, et al. 1997).

Die experimentelle Behandlung von Mäusen mit einem rekombinanten löslichen IL-1-Rezeptor führt zu einer Hemmung der Spätphasenreaktion (Mullarkey MF, et al. 1994). Als

Therapieansatz ist eine Reduzierung von IL-1 β jedoch nicht durchführbar, da dieses Zytokin ubiquitär und nicht allergenspezifisch vorhanden ist, u.a. auch bei infektiös bedingten Entzündungsreaktionen.

Der natürliche Antagonist von IL-1 β ist der IL-1-Rezeptorantagonist. Die Bindungsaffinität ist dieselbe zum selben Rezeptor (IL-1-Rezeptor Typ I) wie IL-1 β , ohne diesen jedoch zu aktivieren (Rosenwasser LJ, et al. 1998). Wir konnten in unserer Studie zeigen, dass die Konzentrationen des IL-1-Rezeptorantagonisten im Nasensekret 1000-mal höher sind als die von IL-1 β .

Die Allergenprovokation führte eher zu einem moderaten Anstieg. Sehr hohe Konzentrationen von IL-1-Rezeptorantagonist können den proinflammatorischen Effekt von IL-1 β beenden (Rosenwasser LJ, et al. 1998). Diese antiinflammatorische Fähigkeit der Nasenschleimhaut ist bei allergischer Rhinitis unterdrückt (Bachert C, et al. 1999). Bachert et al. wiesen im Laufe der Pollensaison bei Allergikern einen Abfall von IL-1-Rezeptorantagonist und ein Anstieg von IL-1 β im Nasensekret nach.

Die experimentelle Allergenprovokation in unserer Studie hatte keine wesentliche Auswirkung auf IL-1Ra in der Nase. Die Produktion von IL-1Ra könnte einem zeitlichen Verlauf folgen, der außerhalb des Untersuchungszeitraums liegt.

Interleukin-8 zählt zu der Familie der Chemokine und stammt hauptsächlich aus Epithelzellen (Nonaka M, et al. 1996) und Mastzellen (Moller A, et al. 1993) der Nasenschleimhaut. In den ersten fünf Minuten nach Allergenprovokation war ein Anstieg von IL-8 festzustellen; ein zweiter Anstieg folgte in der Spätphase. Dieser zweite Anstieg war jedoch nicht statistisch signifikant. Bachert (Bachert C, et al. 1999) und Weido (Weido AJ, et al. 1996) beobachteten ähnliche Verläufe; hierbei war der Sofortanstieg allerdings nicht signifikant. Der zeitliche Verlauf der IL-8-Freisetzung ähnelt dem der Histaminfreisetzung und spricht für eine Freisetzung von präformiertem IL-8 aus Mastzellen. Diese sind fähig, IL-8 zu produzieren, es zu speichern und nach IgE-*cross-linking* freizusetzen (Tachimoto H, et al. 2000). Es gibt mehrere Gründe anzunehmen, dass IL-8 keine zentrale Rolle bei der Steuerung der allergischen Rhinitis spielt. So führt natürlicher Allergenkontakt zu keiner signifikanten Änderung von IL-8 im Nasensekret (Bachert C, et al. 1996). Des Weiteren reduziert eine Blockade von IL-8 durch spezifische Antikörper die chemotaktische Aktivität allergeninduzierter Nasallavagen kaum (Gosset P, et al. 1997).

Eine zentrale Rolle bei der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis kommt IL-4 zu. Dieses Th2-Zytokin ist notwendig für die Produktion von allergenspezifischem IgE. IL-4 unterstützt die Entwicklung des Th2-Phänotyps und antagonisiert Th1-Zellen. Es exprimiert das Adhäsionsmolekül VCAM-1 an der Nasenschleimhaut und führt dadurch zu einem selektiven Einstrom von Eosinophilen, Basophilen und T-Helferzellen (Borish L, et al. 1998).

IL-4 wird in kleinen Mengen produziert, bindet schnell an seine Rezeptoren und wird sehr schnell metabolisiert (Finkelmann FD, et al. 1999).

