

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

Untersuchungen zum Primingeffekt bei der allergischen Rhinitis durch wiederholte Allergenprovokation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

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

Claudia Jonkmanns

2003

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

gez.: Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch M.A.
Dekan

Referent: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Uwe Ganzer

Korreferent: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Markus Grewe

Meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1	Epidemiologie	4
1.2	Definition, Symptomatik der allergischen Rhinitis	4
1.3	Diagnostik	5
1.4	Therapiekonzepte	7
1.5	Immunologische Grundlagen	9
1.6	Der Primingeffekt	15
1.7	Neurogene Mechanismen	16
1.8	Fragestellung	17
2.	Material und Methoden	18
2.1	Probandenauswahl	18
2.2	Versuchstermine	18
2.3	Nasale Provokation mit der Disc-Methode	19
2.3.1	Allergen	19
2.3.2	Disc-Applikation und Sekretsammlung	20
2.3.3	Disc-Weiterverarbeitung	21
2.4	Lavage	22
2.5	Symptomerfassung	23
2.6	Rhinomanometrie	23
2.7	Versuchsablauf	23
2.8	Kontrollen	25
2.9	Mediator- und Zytokinbestimmung mit ELISA	25
2.10	Konzentrationsbestimmung pro Disc	26
2.11	Statistik	26

3.	Ergebnisse	27
3.1	Effekt der einmaligen Allergenprovokation	27
3.1.1	Symptomscore	28
3.1.2	Niesen	29
3.1.3	Nasaler Flow	30
3.1.4	Sekretgewicht	31
3.1.5	Histamin	32
3.1.6	ECP	33
3.1.7	Interleukin-4	34
3.1.8	Interleukin-5	35
3.2	Kontrollen	36
3.2.1	Effekt der Allergenprovokation nach 14tägiger Pause (T0 vs. T1)	36
3.2.2	Kontrollprovokation	36
3.2.2.1	Symptomparameter	37
3.2.2.2	Mediatoren und Zytokine	38
3.3	Effekt der wiederholten Allergenprovokation in der Frühphase	39
3.3.1	Symptomscore	39
3.3.2	Niesen	40
3.3.3	Nasaler Flow	41
3.3.4	Sekretgewicht	42
3.3.5	Histamin	43
3.3.6	ECP	44
3.3.7	Interleukin-4 und -5	45

3.4	Effekt der wiederholten Allergenprovokation	
	In der Spätphase	46
3.4.1	Symptomscore, Niesen, nasaler Flow, Sekretgewicht	46
3.4.2	Histamin	47
3.4.3	ECP	48
3.4.4	Interleukin-4	49
3.4.5	Interleukin-5	50
3.5	Zellzählung und zytologische Auswertung	51
3.5.1	Zellzahlen nasale Lavage	51
3.5.2	Zytologische Auswertung	52
4.	Diskussion	54
4.1	Effekt der Allergenprovokation	54
4.2	Der Primingeffekt	55
4.3	Histamin	58
4.4	Zellulärer Einstrom	61
4.5	Zytokine	64
4.6	Neuropeptide und reflektorische Mechanismen	68
5.	Zusammenfassung	71
6.	Literaturverzeichnis	77
7.	Anhang	89

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Im Rahmen europaweiter Studien in den 90er Jahren wurde mittels repräsentativer Erhebungen und Allergietestungen geschätzt, dass jeder fünfte Deutsche an einer allergischen Rhinitis leidet (Nowak D. et al. 1996, Nicolai T. et al 1997). Generell ist die Prävalenz allergischer Erkrankungen in Europa als hoch und weiter steigend anzusehen (ISAAC-Studie 1998).

Die Ursachen für diese Entwicklung sind bisher nicht vollständig geklärt, man nimmt jedoch an, dass eine Zunahme der Allergenexposition gegenüber Aeroallergenen, allergiefördernde Umweltverunreinigungen und die geringere Stimulation des frühkindlichen Immunsystems in unserer Gesellschaft die Ursache für eine Zunahme allergischer Sensibilisierungen sein könnte (Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen 1999).

Allergischen Erkrankungen kommt sowohl als individuelles, oft chronifiziertes Leiden mit typischen Komplikationen, als auch in sozioökonomischer Hinsicht eine wichtige Bedeutung zu.

1.2 Definition und Symptomatik der allergischen Rhinitis

Als Allergie bezeichnet man eine durch Kontakt des Organismus mit einem Allergen hervorgerufene, von der Norm abweichende, gesteigerte Antwort des erworbenen Immunsystems.

Das Erfolgsorgan bei der allergische Rhinitis ist der obere Respirationstrakt, insbesondere die Nasenschleimhaut. Abhängig vom Allergentyp kann die allergische Rhinitis sowohl saisonal (Pollen von Bäumen, Gräsern, Kräutern), als auch ganzjährig perennial (Hausstaubmilben, Schimmelpilzsporen, Tierallergene), auftreten.

Charakteristische Symptome der saisonalen allergischen Rhinitis sind eine gesteigerte, wässrige Nasensekretion, nasale Obstruktion, sowie Juck- und Niesreiz.

Daneben können eine Konjunktivitis, tracheobronchiale Reizungen und Tubenventilationsstörungen sowie Minderung des Riechvermögens vorhanden sein. Bei perennialen Allergien ist die Symptomatik dagegen weniger spezifisch. Hier steht oft eine chronisch behinderte Nasenluftpassage im Vordergrund, die Symptome werden häufig als rezidivierende Infekte der oberen Luftwege bzw. der Nasennebenhöhlen fehlinterpretiert. Sekundär kann es zu Schlafstörungen, Konzentrationsminderung und Leistungsabfall bei unzureichend behandelten Patienten kommen. Eine Ausweitung des Allergenspektrums und die Entwicklung eines Asthma bronchiale (sog. „Etagenwechsel“) sind typische Komplikationen.

1.3 Diagnostik

Die Diagnostik der allergischen Rhinitis stützt sich in erster Linie auf eine sorgfältige Anamnese. Familienanamnestische Angaben über weitere Allergiker in der Familie oder andere Erkrankungen im Bereich des atopischen Formenkreises können den Verdacht auf eine allergische Erkrankung deutlich erhärten. Die Art und Stärke der Symptome sowie die zeitlichen und örtlichen Zusammenhänge, in denen sie auftreten, sind für die erste Einschätzung des behandelnden Arztes wichtig. Häufig kann ein gezieltes Nachfragen zur Wohnsituation (Teppiche, Pflanzen, Haustiere, feuchte Wände) sowie zum ausgeübten Beruf oder zu Hobbies Aufschluss über möglicherweise relevante Allergene geben.

Die HNO-ärztliche Untersuchung ist ebenfalls ein unverzichtbarer Teil der Diagnostik. Bei der Rhinoskopie findet sich typischerweise eine gerötete Nasenschleimhaut und livide, hyperplastische untere Nasenmuscheln. Zur Differentialdiagnostik sollte eine endoskopische Untersuchung erfolgen, um die mittleren Nasengänge und den Nasenrachen einzusehen, da eine chronische Sinusitis mit oder ohne Polypen oder adenoide Vegetationen bei Kindern ähnliche Symptome hervorrufen können. Diese Erkrankungen schließen das Vorliegen einer allergischen Rhinitis jedoch keineswegs aus, sondern können zusätzlich Ausdruck der chronisch allergischen Entzündung sein und müssen in die Therapieplanung mit einbezogen werden.

Als nächster diagnostischer Schritt werden Hauttests durchgeführt. Am häufigsten wird der Prick-Test eingesetzt, da er eine hohe Aussagekraft und ein geringes Nebenwirkungsrisiko besitzt. Es werden jeweils Tropfen von industriell hergestellten,

standardisierten Allergenlösungen auf die Haut des Unterarmes mit NaCl- und Histaminlösung als Positiv- und Negativkontrolle aufgetragen. Diese werden mit einer Nadel oder Lanzette so durchstochen, dass die Allergenlösung mit immunkompetenten Zellen in der Subcutis in Kontakt kommt und eine Reaktion zur Quaddel- und Exanthembildung ausgelöst wird. Nach 20 min kann die Quaddel/das Exanthem ausgemessen und entsprechend dokumentiert werden.

Bei einem Scratch-Test wird an Stelle von industriell hergestellten Allergenen vom Patienten mitgebrachtes Material z.B. Hausstaub auf oberflächlich aufgekratzter Haut getestet. Die Proben stammen aus verschiedenen Lokalisationen der häuslichen oder beruflichen Umgebung. Nach etwa 20 min kann auch hier eine Quaddel/Erythembildung beobachtet und im Vergleich zu der Reaktion einer gescratchten Hautpartie mit NaCl-Lösung und Histaminlösung beurteilt werden.

Um die klinische Relevanz einer im Hauttest nachgewiesenen Sensibilisierung am Erfolgsorgan Nase beurteilen zu können, sollte ein nasaler Allergen-Provokations-Test durchgeführt werden. Zunächst wird der native Flow der Nase durch eine anteriore Rhinomanometrie bestimmt. In der besser belüfteten Nasenhaupthöhle erfolgt eine Kontrollprovokation mit dem Lösungsmittel, in dem das zu testende Allergen später gelöst ist. Nach einer 10minütigen Einwirkungszeit wird erneut der nasale Flow bestimmt. Ist dieser weniger als 20% gesunken, kann die Provokation mit dem entsprechenden Allergen durchgeführt werden. Dazu sprüht man analog zur Lösungsmittelprovokation die Allergenlösung auf die untere Nasenmuschel. Die Provokation erfolgt in tiefer Inspiration zur Vermeidung einer bronchialen Reizung. Zur Beurteilung der Reaktion werden die nach Allergengabe auftretenden Symptome, wie wässrige Sekretion, Niesreiz, Schleimhautschwellung, Konjunktivitis, Juckreiz dokumentiert. Ist nach 10 Minuten der Flow-Abfall größer als 40% oder der Symptomscore positiv, liegt eine positive nasale Provokation vor. Weitere Indikationen der nasalen Provokation liegen in einer Diskrepanz zwischen Anamnese, Hauttest und ggf. in-vitro-Diagnostik sowie bei der Identifikation eines relevanten Allergens bei polyvalenten Allergikern.

Die derzeit zweifellos wichtigste in-vitro-Untersuchung besteht im Nachweis von allergenspezifischem IgE im Serum des Patienten durch EAST (Enzyme-Allergo-Sorbent-Test). Das Prinzip beruht auf dem Nachweis der Bindung von Patientenblut-IgE an das Allergen und wird im ELISA-Verfahren bestimmt. Die Bestimmung des spezifischen IgE kann die klinische Diagnose laborchemisch bestätigen und erlaubt

den Nachweis einer Sensibilisierung gegen Allergene, für die keine Extrakte für die Hauttestung verfügbar sind. Wichtig ist, dass der Nachweis von spezifischem IgE nicht mit einer Allergie gleichzusetzen ist, sondern dass die klinische Relevanz immer durch eine entsprechende Anamnese bzw. durch Provokationstestungen abgesichert werden muss, bevor Konsequenzen aus dem Testergebnis gezogen werden können (Becker, W.-M. et al. 2000).

1.4 Therapie

Nach dem heutigen Kenntnisstand stehen verschiedene therapeutische Optionen zur Verfügung, deren Auswahl von der Symptomatik des Patienten, den relevanten Allergenen und von Begleiterkrankungen abhängt.

Wann immer möglich, sollte die Allergenexposition vermindert werden. Sinnvolle und therapierelevante Karenzmaßnahmen werden bei Hausstaubmilbenallergikern als Basis der antiallergischen Therapie angewandt. Beispielsweise wird die Milbenbelastung durch die Sanierung der Schlafstätte des Patienten mit einem sogenannten Encasing, gleichbedeutend mit einem milbendichten Bezug der Matratze erheblich gesenkt. Die Vermeidung von Kontakt zur Tieren bei Tierallergikern ist die wirkungsvollste Methode, eine allergische Symptomatik zu verhindern. Karenzmaßnahmen sind nicht immer suffizient umzusetzen. Einhaltung bestimmter Verhaltensweisen, zum Beispiel regelmäßiges Waschen und Lüften der Bettwäsche, Sanierung von Schimmelpilzbefall im häuslichen Bereich, Haustierverbot erfordern eine hohe Compliance des Patienten. Andere Allergenbelastungen, zum Beispiel die ubiquitär vorhandenen Pollen, können nicht ausreichend vermieden werden.

Allergische Erkrankungen beeinträchtigen den Patienten in unterschiedlicher Weise und Stärke. Davon abhängig ist die Entscheidung bezüglich einer geeigneten medikamentösen Therapie. Die topische Gabe von Degranulationshemmern (z.B. Chromoglycinsäure) hat eine membranstabilisierende Wirkung auf Mastzellen, die nur bei frühzeitigem Therapiebeginn den erwünschten therapeutischen Effekt zeigt. Ihr Einsatz ist nur bei leichter Symptomatik sinnvoll.

Topische und systemische Antihistaminika wirken durch eine Blockierung der H1-Rezeptoren und vermindern die Histaminwirkung im Rahmen der allergischen

Sofortreaktion. Während diese Medikamentengruppe die Symptomatik der Histaminvermittelten Symptome Niesreiz, Juckreiz und Rhinorrhoe effektiv unterdrücken können, wirken sie weniger stark auf die nasalen Obstruktion.

Topisch als auch systemisch angewandte Steroide modulieren das Immunsystem unspezifisch und haben eine antientzündliche Wirkung. Sie wirken auf molekularer Ebene nach Bindung an spezifische Glucokortikoidrezeptoren im Zellkern und verändern die Synthese verschiedener Proteine. Es werden die Zytokin-Expression, proinflammatorische Moleküle und der Einstrom von Entzündungsmediatoren gehemmt. Corticoidhaltige Nasensprays sind bei der Hauptbeschwerde nasale Obstruktion und in der Therapie perennialer Allergien längerfristig einsetzbar, da die systemische Bioverfügbarkeit bei modernen Präparaten vernachlässigbar ist und es so zu einer dauerhaften Entzündungshemmung ohne relevante Nebenwirkungen kommen kann.

Die spezifische Immuntherapie (SIT) ist ein kausaler Therapieansatz. Der Stellenwert der SIT (Synonym: Hyposensibilisierung) wurde in den letzten Jahren deutlich gesteigert. Die Identifikation der relevanten Allergene, die industrielle Herstellung standardisierter Extrakte sowie die Erforschung ihrer wissenschaftlichen Grundlagen in gut dokumentierten Studien zur Wirksamkeit und Verträglichkeit haben dazu beigetragen.

1998 wurde die Wirksamkeit und Sicherheit der SIT in einem Positionspapier der WHO bestätigt und die Indikationen für ihre Anwendung dokumentiert (Bousquet, J. et al. 1998). Die spezifische Immuntherapie wird durch Injektion ansteigender Allergenmengen bis zur maximalen individuellen Erhaltungsdosis durchgeführt. Die Allergenlösung wird subcutan in den Oberarm injiziert und der Patient anschließend mindestens für 30 min überwacht. Die Therapiedauer sollte mindestens 3 Jahre betragen.

Unser derzeitiges Verständnis des Mechanismus der Immuntherapie geht davon aus, dass durch die Verabreichung der ansteigenden Allergenmengen die allergiesteuernden Th2-Lymphozyten durch Induktion der gegenregulatorischen Th1-Zellen gehemmt werden (Durham, S. R. et al. 1996). Es kommt langfristig zu einer Besserung der klinischen Beschwerden und zur Reduktion des allergischen Asthmas als Spätfolge besonders bei Kindern.

Der klinische Erfolg hängt in erster Linie von der korrekten Indikationsstellung, der Auswahl der relevanten Allergene und der Gesamtdosis des applizierten Allergens ab. Die SIT ist die einzige Therapieform bei allergischer Rhinitis, für die eine Verringerung des Risikos der Entwicklung eines allergischen Asthma bronchiale („Etagenwechsel“) demonstriert werden konnte (Jacobson, L. et al. 1998).

1.5 Immunologische Grundlagen

Die allergische Rhinitis lässt sich in der klassischen Definition der Immunreaktionen nach Coombs und Gell als Reaktion vom Soforttyp (Typ I) einordnen. Hierunter versteht man die Auslösung einer Überempfindlichkeitsreaktion nach einer Induktion der Synthese von spezifischen IgE-Antikörpern.

Bevor eine allergische Reaktionskette ausgelöst werden kann, muss eine Sensibilisierung des Organismus stattgefunden haben. Das Allergen wird zunächst in die Schleimhaut aufgenommen und von antigenpräsentierenden Zellen, z.B. Makrophagen oder dendritische Zellen den immunkompetenten B-Lymphozyten präsentiert. Diese wandeln sich daraufhin in Plasmazellen um und synthetisieren spezifisches IgE, das sich an die hochaffinen Fc ϵ RI IgE-Rezeptoren der Mastzellen und basophilen Granulozyten bindet.

Wesentliche Erkenntnisse über die pathophysiologischen Grundlagen der allergischen Rhinitis stammen aus Studien, in denen experimentelle nasale Allergenprovokationen durchgeführt wurden. Hierbei kommt es zu einer Reproduktion der Symptome der allergischen Rhinitis. Im Gegensatz zur natürlichen Allergenexposition kann der Zeitpunkt und die Menge des applizierten Allergens hierbei kontrolliert werden, indem die Untersuchungen an Freiwilligen mit einer saisonalen allergischen Rhinitis außerhalb der Saison durchgeführt werden. Zur Provokation werden standardisierte Allergenlösungen in die Nase gesprüht oder mit Hilfe von Filterpapierscheiben (Disc-Methode, siehe Kapitel „Material und Methoden“) auf die Schleimhaut appliziert. Vergleichbar ist diese Form der Stimulation mit der diagnostischen nasalen Allergenprovokation. Die nach der Provokation auftretenden Symptome werden dokumentiert und ausgewertet, im gesammelten Nasensekret können Mediatoren und Zytokine gemessen werden.

Nach Abschluss der Sensibilisierung führt ein erneuter Kontakt mit dem Allergen zur Auslösung der allergischen Reaktion. In die Schleimhaut eingedrungene Allergenmoleküle binden an spezifische IgE-Antikörper, die auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten an hochaffine Fc_{RI}-Rezeptoren gebunden sind. Dies führt zum sogenannten „crosslinking“ der IgE-Moleküle und nachfolgendem zellulären Ca²⁺-Einstrom. Durch die Kopplung und Kreuzvernetzung eines Allergens mit mindestens zwei allergenspezifischen zellständigen IgE-Antikörpern kommt es zu einer Mastzelldegranulation und Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Tryptase und präformierten Zytokinen. Die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen wird sofort induziert, sie lassen sich bereits 30 Sekunden nach dem Allergenkontakt in deutlich erhöhten Konzentrationen im Nasensekret nachweisen (Naclerio, R.M. et al. 1983, Wagenmann M. et al. 1994, Wagenmann M. et al. 1996).

Diese Mediatoren wirken innerhalb kürzester Zeit auf Blutgefäße, Drüsen und Nervenfasern in der Nasenschleimhaut und führen zu den klassischen Symptomen der allergischen Sofortreaktion.

Die Stimulation der sensorischen Fasern in der Schleimhaut führt über Axonreflexe auch zur Freisetzung von Neuropeptiden, die ebenfalls im Nasensekret nachweisbar sind (Mosimann, B.I. et al: 1993).

Es werden Vasodilatation, Plasmaexsudation durch gesteigerte Kapillarpermeabilität und glanduläre Sekretion ausgelöst. Nervale Reflexbögen sind für Niesreiz und Juckreiz verantwortlich. Es resultieren die typischen Symptome Rhinorrhoe, nasale Obstruktion, Niesen und Juckreiz (Bousquet, J. et al. 1996).

Diese Sekunden bis Minuten andauernde und akute Symptome hervorrufende Reaktion wird als „early response“ oder Sofortreaktion bezeichnet. Eine Übersicht der ablaufenden Mechanismen während der Sensibilisierung und der Frühphase der allergischen Reaktion ist in Abb. 1.1 dargestellt.

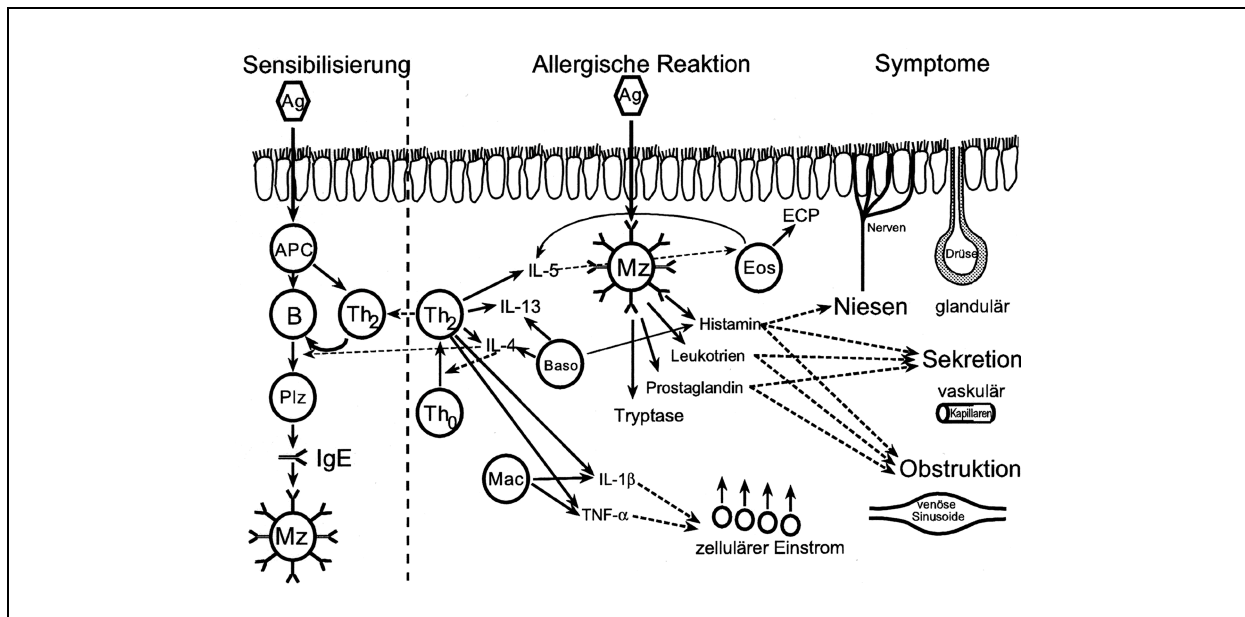


Abb. 1.1: Übersicht der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis

Legende: Ag: Allergen; Mac: Makrophage; B: B-Lymphozyt; Th₀₋₂: T-Helfer-Zellen Typ 0-2; Plz: Plasmazelle; Mz: Mastzelle; Baso: Basophiler Granulozyt; Eos: Eosinophiler Granulozyt.

Linker Teil: Ablauf der allergischen Sensibilisierung

Mittlerer Teil: Ablauf der allergischen Reaktion

Rechter Teil: Ausgelöste Symptome

Bei histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen zeigt sich, dass die allergische Nasenschleimhaut sehr viele für eine Immunreaktion notwendige Zellen enthält. Antigenpräsentierende Zellen sowie B- und T-Lymphozyten findet man bereits in der Submucosa, wobei der Anteil der B-Lymphozyten überwiegt. Innerhalb der Population der T-Zellen überwiegt die Zahl der CD4-positiven T-Helfer-Zellen gegenüber den CD8-positiven T-Suppressor-Zellen (Varney, V.a. et al. 1992, Stoop, A.E. et al. 1989). Während gesunde Mucosa nur wenige Mastzellen und eosinophile Granulozyten enthält, ist deren Anzahl in einer allergischen Schleimhaut deutlich erhöht.

Die Beschreibung der Sofortreaktion oder Frühphase wird jedoch der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis nicht gerecht. Die zunächst nach Allergenprovokation der Haut und der Bronchien beobachtete Spätphasereaktion wurde 1985 von Naclerio auch an der Nase beschrieben. Hierunter versteht man, dass es nach experimenteller Allergenprovokation in den Stunden nach dem Antigenkontakt zu einem erneuten Anstieg von Symptomen kommt, der mit wiederholter Mediatorfreisetzung einhergeht und ohne erneuten Allergenkontakt auftritt. In vieler Hinsicht entspricht das pathophysiologische Bild der Spätphase dem

Ablauf einer chronischen Entzündung und daher eher mit der Reaktion überein, wie sie im Verlauf der natürlichen Erkrankung zu finden ist.

Einige Stunden nach Allergenkontakt kommt es zu einem erneuten Anstieg der Histamin- und Leukotrienkonzentration (Naclerio, M. et al. 1985). Zusätzlich lässt sich ein massiver Einstrom von Entzündungszellen nachweisen. Im Vordergrund stehen hier eosinophile Granulozyten, aber auch T-Lymphozyten, Mastzellen und basophile Granulozyten (Bascom, R. et al. 1988, Bachert, C. et al. 1991, Juliusson, S. et al. 1992).

Die Bedeutung von eosinophilen Granulozyten im Rahmen allergischer Erkrankungen ist bekannt. Der Influx und die Mediatorausschüttung von eosinophilen Granulozyten findet typischerweise in der Spätphase statt. Etwa eine Stunde nach einer Allergenprovokation kann bis zu 24 Stunden lang eine erhöhte Anzahl Eosinophiler im Nasensekret nachgewiesen werden (Wang, D. et al. 1995). Neben Major Basic Protein (MBP), Eosinophil-derived Neurotoxin (EDN) und Eosinophil Peroxidase (EPO) ist das Eosinophil Cationic Protein (ECP) ein wichtiger Mediator der eosinophilen Granulozyten. Durch die Ausschüttung dieser zytotoxischen Mediatoren aus ihren Granula tragen diese Zellen zur Gewebsschädigung und Entzündungsreaktion bei (Martin, L. B., et al. 1996).

Zytokine sind multifunktionelle Proteine, die von allen kernhaltigen Zellen gebildet werden können und eine große Zahl verschiedener Effekte auf unterschiedlichste Zellen haben. Die Modulation der Immunantwort in den verschiedenen Phasen der allergischen Rhinitis wird wesentlich durch bestimmte Zelltypen und deren Zytokinmuster bestimmt. In der allergischen Nasenschleimhaut sind vor allem die Mastzellen, Basophilen, Makrophagen, T-Zellen und Eosinophile relevante Quellen dieser Proteine.

Ein gesteigertes Interesse im Rahmen der allergischen Entzündung gilt den CD4-positiven T-Helfer-Lymphozyten, die unter immunologischen Gesichtspunkten in Th1- und Th2-Zellen unterteilt werden. Th1-Zellen bewirken eine zellulär vermittelte Immunmodulation vom verzögerten Typ (Typ IV nach Coombs und Gell, z. B. Tuberkulinreaktion). Typische Th1-spezifische Interleukine sind Interleukin-2, Interleukin-12 und Interferon- γ .