IL-4 mRNA wurde von Durham (Durham SR, et al. 1992) in nasalen Biopsien nach Allergenprovokation gemessen. Immunhistochemisch konnte Bradding (Bradding P, et al. 1993) in der Nasenschleimhaut IL-4 nachweisen. Anderen Gruppen gelang der Nachweis von IL-4 in der Nasenschleimhaut nicht (Borish LC, et al. 2001; Linden M, et al. 1995; Frieri M, et al. 1998). Hingegen war es uns möglich, IL-4 in der Spätphase der allergischen Reaktion signifikant nachzuweisen. Mögliche Gründe hierfür könnten sein: die höhere Sensitivität der Assays; die in der zeitlichen Abfolge schnellere Kollektion des Nasensekrets nach Provokation und der Vorteil der lokalisierten Provokation und Kollektion mittels Disk-Methode.

Unsere Daten zur IL-4-Freisetzung zeigen mehrere Stunden nach Provokation einen Anstieg mit einem Gipfel in der 5. Stunde. Der Einstrom von Eosinophilen in die Nasenschleimhaut entspricht dem zeitlichen Verlauf der Freisetzung von IL-4. Dies macht einen ursächlichen Zusammenhang durch die Expression von CD106 wahrscheinlich. Neue Therapieansätze bei der allergischen Rhinitis könnten auf IL-4 abzielen: Bekannt ist, dass topische nasale Steroide die IL-4 mRNA-Expression reduzieren (Masuyama K, et al. 1994). In Studien über allergisches Asthma wurde ein rekombinanter löslicher IL-4-Rezeptor erfolgreich eingesetzt (Borish LC, et al. 2001). Unter Asthma leidenden Patienten wurde mittels Inhalation ein IL-4 Rezeptorantagonist verabreicht. Dies führte zu einem signifikanten Rückgang der Symptome.

Jetzt demonstrieren wir, dass eine einseitige nasale Provokation wiederum eine beidseitige Freisetzung von Histaminen, wie schon in früheren Studien (6) nachgewiesen, bewirkt; ebenso eine Freisetzung von Zytokinen auf der Gegenseite, welches vorher noch nicht gezeigt worden war. Das Ausmaß der Zytokinfreisetzung auf der unprovokierten Nasenseite ist wesentlich geringer als auf der provozierten Seite; der zeitliche Verlauf ist jedoch derselbe. Zwei verschiedene Mechanismen können die kontralaterale Zytokinfreisetzung erklären:

1. Systemische Effekte und 2. neuronale Reflexe. Nach Allergenprovokation gelangen vermehrt produzierte Knochenmarksvorläuferzellen basophiler und eosinophiler Art in die systemische Zirkulation und von dort in die Nasenschleimhaut (Denburg JA. 1999). Der Einstrom von Basophilen in die Nasenschleimhaut stimmt überein mit dem Anstieg von Histaminen in der Spätphase, was für einen systemischen Einfluss spricht.

Besonders der frühe Anstieg von Mediatoren und Zytokinen im Nasensekret auf der unprovokierten Seite spricht allerdings für die Beteiligung neuronaler Mechanismen, die ortsansässige Zellen wie Mastzellen aktivieren konnten. Ein direkter Beweis für diese These

ist, dass Neurektomie des Nervus vidianus zu einer Unterbrechung der parasympathischen Innervation der Nase führt und die Histaminfreisetzung von Mastzellen nach Allergenprovokation gesenkt wird (Rucci L, et al. 1989). Der Nachweis von Neuropeptiden im Nasensekret nach Allergenprovokation (Mosimann BL, et al. 1993) unterstützt diese These ebenso. Neuropeptide könnten durch Aktivierung von ortsansässigen oder einströmenden Zellen die gegenseitige Freisetzung von Mediatoren und Zytokinen erklären. Wahrscheinlich wird die gegenseitige Freisetzung von Mediatoren und Zytokinen durch eine Kombination von neuronaler Entzündung, welche von Togias und Sanico (Sanico AM, et al. 1997) demonstriert wurde, und von systemischen Effekten der Allergenprovokation ausgelöst.