Im Gegensatz dazu unterstützen Th2-Zellen den Ablauf einer humoralen Immunreaktion, klassischerweise die allergische Sofortreaktion (Typ I). Sie produzieren und sezernieren Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5) sowie

Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-13 (IL-13). Von der lokalen Zytokinkonzentration hängt es wiederum ab, in welche Richtung sich undifferenzierte Th0-Zellen entwickeln (Mosmann, T. R. et al. 1989), wie in Abbildung 1.2 gezeigt.

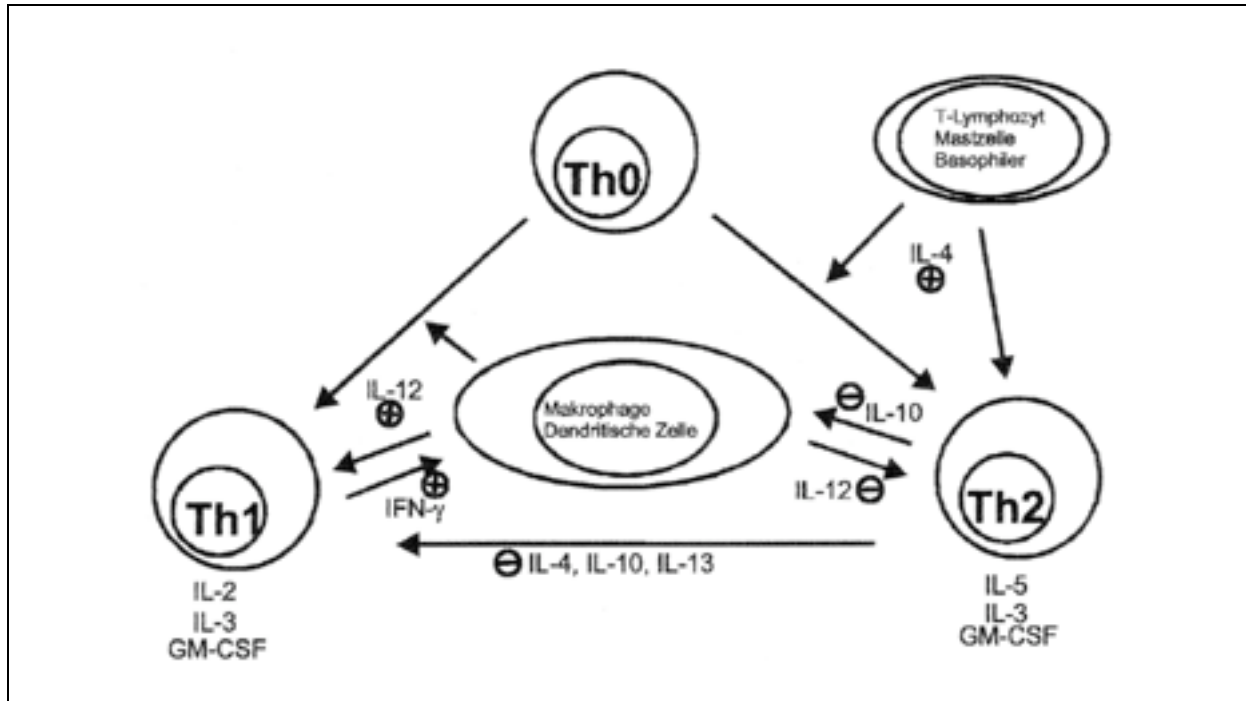


Abb. 1.2: Übersicht über Th0-Differenzierung in Th1- und Th2-Zellen mit entsprechenden Zytokinen
 Legende: IL: Interleukin, IFN: Interferon- γ , GM-CSF: Granulozyten-Makrophagen-Colonie-stimulierende Faktoren

In der allergischen Nasenschleimhaut lassen sich vorwiegend Zellen, die das Th2-Muster aufweisen, darstellen (Durham, S.R. et al. 1992). Die Zytokine des Th2-Typs sind für allergische Reaktionen in zweierlei Hinsicht bedeutsam: Einerseits spielen vor allem IL-4 und IL-13 eine zentrale Rolle bei der Induktion und Unterhaltung der Synthese von IgE (Pène, J. 1988) und andererseits sind es IL-4, IL-5 und IL-13, die für die Anreicherung von Eosinophilen, Basophilen und T-Zellen in der Schleimhaut verantwortlich sind. Dies geschieht sowohl über die Expression von Adhäsionsmolekülen, als auch über die Wirkung von IL-5 als Wachstums- und Überlebensfaktor für eosinophile Granulozyten in der Schleimhaut (Yamaguchi, Y. 1988). Auch die Herabsetzung der Schwelle zur Mediatorausschüttung, eine Abschwächung inhibitorischer Mechanismen und eine mögliche Veränderung auf Rezeptorebene durch Zytokine werden diskutiert (Bousquet, J. et al. 1996; Baraniuk, J.N. 1997).

Einleitung

Diese pathophysiologischen Erkenntnisse können Basis für neue und spezifischere Therapieformen der allergischen Rhinitis sein. In der folgenden Tabelle sind alle wichtigen Mediatoren und Zytokine mit Ihren Effekten dargestellt (Tab. 1.1).

Mediator/Zytokin	Quellen	Effekte	Frühphase	Spätphase
Histamin	Mz, Baso	glanduläre und vaskuläre Sekretion, Obstruktion, nervale Stimulation	++	+
Prostaglandin D ₂	Mz	(Sekretion, nervale Stimulation)	+	-
Leukotrien C ₄	Mz	Sekretion, Obstruktion, (nervale Stimulation)	+	-
Neuropeptide	Nerven	gland. und vask. Sekretion, Obstruktion, nervale Stimulation, Mediatorfreisetzung ?	++	?
ECP	Eos	nervale Stimulation, zytotoxisch, neurotoxisch	-	+
IL-1 _α	Mac, Epi, T, Endo	Expression von Adhäsionsmolekülen, Aktivierung von NK-Zellen, T- und B-Zellen	(+)	+
IL-2	Th1	Aktivierung und Proliferation von T-Zellen	-	-
IL-3	T, Eos	Aktivierung von Eos, Basos	-	(+)
IL-4	Th2, Baso, Mz	IgE-Synthese, selektiver Einstrom von Eos, Baso, T, Aktivierung Th2	-	+
IL-5	Th2, Eos, Mz	Einstrom, Aktivierung und Verlängerung der Überlebenszeit von Eos	-	(+)
IL-10	Th2	Hemmung von Th1, antiinflammatorische Eigenschaften	?	?
IL-12	Mac, Th1 DC	Aktivierung von Th1, Hemmung von Th2	?	?
IL-13	Th2, Baso	IgE-Synthese, selektiver Einstrom von Eos, Baso, T, Aktivierung von Th2	-?	+?
GM-CSF	T, Eos, Mac, Epi	Aktivierung und Verlängerung der Überlebenszeit von Eos, Aktivierung von Mac und Neutro	-	+
TNF- α	Mz, Mac, T	Adhäsionsmoleküle, Aktivierung von Mac, Epi, Neutro, T, B	+	-
IFN- γ	Th1	Aktivierung von Th1 und Mac, Hemmung von Th2	-	-

Tab. 1.1 Übersicht über Entzündungsmediatoren und Zytokine, ihre Quellen und Effekte in Bezug zur allergischen Rhinitis. Die Angaben in Bezug auf die Früh- und Spätphase der allergischen Reaktion beziehen sich auf deren Nachweis in der menschlichen Nase.

Legende: T-Lymphozyten (T), T-Helfer-Lymphozyten Typ 1 (Th1), T-Helfer-Lymphozyten Typ 2 (Th2), B-Lymphozyten (B), Eosinophile Granulozyten (Eos), Basophile Granulozyten (Baso), Neutrophile Granulozyten (Neutro), Mastzellen (Mz), Gefäßendothel (Endo), Makrophagen (Mac), Epithelzellen (Epi), Dendritische Zellen (DC)

1.6 Der Primingeffekt

Im Verlauf der Allergensaison kommt es zu einer Zunahme der Reaktivität der Nasenschleimhaut gegenüber dem Allergen. Diese Beobachtung konnte erstmals 1969 durch Connell verifiziert werden. Er prägte für dieses Phänomen den Namen „Primingeffekt“. In seinen Studien konnte der Autor demonstrieren, dass sich diese spezifische Form der nasalen Hyperreaktivität auch durch wiederholte nasale Provokation mit Pollen induzieren ließ (Connell, J.T. 1969).

Mögliche Ursachen im Bereich der Endorgane wären eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, vermehrte Füllung der venösen Sinusoide oder eine Steigerung der Sekretion der mucösen Drüsen.

Die genauen Vorgänge auf zellulärer oder molekularer Ebene in der Nasenschleimhaut waren Connell damals nicht bekannt und sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Ein verstärkter Einstrom von Entzündungszellen und eine gesteigerte Mediatorausschüttung, aber auch eine Destruktion der Schleimhautbarriere durch den Entzündungsprozeß werden diskutiert (Naclerio, R.M. 1988). Eine Studie von Wang et al. 1995 zeigte, dass der Vergleich zwischen Mediatorkonzentrationen während einer experimentell erzeugten Spätphase und natürlicher Pollenexposition während der Saison ähnliche Ergebnisse ergab. Es scheint demnach, dass sich die Nasenschleimhaut während der Allergensaison in einem Zustand chronischer Entzündung im Sinne von aneinandergereihten Spätphasen befindet, der möglicherweise die spezifische Hyperreaktivität im Sinne des Priming erklären könnte (Wang, D. et al. 1995; Wang, D. et al. 1994).

Neben einer spezifischen Entzündung mit einflussnehmenden Zellen, Mediatoren und Zytokinen könnte eine Steigerung neuronaler Reflexbögen oder Ausschüttung von Neuropeptiden ebenso eine Rolle spielen.

1.7 Neurogene Mechanismen

Im Rahmen der allergischen Reaktion kommt es auch zu einer Aktivierung sensorischer Nervenfasern, was bereits durch die Symptomatik dieser Erkrankung, z.B. den Juckreiz der Nase, offensichtlich ist. Aus Mastzellen freigesetztes Histamin bindet an H1-Rezeptoren auf sensorischen, nicht-myelinisierten C-Fasern, die in großer Zahl in und unter dem Epithel der Nasenschleimhaut zu finden sind. Die Aktivierung dieser Fasern, die über den N. trigeminus weitergeleitet wird, führt einerseits zur Wahrnehmung des Juckreizes, andererseits aber auch zur Induktion reflektorischer Mechanismen, die das Niesen einschließen.

Zusätzlich entsteht ein bidirektionaler Impuls als sogenannter Axon-Reflex zur Ausschüttung von Neuropeptiden wie Substance P (SP), Neurokinin A (NKA) und Calcitonin-Gen-Related-Peptide (CGRP). Diese efferente Antwort wird von parasympathische Fasern über das Ganglion sphenopalatinum vermittelt und stimuliert die sekretorischen Drüsen der Nasenschleimhaut. Es werden Acetylcholin (ACH) und Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) ausgeschüttet. Die Neuropeptide aktivieren Endothelzellen und Leukozyten und tragen so zur allergischen Entzündung bei (Rucci, L. et al. 1989, Mosimann, B.I. et al. 1993). Eine Übersicht dieser Mechanismen ist in Abb. 1.3 dargestellt.

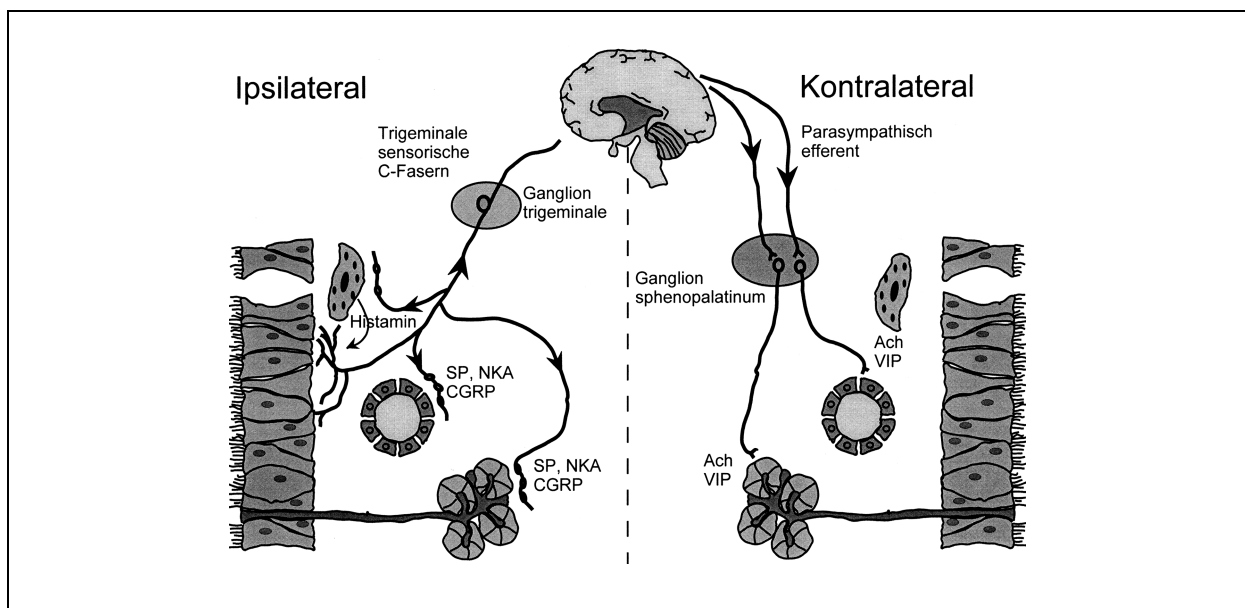


Abb. 1.3: Übersicht neurogene Mechanismen und Neuropeptide
 Legende: Substance P (SP), Neurokinin A (NKA), Calcitonin-Gen-Related-Peptide (CGRP),
 Acetylcholin (ACH), Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)

1.8 Fragestellung

Wir untersuchten die Hypothese, dass dem Primingeffekt eine gesteigerte Produktion von Mediatoren und Zytokinen als Ausdruck einer verstärkten Entzündungsreaktion zu Grunde liegt.

- Wir haben uns dabei folgende Fragen gestellt:
- Lässt sich Priming experimentell reproduzieren?
- Führt Priming zu einer gesteigerten Mediator- und Zytokinfreisetzung?
- Gibt es Unterschiede zwischen der Früh- und der Spätphase?
- Sind Reflexe und neuronale Mechanismen mitbetroffen?

2. Material und Methoden

2.1 Probandenauswahl

Für die Studie wurden 12 Probanden mit einer saisonalen allergischen Rhinitis ausgewählt. Die folgenden Kriterien mussten für die Teilnahme erfüllt werden:

- anamnestisch jahreszeitlich abhängige Beschwerden, wie starke Sekretion der Nase, Niesreiz und behinderte Nasenluftpassage,
- positiver Prick-Test für mindestens ein saisonales Allergen
- negativer Prick-Test für perenniale Allergene

Die 6 männlichen und 6 weiblichen Probanden mit einem Alter von 19 bis 29 Jahren waren zur Zeit der Versuche (außerhalb der Saison) asymptomatisch und nahmen seit mindestens 4 Wochen keine antiallergischen Medikamente, wie Antihistaminika und Glukokortikosteroide ein. Keiner der 12 Probanden hat die Studie vorzeitig abgebrochen. Es traten keine Komplikationen auf. Alle 12 Probanden wurde vor Beginn der Studie über die möglichen Risiken und Komplikationen einer nasalen Provokation aufgeklärt und haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt.

2.2 Versuchstermine

Die Probanden wurden an 4 unterschiedlichen Terminen einbestellt. Der erste Versuchstag (T0) fand mindestens 14 Kalendertage vor dem zweiten (T1), dritten (T2) und vierten (T3) Versuchstag statt. Die Versuchstage T1, T2 und T3 fanden an drei aufeinanderfolgenden Tagen statt.

Die 14tägige Pause wurde eingelegt, um das physiologische Milieu der Schleimhäute von Nase, Rachen, Augen, etc. wieder herzustellen und die Reproduzierbarkeit der Provokationen zu überprüfen. Dieser zeitliche Ablauf wurde gewählt, da Wachs mit den gleichen Abständen zwischen den Provokationen sowohl eine Reproduzierbarkeit zwischen T0 und T1 als auch einen Primingeffekt an T1-T3 nachweisen konnte (Wachs, M. et al. 1989)

Zeitliche Abfolge der Termine:

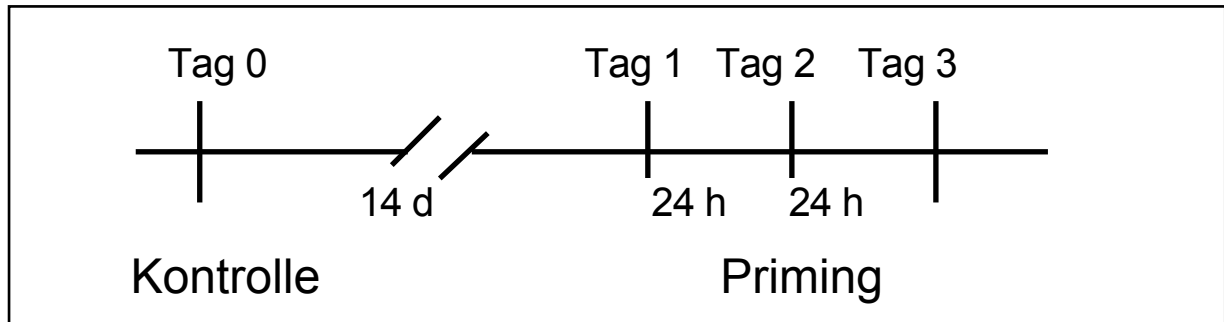


Abb. 2.1 Terminabfolge der Provokationstage

2.3 Nasale Provokation mit der Disc-Methode

2.3.1 Allergen

An allen Versuchstagen wurden mit der Disc-Methode nasale Allergenprovokationen durchgeführt. Zur Allergenprovokation wurden Allergenlösungen in drei verschiedenen Konzentrationen (5000 BE/ml, 25000 BE/ml, 50000 BE/ml) verwendet. Die Kontrollprovokationen wurden mit dem entsprechenden Lösungsmittel (Physiologische Kochsalzlösung mit 0,4% Phenol) durchgeführt.

Jeder Proband wurde an allen vier Versuchstagen zunächst mit dem Lösungsmittel und anschließend mit drei ansteigenden Konzentrationen desselben Allergens provoziert. Zu Beginn des ersten Versuchstages wurde zur Ermittlung der besser belüfteten Nasenhaupthöhle eine anterioren Rhinomanometrie durchgeführt. Die ermittelte Seite wurde als Provokationsseite ausgewählt und über die ganze Versuchsdauer beibehalten. Die Probanden wurden mit dem jeweils relevanten Allergenen provoziert. Zum Einsatz kamen Birke-, Hasel-, Gräser- und Beifuß-Allergene (lyophilisierte Testallergene, Lösungsmittel für lyophilisierte Testallergene, Allergopharma, Joachim Ganzer, Reinbek).

2.3.2 Disc-Applikation und Sekretsammlung

Zur Applikation der Allergene und zur Sammlung der gebildeten Sekrete wurden Discs verwendet. Sie wurden hergestellt, indem aus Filterpapier (Shandon filter cards thick, Shandon Inc., Frankfurt) kreisrunde Scheibchen mit einem

Durchmesser von 10 mm und einer Dicke von 1 mm gestanzt wurden. Die Reproduzierbarkeit dieser Technik zur Bestimmung der Sekretgewichte wurde bereits in mehreren Studien belegt (Baroody, F.M.; et al. 1993, Malmberg, H.; et al. 1989).

Die folgende Grafik zeigt die zeitliche Abfolge der nasalen Provokation mit Provokations- und Kollektionsdisc (Abb. 2.2).

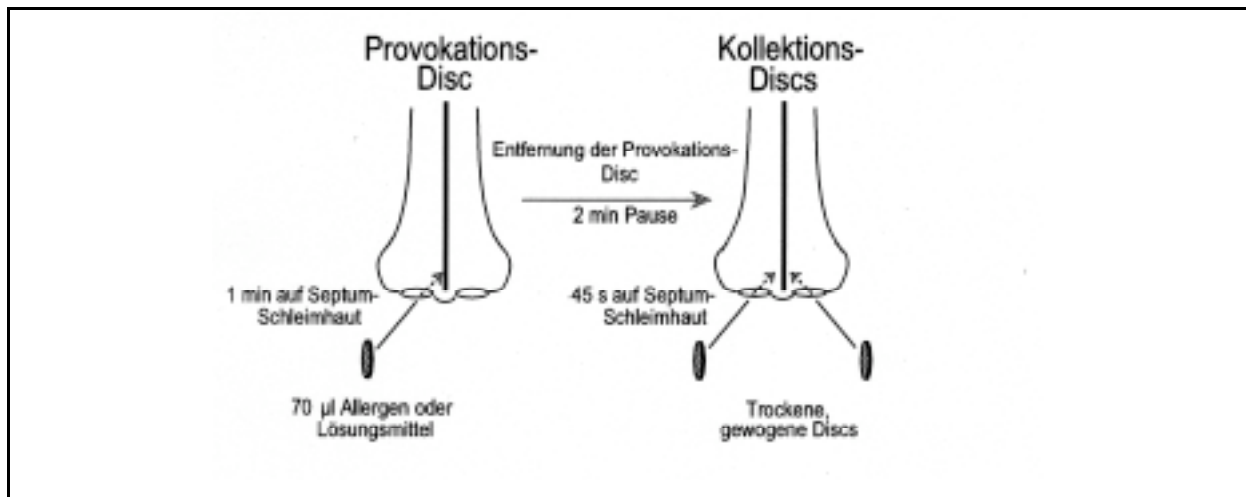


Abb. 2.2 Darstellung der Discapplikation

Provokationsdisc: Auf die Provokationsdisc wurde 70 µl Lösungsmittel, bzw. Allergenlösung pipettiert. Dieses Volumen liegt knapp unterhalb der maximalen Aufnahmemenge von Flüssigkeit durch die Filterpapier-Disc, die in vorangegangenen Studien ermittelt wurde. Dann folgte die unilaterale Applikation der Disc unter rhinoskopischer Kontrolle mit einer Hechtmaulzange auf den anterioren Anteil des Nasenseptums dorsal der mukokutanen Grenze.

Die Disc wurde für 1 Minute auf der Schleimhaut belassen und danach verworfen. Sowohl die Lösungsmittelprovokation, als auch die Allergenprovokationen fanden immer auf derselben Seite statt, um eine streng einseitige Provokation zu erreichen.

Zur Allergenprovokation wurden die folgenden Allergenmengen benutzt:

Ag 1 Allergenkonzentration 5.000 BE/ml entspricht 350 BE/Provokation (70 µl)

Ag 2 Allergenkonzentration 25.000 BE/ml entspricht 1750 BE/Provokation (70 µl)

Ag 3 Allergenkonzentration 50.000 BE/ml entspricht 3500 BE/Provokation (70 µl)

Kollektionsdiscs: Das Nasensekret wurde gesammelt, indem beidseits Kollektionsdiscs appliziert wurden. Jede Disc wurde einzeln in einem Plastikröhrchen mit Schraubdeckel aufbewahrt. Die Kombination aus Disc und Plastikröhrchen wurde vor und nach Applikation auf die Nasenschleimhaut gewogen (Mettler Analysewaage, Mettler-Toledo-AG, Schweiz). Durch Subtraktion des Ausgangsgewichtes vom ermittelten Gewicht nach Sammlung des Nasensekretes wurde die Quantifikation des gesammelten Nasensekretes ermöglicht.

Dazu wurde jeweils eine Disc auf dieselbe Stelle des Septums und das korrespondierende Areal der Gegenseite gelegt. Die Discs wurden unmittelbar nacheinander immer in der gleichen Reihenfolge eingelegt und für 45 Sekunden auf der Nasenschleimhaut belassen. In dieser Zeit nahmen die Discs das produzierte Nasensekret auf. Danach wurden die Discs wieder entfernt und zurück in das dazugehörige Röhrchen gelegt.

2.3.3 Disc-Weiterverarbeitung

Zu den Discs wurde anschließend 1250 µl physiologische NaCl-Lösung (0,9%) pipettiert. Die Röhrchen wurden vor der Weiterverarbeitung bei 4° C für 3 h bis 5 h aufbewahrt. Dadurch wurde das Herauslösen des von den Discs aufgenommenen Sekretes in die NaCl-Lösung gewährleistet, was ebenfalls in vorherigen Studien mit der Disc-Methode experimentell überprüft wurde.

Die Disc-Weiterverarbeitung wird in der folgenden Grafik zusammengefasst (Abb. 2.3).

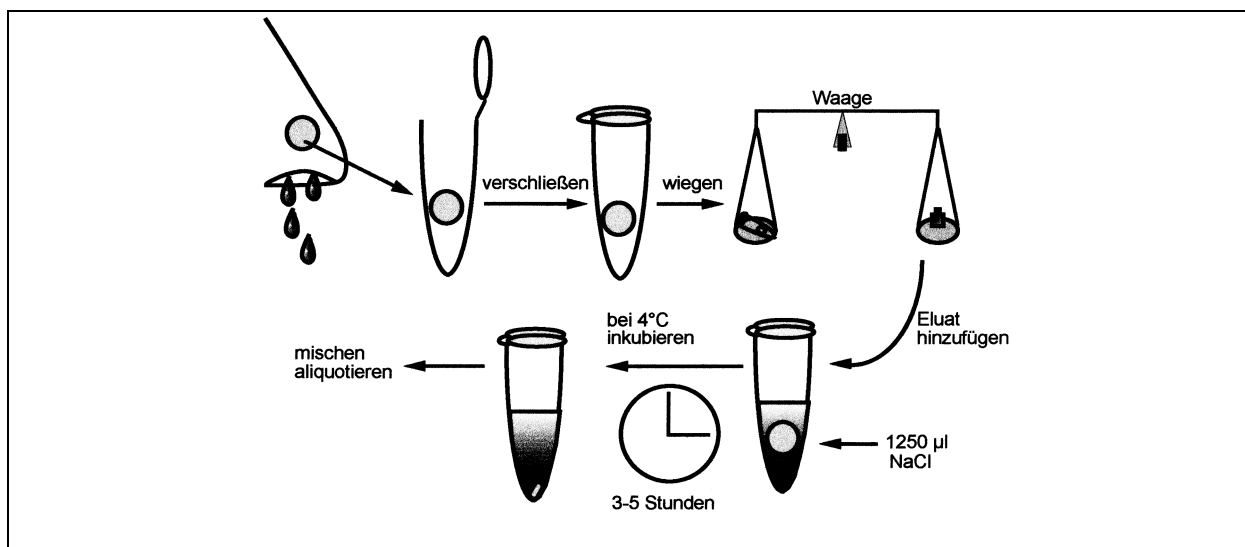


Abb. 2.3 Disc-Weiterverarbeitung

Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben 10 s lang auf einem Schüttelmischer durchmischt. Nach Pressen der Discs auf den Boden der Röhrchen, wurden fünf 250 µl-Aliquots hergestellt, d.h. die Menge aus je einem Röhrchen wurde auf 5 Eppendorf-Röhrchen verteilt. Danach wurden die Aliquots bei -80° C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Die Discs zur Messung der Frühphase B1-L1 nach Allergenprovokation wurden getrennt gesammelt und weiterverarbeitet. Die Discs zur Messung der Spätphase L2-L7 wurden, nach getrennter Bestimmung des Sekretgewichts, paarweise in einem Röhrchen mit doppelter Menge der NaCl-Lösung gelöst und zusammen weiterverarbeitet, um die mögliche Konzentration von Mediatoren und Zytokinen für den nachfolgenden ELISA-Assay zu erhöhen.