5. Zusammenfassung

Ziel der Studie war es, den zeitlichen Verlauf der Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin und Zytokinen wie IL-1 β IL-1Ra, IL-4 und IL-8 in der Sofort- und Spätphase nach unilateraler Allergenprovokation seitengetrennt zu messen. Durch die simultane Messung physiologischer Parameter wie Sekretionsgewichte und Atemwegswiderstand sowie die Erfassung von nasalen Symptomen nach Allergenprovokation können Symptome und Freisetzung der verschiedenen Entzündungsmediatoren dabei in Zusammenhang gestellt werden. Besonderes Augenmerk der Studie lag darauf, zu erfahren, ob eine Freisetzung von IL-1Ra in zeitlichem Zusammenhang zum Zytokin IL-1 β erfolgt. Die Frage ist somit, ob die Nasenschleimhaut über Mechanismen verfügt, die die Reaktion der allergischen Rhinitis zu unterdrücken vermögen. Bisher liegen keine Studien vor, die den zeitlichen Verlauf des Zytokins in Früh- und Spätphase in der Nasenschleimhaut messen.

Zwölf Freiwillige mit einer ausschließlich saisonalen allergischen Rhinitis nahmen an der Studie teil. Mittels seitengetrenntem Diskverfahren wurden Messungen der Symptome und Entzündungsmediatorkonzentrationen nach Allergenexposition und nach (Leer-) Kontrollexposition im zeitlichen Verlauf ermittelt.

Folgende Ergebnisse konnten gefunden werden: Eine einseitige nasale Provokation führt zu einer Zytokinfreisetzung und Histaminfreisetzung auch auf der Gegenseite.

Histamin wird in der Früh- und Spätphase nach Allergenprovokation freigesetzt. Die Histaminfreisetzung in der Spätphase korreliert jedoch nicht mit Symptomen und dem nasalen Atemwegswiderstand.

IL-1 β steigt in den Stunden nach Allergenprovokation kontinuierlich an. IL-1Ra ist nicht signifikant erhöht nach „nasaler“ Allergenprovokation. Somit besteht zeitlich keine direkte Gegenregulation durch IL-1Ra.

Die Konzentration des natürlichen Antagonisten IL-1Ra liegt in der Nasenschleimhaut etwa 1000-fach höher als die von IL-1 β .

IL-4 ist in der Spätphase der allergischen Reaktion in unserer Studie signifikant erhöht messbar und steuert die allergische Reaktion der Spätphase.

IL-8 wird in der Früh- und Spätphase der Reaktion nur in geringer Menge freigesetzt.

6. Literaturverzeichnis

Arzubiaga C, Morrow J, Roberts LJ 2nd, Biaggioni I. (1991)

Neuropeptide Y, a putative cotransmitter in noradrenergic neurons, induces mast cell degranulation but not prostaglandin D2 release. *J Allergy Clin Immunol* 1991 Jan;87(1 Pt 1):88-93.

Bachert C, van Kempen M, Van Cauwenberge P. (1999)

Regulation of proinflammatory Zytokines in seasonal allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118(2-4):375-9.

Baroody FM, Wagenmann M, Naclerio RM. (1993)

Comparison of the secretory response of the nasal mucosa to methacholine and histamine. *J Appl Physiol* 1993 Jun;74(6):2661-71.

Borish L, Rosenwasser LJ. (1998)

Zytokines in allergic inflammation. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, editors. *Allergy, Principles & Practice*. 5th edition ed. St. Louis: Mosby, 1998:108-123.

Borish LC, Nelson HS, Corren J, Bensch G, Busse WW, Whitmore JB, et al. (2001)

Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(6):963-970.

Bradding P, Feather IH, Wilson S, Bardin PG, Heusser CH, Holgate ST, et al. (1993)

Immunolocalization of Zytokines 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):3853-65.

Church MK, el Lati S, Caulfield JP. (1991)

Neuropeptide-induced secretion from human skin mast cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991;94(1-4):310-8.

Denburg JA. (1999)

Bone marrow in atopy and asthma: hematopoietic mechanisms in allergic inflammation. *Immunol Today* 1999;20(3):111-3.

Durham SR, Ying S, Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Mackay IS, et al. (1992)

Zytokine 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):2390-4.

Finkelman FD, Morris SC. (1999)

Development of an assay to measure in vivo Zytokine production in the mouse. Int Immunol 1999;11(11):1811-8.