2.4 Lavage

Die nasale Lavage erfolgte zur Gewinnung von zytologischem Material aus der Nasenschleimhaut und zur Säuberung der Nasenhaupthöhle, um zu Beginn jeder Provokation gleiche Bedingungen zu gewährleisten.

Zwischen der Bestimmung der Basiswerte B1 und B2 wurden jeweils fünf Nasenlavagen mit 10 ml (5 ml pro Nasenloch) physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Dazu wurde dem Probanden bei leicht überstrecktem Kopf und unter Verschluss des Gaumensegels, die in einer 10 ml Spritze befindliche Kochsalzlösung in beide Nasenlöcher appliziert. Die Probanden wurden gebeten, die in der Nase behaltene Flüssigkeit mit nach vorne gebeugten Kopf in einen Becher laufen zu lassen. Die Lavageflüssigkeit wurde gesammelt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Zur Untersuchung der Zellen, die mit der Lavage gesammelt wurden, wurde eine Zellsuspension hergestellt. Dazu wurde das Sekret bei 1200g/10min/4°C zentrifugiert (Omnifuge 2.ORS, Heraeus, Hanau), der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl NaCl-Lösung resuspendiert. Die Anzahl der Zellen wurde nach einer Trypanblaufärbung mikroskopisch bestimmt (Durchlicht Photomikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen). Nach Einstellung der Zellzahl der Suspension wurde zur zytologischen Beurteilung der auf diese Weise gewonnenen Zellen ein Cytospin angefertigt (Zytozentrifuge Cytospin 3, Shandon Inc., Frankfurt) und nach Pappenheim gefärbt. Dazu erfolgte zunächst das Eintauchen in May-Grünwald-Lösung (5 min), anschließend nach Spülung mit Aqua dest. eine 20minütige Färbung in Giemsa-

Lösung mit anschließender Lufttrocknung. Unter dem Lichtmikroskop (Durchlicht Photomikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen) wurden mononukleäre Zellen (Makrophagen, Lymphozyten) neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten basophile Granulozyten und Epithelzellen nach zytologischen Kriterien ausgezählt.

2.5 Symptomerfassung

Zu jedem Messzeitpunkt wurden die Probanden aufgefordert, die Wahrnehmung ihrer Symptome in einem Symptomscore anzugeben. Dazu wurde eine visuelle Analogskala benutzt, um die subjektiv empfundene Stärke der

1. Nasensekretion,
2. Nasenobstruktion und
3. Juckreiz in Nase, Ohren, Rachen und Augen

zu erfassen. Die Auswertung erfolgte in cm.

Außerdem wurde die im vorhergehenden Zeitintervall erfolgte Anzahl des Niesens dokumentiert (Symptomscore siehe Anhang).

2.6 Rhinomanometrie

Zu allen Messzeitpunkten wurde der nasale Flow beidseits bei 150 Pa in ccm/s durch eine anteriore Rhinomanometrie bestimmt (Rhinomanometer A 310, Atmos, Medizin Technik GmbH & Co. KG, Lenzkirch). Bei der so durchgeführten Messung des nasalen Flow kommt es zu einer Abnahme des gemessenen Volumens, sobald in der Nase der Atemwegswiderstand durch reaktive Schleimhautschwellung ansteigt.

2.7 Versuchsablauf

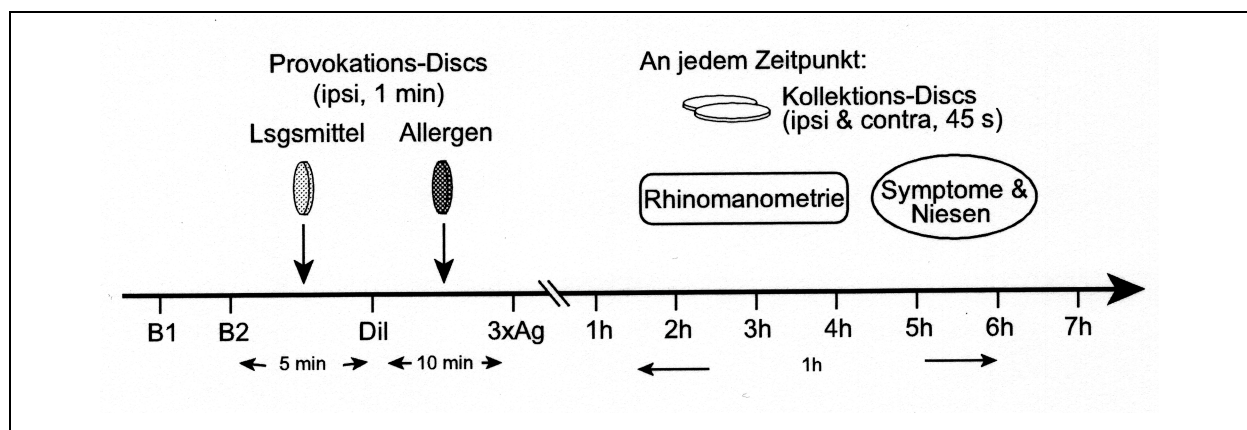


Abb. 2.4 Darstellung des Versuchsablaufes

Tag 0-3:

30minütige Adaptierung der Probanden an das Raumklima,

Rhinoskopische Inspektion der Nase, sanftes Naseputzen

Basiswert 1 (B1):

Bilaterales Einbringen von Kollektionsdiscs, Bestimmung des Sekretgewichts

Nasenlavage (Zytologie)

5 min Pause

Basiswert 2 (B2):

Bilaterales Einbringen von Kollektionsdiscs, Bestimmung des Sekretgewichts

5 min Pause mit Erfassung des Symptomscore und Durchführung einer anterioren Rhinomanometrie

Lösungsmittelprovokation:

Unilaterale Lösungsmittelprovokation mit Disc-Methode

2 min Pause

Bilaterales Einbringen von Kollektionsdiscs, Bestimmung des Sekretgewichts, Erfassung des Symptomscore, Durchführung einer anterioren Rhinomanometrie

10 min Pause

Allergenprovokation, Erfassung der Frühphase:

Unilaterale Allergenprovokation mit Disc

2 min Pause

Bilaterales Einbringen von Kollektionsdiscs, Bestimmung des Sekretgewichts, Erfassung eines Symptomscore, Durchführung einer anterioren Rhinomanometrie

10 min Pause

Dreimaliges Durchführen o.g. Protokolls mit ansteigender Allergenkonzentration

Erfassung der Spätphase (nur Tage 1-3):

Bis zur 7. Stunde nach dem letzten Allergenkontakt stündliche Durchführung von Folgemessungen:

Bilaterale Einlage von Kollektionsdiscs, Bestimmung des Sekretgewichts, Erfassung des Symptomscore, Durchführung einer anterioren Rhinomanometrie

2.8 Kontrollen

Zusätzlich zur Kontrolle durch die Lösungsmittelprovokation an jedem Versuchstag wurden vier der an der Studie teilnehmenden Probanden nach einem mindestens 14tägigen Abstand nach der letzten Allergenprovokation zu einer Kontrollprovokation einbestellt. Dabei wurde wiederum an drei aufeinanderfolgenden Tagen die vollständige Provokation einschließlich der Nasenlavage durchgeführt, wobei sämtliche Allergenprovokationen durch Lösungsmittel ersetzt wurden. Erneut wurden Sekretgewicht, Symptomscore, Anzahl des Niesens und Nasenwiderstand erfasst. Hierbei wurde nur die Frühphase untersucht.

2.9 Mediator- und Zytokinbestimmung mit ELISA

Die Messungen der Mediator- und Zytokinkonzentrationen wurden mittels ELISA-Technik (Enzyme-Linked-Immuno-Assay) durchgeführt.

Dazu wurden die Aliquots nach dem Auftauen auf Zimmertemperatur (ca. 20°C) direkt in den entsprechenden Assay pipettiert. Aufgetautes Material wurde sofort weiterverarbeitet und nicht wieder eingefroren. Es wurden kommerziell erhältliche ELISA-Kits mit den entsprechenden Standardkurven nach Angaben der Hersteller zur Bestimmung folgender Parameter eingesetzt:

Name	Hersteller	Nachweisgrenze
Histamin	Histamin Immunotech, Hamburg	0,2 nM
ECP	UniCAP ECP Pharmacia & Upjohn, Uppsala, Schweden	2 µg/l
IL-4	human IL-4 Quantikine HS (HS 400) R&D Systems, Oxon, Großbritannien	0,9 pg/ml
IL-5	Interleukin-5 Milenia (MKL 5 1) DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim	1,5 pg/ml

Tab. 2.1 Liste der verwendeten ELISA-Kits

Es handelt sich bei allen ELISA-Kits um sogenannte Sandwichassays. Ein an eine feste Phase (Mikrotiterplatte) gebundener monoklonaler Antikörper bindet das gesuchte Antigen. Nach mehreren Zwischenschritten erfolgt die Zugabe eines enzymkonjugierten polyklonalen Antikörpers. Dieser bindet an das vorher gebundene Antigen. Nach Zugabe eines sich verfärbenden Substrates kann die Intensität der Färbung photometrisch gemessen werden (Photometer, Programm Easy-Fit, Version 7.16, SLT-Labinstruments, Crailsheim). Die Extinktion erlaubt durch einen Vergleich mit der Standardkurve die Errechnung der Konzentration. Alle Zytokin- und Mediatorenmessungen wurden als Doppelbestimmungen und mit Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt.

2.10 Konzentrationsbestimmung pro Disc

Die absolute Masse der Mediatoren und Zytokine pro Disc wurde nach folgender Formel bestimmt.

Vor der Umrechnung wurde die Konzentrationseinheit der Histaminmessung von Mol über das spezifische Gewicht von 111 g/mol in µg umgerechnet. Die Angaben erfolgten bei Histamin in µg, bei ECP, IL-4 und IL-5 in pg.

$$m_D = c \cdot (V_D + V_E)$$

m_D : Masse Mediator/Zytokin (pro Disc)

c : Zytokinkonzentration im Assay

V_D : Volumen Nasensekret

V_E : Volumen Eluat (1250 µl)

2.11 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software StatView (Version 5. SAS Institute Inc., Cary, NC., USA) auf einem PC durchgeführt.

Alle numerischen Daten sind, soweit nicht anders angegeben, als Mittelwert (MW) $\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) dargestellt, um eine Einschätzung der Variabilität der Daten zu ermöglichen.

Soweit nicht gesondert angegeben, wurden nicht-parametrische statistische Verfahren angewandt. Gepaarte, stetige Daten wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Effekt der einmaligen Allergenprovokation

Die folgenden Darstellungen stellen die Einzelwerte des ersten Provokationstages (T1) dar. Zu diesem Zeitpunkt lag noch kein Priming-Effekt vor.

Diese Art der Auswertung zeigt den Effekt der Allergenprovokation auf den Verlauf der Symptomparameter sowie der Konzentrationen der Mediatoren und Zytokine. In einem gemeinsamen Diagramm können Früh- und Spätphase verglichen werden. Während zwischen den Zeitpunkten der Basiswerte, Lösungsmittel- und Allergenprovokationen nur wenige Minuten liegen, muss beachtet werden, dass in der Spätphase jeweils eine Stunde Zeit zwischen den Messungen vergangen ist.

Die untersuchten Parameter zu allen Zeitpunkten wurden zur statistischen Auswertung mit dem Zeitpunkt B2 verglichen. Der Basiswert B2 bezeichnet die Sammlung des Nasensekretes nach der nasalen Lavage.

Zur Konzentrationsmessung des Mediators ECP und der Zytokine IL4- und IL-5 wurde das gesammelte Nasensekret der Zeitpunkte L2 und 3, L4 und 5 sowie L6 und 7 zusammen in der doppelten Menge NaCl-Lösung gelöst und im ELISA bestimmt.

3.1.1 Symptomscore

Die Symptomscores zeigten einen signifikanten Anstieg unmittelbar nach der Allergenprovokation und blieben bis 2h nach der Provokation erhöht (Tab. + Abb. 3.1).