Frieri M, Therattil J, Chavarria V, Cosachov J, Kumar NS, Wang SF, et al. (1998)

Effect of mometasone furoate on early and late phase inflammation in patients with seasonal allergic rhinitis. Ann Allergy Asthma Immunol 1998;81(5 Pt 1):431-7.

Gosset P, Tillie-Leblond I, Malaquin F, Durieu J, Wallaert B, Tonnel AB. (1997)

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):379-88.

ISAAC Steering Committee (Writing Committee: Beasley , R.; Keil, U.; Mutius, E. von, Pearce, N.). (1998)

Worldwide variations in the prevalence of atopic diseases: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). Lancet 1998;351:1225-1232.

Itoh K, Katahira S, Matsuzaki T, Ohyama M, Fukuda K. (1992)

Retention fluids of chronic sinusitis induce neutrophil adherence to microvascular endothelial cells. Acta Otolaryngol 1992 Sep;112(5):882-9.

Linden M, Greiff L, Andersson M, Svensson C, Akerlund A, Bende M, et al. (1995)

Nasal Zytokines in common cold and allergic rhinitis. Clin Exp Allergy 1995;25(2):166-72.

Masuyama K, Jacobson MR, Rak S, Meng Q, Sudderick RM, Kay AB, et al. (1994)

Topical glucocorticosteroid (fluticasone propionate) inhibits cells expressing Zytokine mRNA for interleukin-4 in the nasal mucosa in allergen-induced rhinitis. Immunology 1994;82(2):192-9.

Moller A, Lippert U, Lessmann D, Kolde G, Hamann K, Welker P, et al. (1993)

Human mast cells produce IL-8. J Immunol 1993;151(6):3261-6.

Mosimann BL, White MV, Hohman RJ, Goldrich MS, Kaulbach HC, Kaliner MA. (1993)
Substance P, calcitonin gene-related peptide, and vasoactive intestinal peptide increase in nasal secretions after allergen challenge in atopic patients. J Allergy Clin Immunol 1993;92:95-104.

Mullarkey MF, Leiferman KM, Peters MS, Caro I, Roux ER, Hanna RK, et al. (1994)
Human cutaneous allergic late-phase response is inhibited by soluble IL-1 receptor. J Immunol 1994;152(4):2033-41.

Nonaka M, Nonaka R, Jordana M, Dolovich J. (1996)
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):1675-81.

Okamoto Y, Shirotori K, Kudo K, Ishikawa K, Ito E, Togawa K, et al. (1993)
Zytokine expression after the topical administration of substance P to human nasal mucosa. The role of substance P in nasal allergy. J Immunol 1993;151(8):4391-8.

Rosenwasser LJ. (1998)
Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. J Allergy Clin Immunol 1998;102(3):344-50.

Rucci L, Masini E, Arbi RR, Giannella E, Fioretti C, Mannaioni PF, et al. (1989)
Vidian nerve resection, histamine turnover and mucosal mast cell function in patients with chronic hypertrophic non-allergic rhinitis. Agents Actions 1989;28(3-4):224-30.

Rudack C, Hauser U, Wagenmann M, Bachert C, Ganzer U. (1998)
Zytokine pattern in various forms of sinusitis Laryngorhinootologie. 1998 Jan;77(1):34-7.

Sanico AM, Atsuta S, Proud D, Togias A. (1997)
Dose-dependent effects of capsaicin nasal challenge: in vivo evidence of human airway neurogenic inflammation. J Allergy Clin Immunol 1997;100(5):632-41.

Sanico AM, Philip G, Proud D, Naclerio RM, Togias A. (2000)

Comparison of nasal mucosal responsiveness to neuronal stimulation in non-allergic and allergic rhinitis: effects of capsaicin nasal challenge. Clin Exp Allergy 1998 Jan;28(1):92-100.

Tachimoto H, Ebisawa M, Hasegawa T, Kashiwabara T, Ra C, Bochner BS, et al. (2000)

Reciprocal regulation of cultured human mast cell Zytokine production by IL-4 and IFN-gamma. J Allergy Clin Immunol 2000;106(1 Pt 1):141-9.

Wagenmann M, Baroody FM, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Naclerio RM. (1994)

The effect of terfenadine on unilateral nasal challenge with allergen. J Allergy Clin Immunol 1994 Mar;93(3):594-605.