	MW	SEM	p
B2	3,0	0,6	
Dil	2,6	0,6	0,33
Ag1	8,5	1,6	0,022
Ag2	12,2	1,3	0,022
Ag3	15,2	1,5	0,022
L1	5,9	1,1	0,006
L2	5,1	1,1	0,022
L3	3,9	0,9	0,17
L4	4,6	0,9	0,17
L5	3,5	0,6	0,31
L6	2,5	0,5	0,12
L7	2,4	0,4	0,35

Tab. 3.1 Symptomscore

Mittelwerte und SEM der Summen des Symptomscores (in cm) von T1 verglichen mit dem Basiswert B2

Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

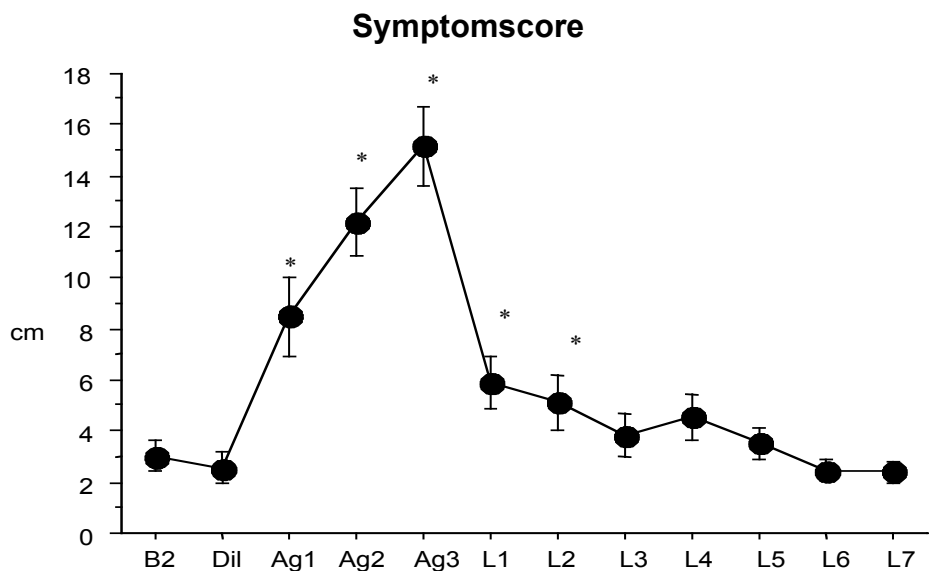


Abb. 3.1 Zeitlicher Verlauf des Symptomscores (cm) an T1

3.1.2 Niesen

Die Allergenprovokationen induzierten ebenso eine signifikant erhöhte Anzahl des Niesens in der Frühphase der Reaktion (Tab. + Abb. 3.2). In den Stunden nach Provokation fand sich keine signifikante Änderung mehr.

	MW Anzahl	SEM	p
B2	0,1	0,1	
Dil	0,2	0,2	0,66
Ag1	2,8	1,0	0,018
Ag2	1,8	0,6	0,021
Ag3	2,3	0,7	0,021
L1	0,3	0,2	0,18
L2	0,5	0,3	0,18
L3	0,3	0,3	0,42
L4	0,2	0,1	n.b.
L5	0,2	0,1	0,59
L6	0,3	0,1	0,23
L7	0,3	0,2	0,42

Tab. 3.2 Niesen

Mittelwerte und SEM der Anzahl des Niesens von T1
verglichen mit dem Basiswert B2

Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

n.b. = nicht berechenbar

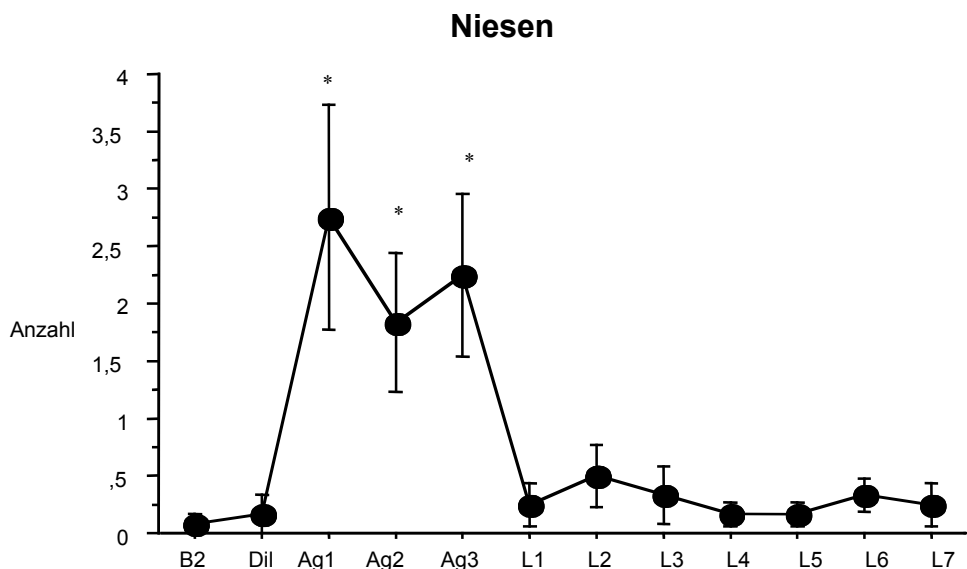


Abb. 3.2 Zeitlicher Verlauf der Anzahl des Niesens an T1

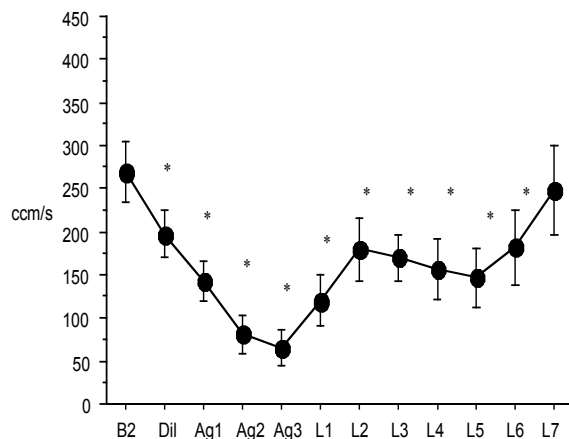
3.1.3 Nasaler Flow

Der rhinomanometrisch bestimmte nasale Flow fiel ebenfalls in der Auswertung von T1 nicht nur ipsi- sondern auch kontralateral signifikant ab. Ipsilateral reicht er noch lange in die Spätphase hinein. Auch die Lösungsmittelprovokation löste ipsilateral einen signifikanten Flowabfall aus (Tab. + Abb. 3.3).

	ipsilateral			kontralateral		
	MW	SEM	p	MW	SEM	p
B2	270	25		375	62	
Dil	199	26	0,022	331	55	0,61
Ag1	142	24	0,0037	243	47	0,0033
Ag2	81	22	0,0022	294	64	0,0058
Ag3	65	21	0,0022	198	31	0,0051
L1	120	30	0,006	266	42	0,041
L2	180	36	0,040	261	29	0,108
L3	170	27	0,034	297	28	0,092
L4	156	35	0,041	297	28	0,158
L5	147	34	0,023	266	29	0,023
L6	182	42	0,029	311	51	0,031
L7	248	51	0,722	248	21	0,041

Tab. 3.3 Nasaler Flow
Mittelwerte und SEM des nasalen Flow ipsi- und kontralateral (in ccm/s) von T1 verglichen mit dem Basiswert B2
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test,
Signifikanzniveau: 5%

Nasaler Flow ipsilateral



Nasaler Flow kontralateral

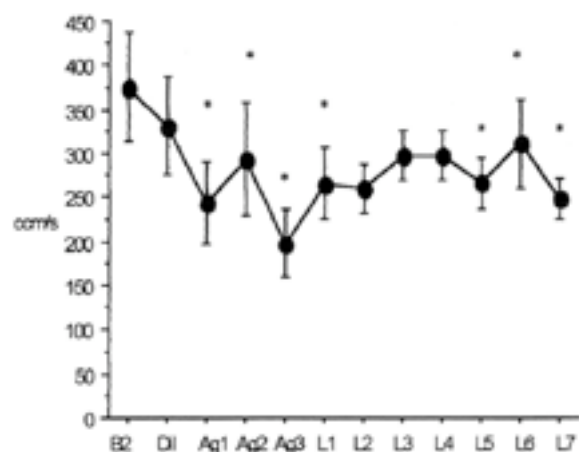


Abb. 3.3

Zeitlicher Verlauf des nasalen Flows (ccm/s) ipsi- und kontralateral an T1

3.1.4 Sekretgewicht

Durch die Allergenprovokation zeigte sich auch beim Sekretgewicht ein beidseitiger signifikanter Anstieg des Sekretgewichtes nach den drei Allergenprovokationen in der Frühphase. Während der Spätphase ist keine vermehrte Sekretproduktion mehr nachzuweisen. Der kontralaterale Anstieg der Sekretproduktion ist jedoch geringer als ipsilateral (Tab. + Abb. 3.4).

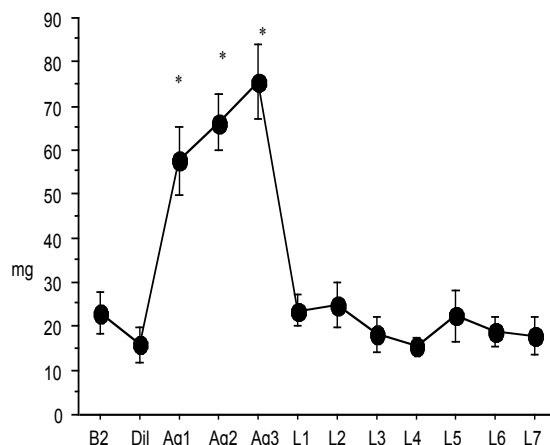
	ipsilateral			kontralateral		
	MW	SEM	p	MW	SEM	p
B2	23,0	4,6		15,3	3,3	
Dil	18,8	3,9	0,31	11,9	2,2	0,18
Ag1	57,4	7,7	0,012	37,0	7,0	0,012
Ag2	66,2	6,2	0,0047	41,2	7,6	0,0076
Ag3	75,5	8,5	0,0047	34,6	6,4	0,019
L1	23,6	3,6	0,64	11,6	1,7	0,18
L2	28,9	5,3	0,69	15,6	3,8	0,75
L3	18,2	3,9	0,58	13,3	2,1	0,69
L4	15,6	1,7	0,16	9,9	1,7	0,13
L5	22,3	6,0	0,69	10,8	1,8	0,39
L6	18,6	3,3	0,48	9,0	1,1	0,075
L7	17,9	4,1	0,43	12,7	2,5	0,64

Tab. 3.4 Sekretgewichte

Mittelwerte und SEM des Sekretgewichtes ipsi- und kontralateral (in mg) von T1 verglichen mit dem Basiswert B2

Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test,
Signifikanzniveau: 5%

Sekretgewicht ipsilateral



Sekretgewicht kontralateral

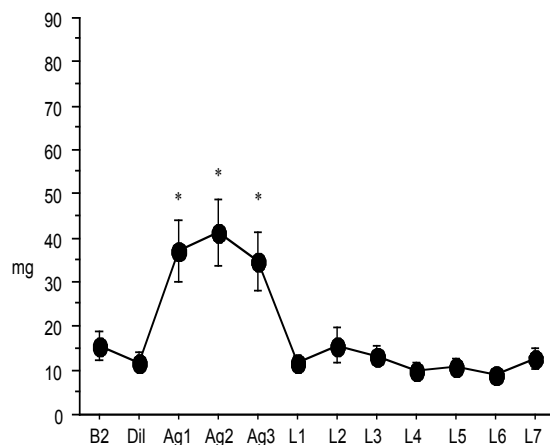


Abb. 3.4

Zeitlicher Verlauf des Sekretgewichtes pro Disc (mg) ipsi- und kontralateral an T1

3.1.5 Histamin

Auch die Auswertung des Mediators Histamin ergab eine signifikante Steigerung der Konzentration im zeitlichen Zusammenhang zur Allergenprovokation in der Frühphase. Zusätzlich jedoch kommt es zu einem zweiten, deutlich stärkeren Konzentrationsanstieg in der Spätphase (Tab. + Abb. 3.5).

	MW μg	SEM	p
B2	1,08	0,29	
Dil	1,83	0,83	0,58
Ag1	5,37	1,58	0,0022
Ag2	5,87	2,11	0,0037
Ag3	3,52	1,01	0,015
L1	1,46	0,53	0,43
L2/3	5,65	1,29	0,0037
L4/5	18,88	7,55	0,0047
L6/7	17,79	9,57	0,0022

Tab. 3.5 Histamin

Mittelwerte und SEM der Histamin-Konzentration (in μg) von T1 verglichen mit dem Basiswert B2

Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

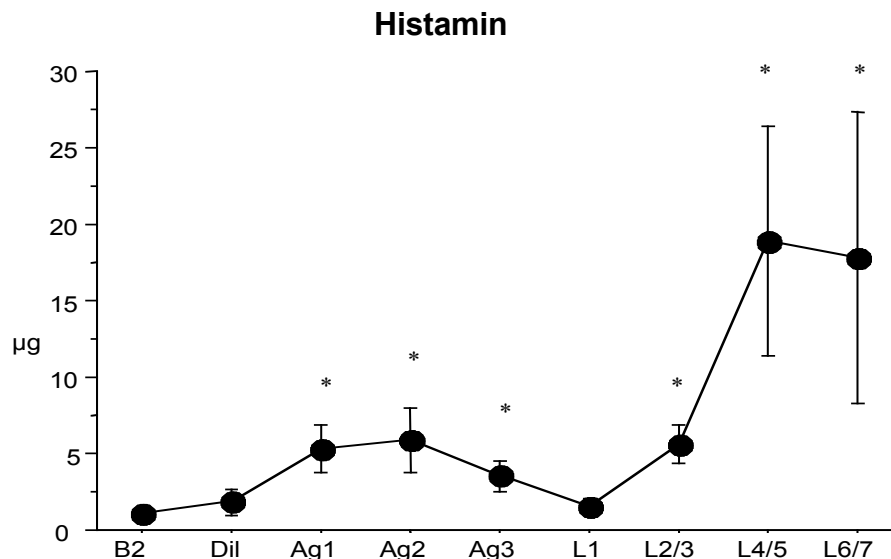


Abb. 3.5 Zeitlicher Verlauf der Histamin-Konzentration (μg) an T1

3.1.6 ECP

Der eosinophilen-assoziierte Mediator ECP zeigte keine signifikante Änderung in der Frühphase während des ersten Provokationstages T1. In der Spätphase ergab sich ein deutlicher Anstieg der ECP-Konzentration mit signifikanten Werten (Tab. + Abb. 3.6).

	MW pg	SEM	p
B2	13,38	5,50	
Ag2	6,62	1,41	0,44
L4/5	148,10	39,34	0,0069
L6/7	122,52	31,35	0,0069

Tab. 3.6 ECP

Mittelwerte und SEM der ECP-Konzentration (in pg) von T1 verglichen mit dem Basiswert B2

Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

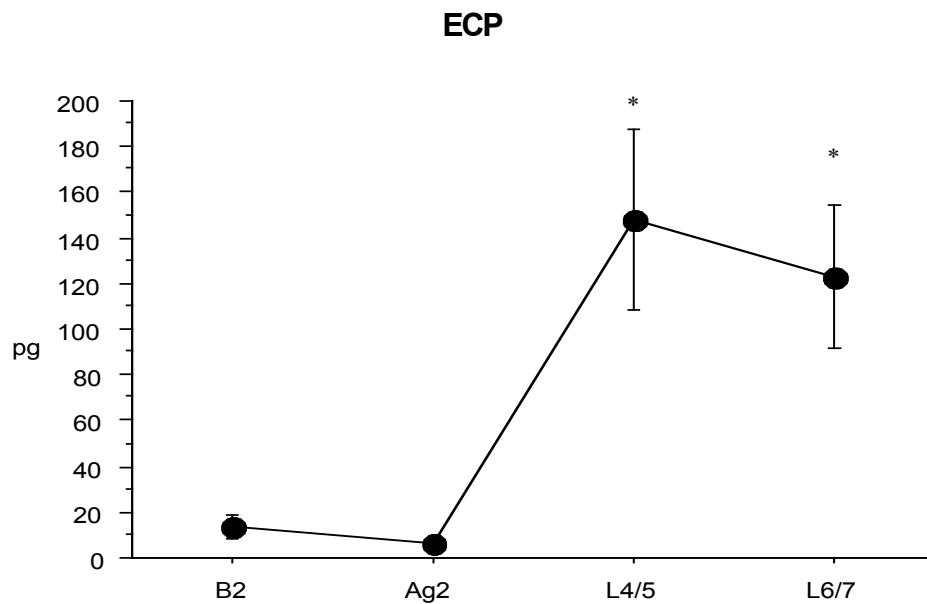


Abb. 3.6 Zeitlicher Verlauf der ECP-Konzentration (pg) an T1

3.1.7 Interleukin-4

Vergleichbar mit ECP ergab die Auswertung von IL-4 ebenfalls keine signifikanten Effekte in der Frühphase, sondern ausschließlich in der Spätphase (Tab. + Abb. 3.7). Hier steigerte sich die nachgewiesene Konzentration auf mehr als das 20fache.

	MW pg	SEM	p
B2	0,28	0,07	
Ag2	0,17	0,01	0,33
L4/5	7,84	2,75	0,022
L6/7	6,67	2,23	0,017

Tab. 3.7 IL-4

Mittelwerte und SEM der IL-4-Konzentration (in pg) von T1 verglichen mit dem Basiswert B2

Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

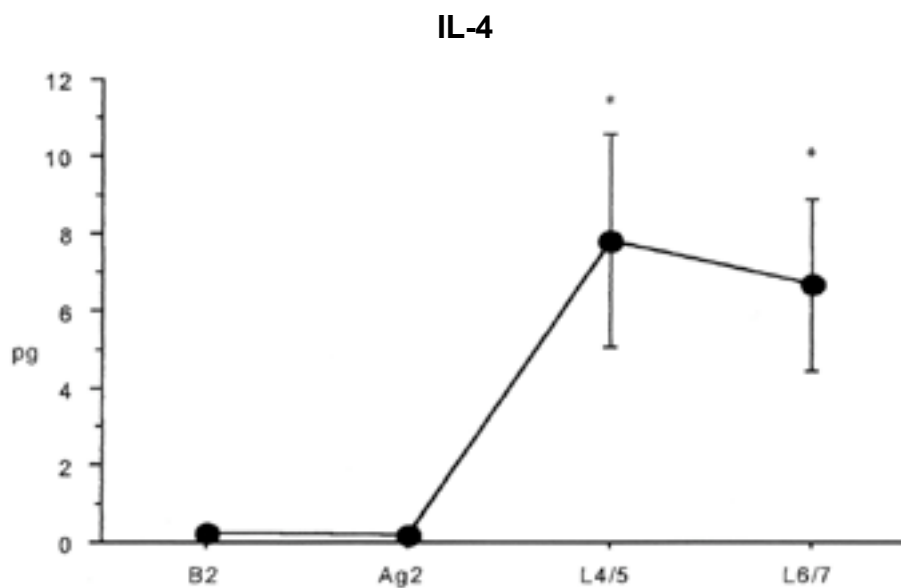


Abb. 3.7 Zeitlicher Verlauf der IL-4-Konzentration (pg) an T1

3.1.8 Interleukin-5

Die nachgewiesenen Konzentrationen von IL-5 weisen deutlich höhere Werte auf als IL-4. Auch zeigt sich ein Anstieg der Konzentration in der Spätphase, der die statistische Signifikanz nicht ganz erreicht (Tab. + Abb. 3.8).

	MW pg	SEM	p
B2	130,5	63,3	
Ag2	199,6	66,1	0,16
L4/5	281,5	78,3	0,18
L6/7	289,7	76,4	0,21

Tab. 3.8 IL-5

Mittelwerte und SEM der IL-5-Konzentration (in pg) von T1
verglichen mit dem Basiswert B2

Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

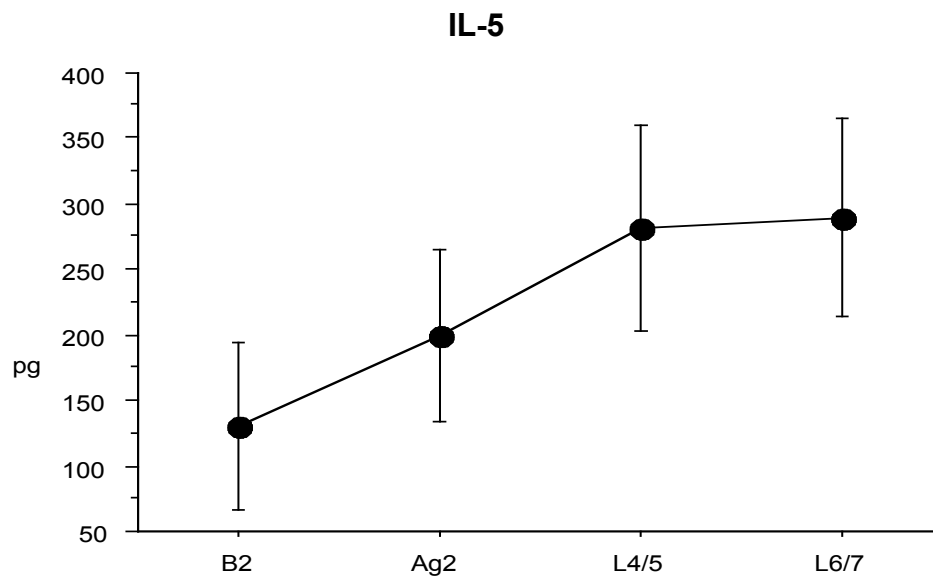


Abb. 3.8 Zeitlicher Verlauf der IL-5-Konzentration (pg) an T1

3.2 Kontrollen

3.2.1 Effekt der Allergenprovokation nach 14tägiger Pause (T0 vs. T1)

Die Allergenprovokationen an den Versuchstagen T0 und T1 wurden mit 14tägigem Abstand durchgeführt. Der Vergleich sollte die Reproduzierbarkeit der ermittelten Daten überprüfen.

Die statistische Auswertung des Symptomscores, der Anzahl des Niesens, des nasalen Flows und des Sekretgewichtes im Vergleich zwischen T0 und T1 ergab keine signifikanten Unterschiede. Das aus der Mediatorengruppe untersuchte Histamin zeigte ebenfalls keine signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen T0 und T1. Auch im Zytospin war der Vergleich der gezählten Zellen nicht signifikant unterschiedlich.

Damit ist bewiesen, dass die Versuchsanordnung reproduzierbare Daten ergeben hat.

Im Folgenden wurde daher auf die weitere graphische Darstellung der Ergebnisse von T0 verzichtet.

3.2.2 Kontrollprovokation

Bei vier der ursprünglich an der Studie teilnehmenden Probanden wurden nach einem mindestens 14tägigen Abstand von den Allergenprovokationen eine Kontrollprovokation ohne Allergen durchgeführt. Dabei wurde entsprechend dem Protokoll an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine einseitige nasale Provokation einschließlich der Nasenlavage durchgeführt, wobei sämtliche Allergenprovokationen durch die Applikation von Lösungsmittel ersetzt wurden. Dieselben Parameter wie bei den Allergenprovokationen wurden erfasst und ausgewertet. Allerdings umfasste die Beobachtungszeit nur die Frühphase nach der Provokation.

In früheren Studien wurden bei einem vergleichbaren Studiendesign auch die 7stündigen Folgemessungen nach einer Kontrollprovokation durchgeführt. Es ergaben sich sowohl für Symptomparameter als auch für Mediator- und Zytokinmessungen keine Effekte. Daher wurde in dieser Studie bei den Kontrollenprobanden auf die Folgemessungen in der Spätphase verzichtet.

Sämtliche Auswertungen der subjektiven und objektiven Symptomparameter sowie der Konzentrationsbestimmungen der Mediatoren und Zytokine zu den Zeitpunkten der drei Kontrollprovokationen ergaben im Vergleich der drei aufeinanderfolgenden Tage keine signifikante Abweichung. Die Abbildungen 3.9-3.15 zeigen die Konzentrationsverläufe der Kontrollprovokationen.

3.2.2.1 Symptomparameter

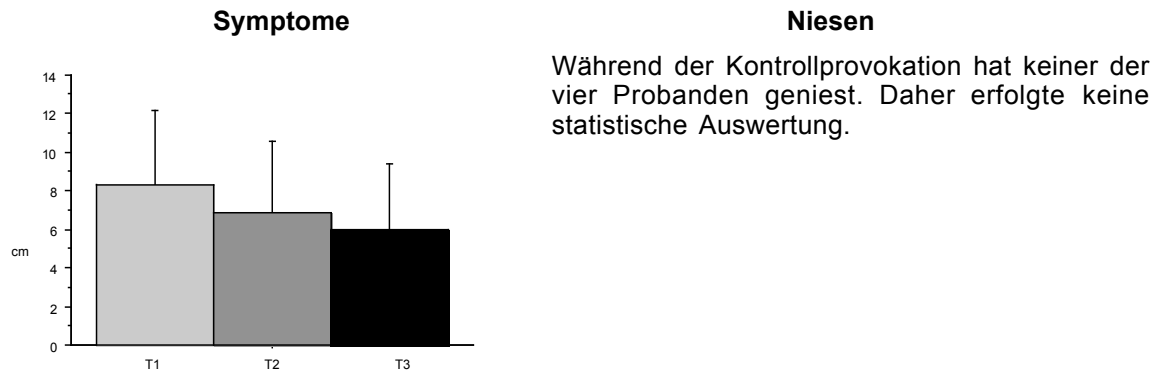


Abb. 3.9 Zeitlicher Verlauf des Symptomscores (cm) Kontrollen

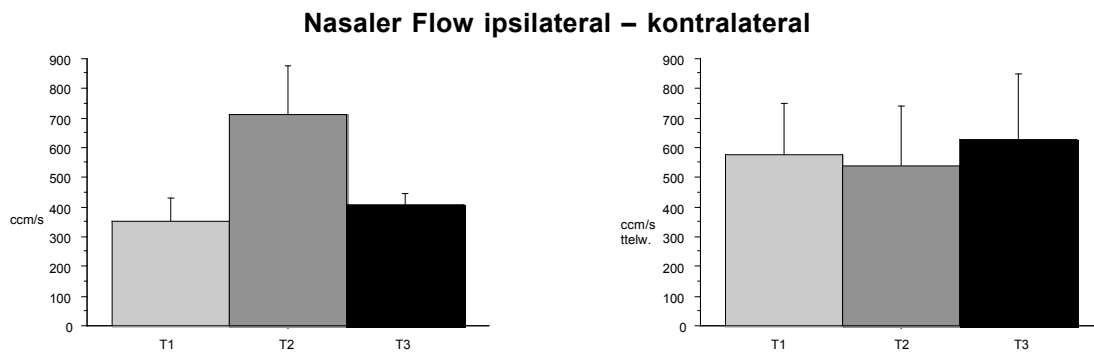


Abb. 3.10 Zeitlicher Verlauf des nasalen Flow (ccm/s) ipsi- und kontralateral Kontrollen

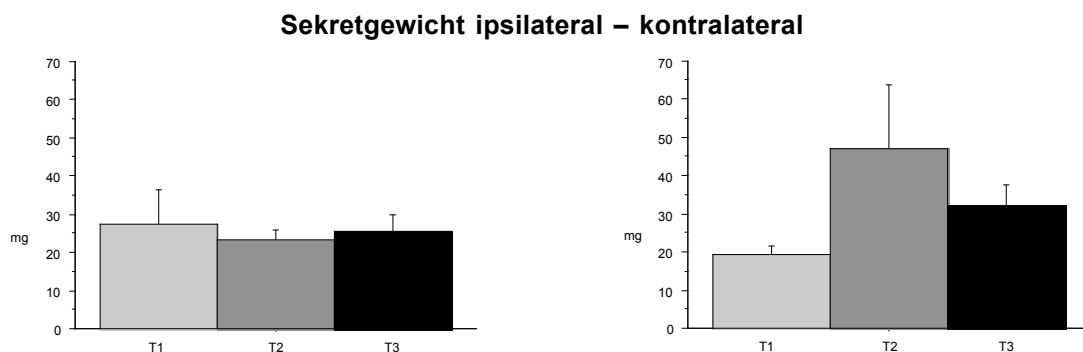


Abb. 3.11 Zeitlicher Verlauf des Sekretgewichtes (mg) ipsi- und kontralateral Kontrollen

3.2.2.2 Mediatoren und Zytokine

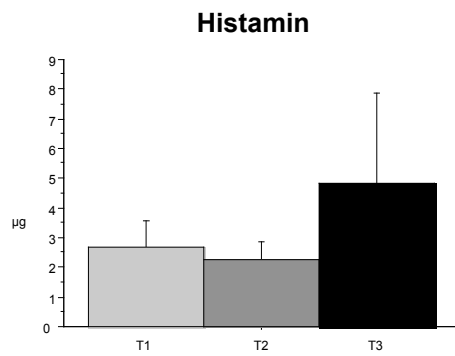


Abb. 3.12 Zeitlicher Verlauf der Histaminkonzentration (µg) Kontrollen

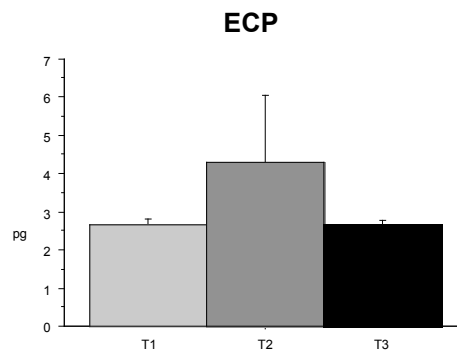


Abb. 3.13 Zeitlicher Verlauf der ECP-Konzentration (pg) Kontrollen

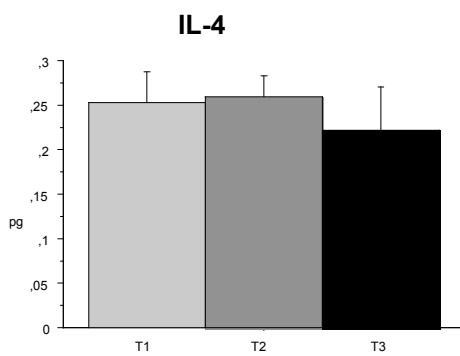


Abb. 3.14 Zeitlicher Verlauf der IL-4-Konzentration (pg) Kontrollen

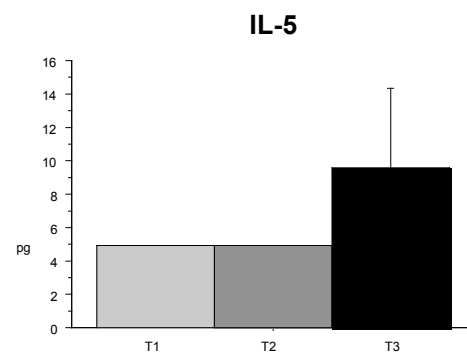


Abb. 3.15 Zeitlicher Verlauf der IL-5-Konzentration (pg) Kontrollen

3.3 Effekt der wiederholten Allergenprovokationen in der Frühphase

3.3.1 Symptomscore

Die Symptomscores in der Frühphase (Summe der Werte Ag1, Ag2 und Ag3) stiegen nach wiederholter Provokation an. Diese Erhöhung erreichte am Tag 3 eine statistische Signifikanz (Tab. 3.9 + Abb. 3.16).

	MW in cm	SEM		p-Wert
T1	35,8	3,99	T1, T2	0,084
T2	43,2	5,29	T1, T3	0,0022
T3	52,8	4,42	T2, T3	0,034

Tab. 3.9 Mittelwerte und SEM der Summen des Symptomscores (in cm) T1-T3 Frühphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

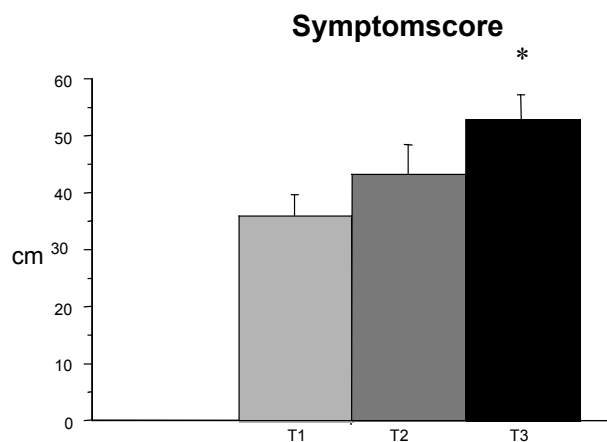


Abb. 3.16 Zeitlicher Verlauf des Symptomscores (cm) Frühphase
von T1, T2, T3

3.3.2 Niesen

Die Anzahl des Niesens stieg kontinuierlich an. Auch hier wurde eine statistische Signifikanz am dritten Tag erreicht (Tab. 3.10 + Abb. 3.17).

	MW Anzahl	SEM		p-Wert
T1	4,8	2	T1, T2	0,12
T2	10,5	3	T1, T3	0,0067
T3	14,7	3	T2, T3	0,0033

Tab. 3.10 Mittelwerte und SEM der Anzahl des Niesens T1-T3 Frühphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

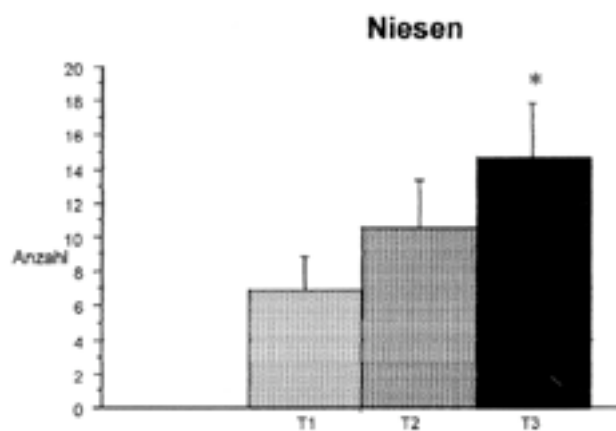


Abb. 3.17 Zeitlicher Verlauf der Anzahl des Niesens Frühphase von T1, T2, T3

3.3.3 Nasaler Flow

Betrachtet man den nasalen Flow, ließ sich sowohl ipsi- als auch kontralateral keine deutliche Veränderung im Laufe der drei Versuchstage erkennen (Tab. 3.11/12 + Abb. 3.18/3.19).

ipsilateral	MW ccm/s	SEM		p-Wert
T1	288	63	T1, T2	0,22
T2	371	73	T1, T3	0,94
T3	284	65	T2, T3	0,18

Tab. 3.11 Mittelwerte und SEM des nasalen Flow ipsilateral (in ccm/s) T1-T3 Frühphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

kontralateral	MW ccm/s	SEM		p-Wert
T1	657	116	T1, T2	0,61
T2	705	116	T1, T3	0,97
T3	640	129	T2, T3	0,53

Tab. 3.12 Mittelwerte und SEM des nasalen Flow kontralateral (in ccm/s) T1-T3 Frühphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

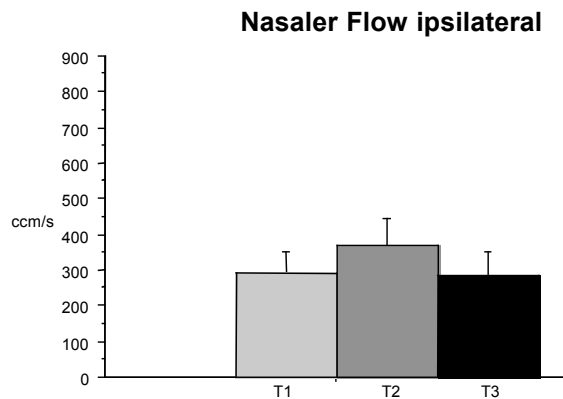


Abb. 3.18 Zeitlicher Verlauf des nasalen Flow (ccm/s) von T1, T2, T3 ipsilateral in der Frühphase

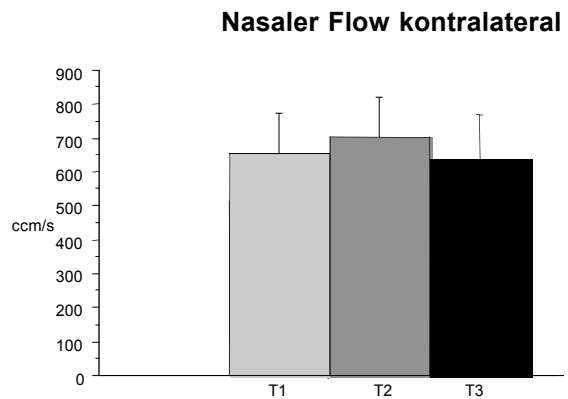


Abb. 3.19 Zeitlicher Verlauf des nasalen Flow (ccm/s) von T1, T2, T3 kontralateral in der Frühphase

3.3.4 Sekretgewicht

Das Sekretgewicht stieg über die drei Versuchstage zwar kontinuierlich an, ipsilateral zeigte sich jedoch keine signifikante Änderung in der statistischen Auswertung. Kontralateral war die Steigerung des Sekretgewichtes zwischen T1 und T3 signifikant (Tab. 3.13/14 + Abb. 3.20/3.21)

ipsilateral	MW mg	SEM		p-Wert
T1	199,2	20,7	T1, T2	0,24
T2	211,3	20,1	T1, T3	0,059
T3	237,4	14,4	T2, T3	0,071

Tab. 3.13 Mittelwerte und SEM des Sekretgewichtes (in mg) T1-T3 Frühphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

kontralateral	MW mg	SEM		p-Wert
T1	199,2	20,7	T1, T2	0,14
T2	147,4	20,1	T1, T3	0,012
T3	157,6	14,4	T2, T3	0,35

Tab. 3.14 Mittelwerte und SEM des Sekretgewichtes kontralateral (in mg) T1-T3 Frühphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

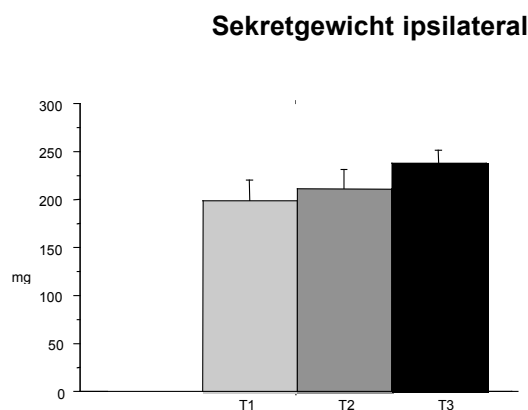


Abb. 3.20 Zeitlicher Verlauf des Sekretgewichtes (mg) von T1, T2, T3 ipsilateral in der Frühphase

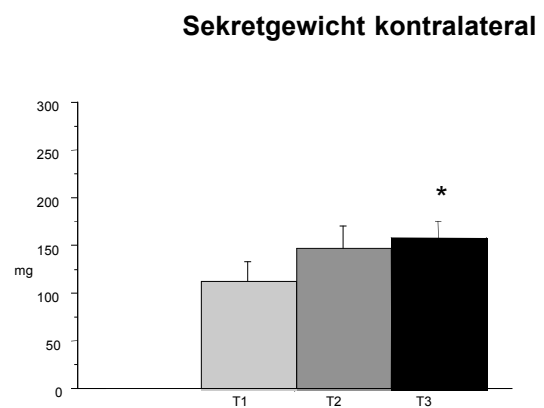


Abb. 3.21 Zeitlicher Verlauf des Sekretgewichtes (mg) von T1, T2, T3 kontralateral in der Frühphase

3.3.5 Histamin

Der Verlauf des Mastzellmediators Histamin ergab während der drei Allergenprovokationen im Vergleich zur Auswertung der Symptome ein anderes Muster. Während sich bei der zweiten Provokation (T2) ein deutlich und statistisch signifikanter Anstieg zeigte, fielen die Werte nach einer erneuten Provokation am darauffolgenden Tag wieder auf die Ausgangswerte zurück (Tab. 3.15 + Abb. 3.22).

	MW μg	SEM		p-Wert
T1	14,76	45,28	T1, T2	0,034
T2	30,26	85,79	T1, T3	0,43
T3	13,51	32,98	T2, T3	0,0076

Tab. 3.15 Mittelwerte und SEM der Histaminkonzentration (in μg) T1-T3 Frühphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

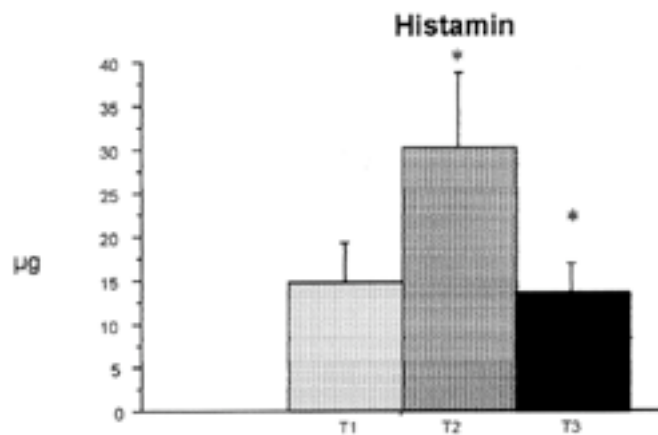


Abb. 3.22 Zeitlicher Verlauf der Histaminkonzentration(μg) von T1, T2, T3 Frühphase

3.3.6 ECP

Die Sekretkonzentration des von eosinophilen Granulozyten produzierte Mediators ECP hatte an T2 seinen höchsten Wert. Der Konzentrationsanstieg blieb jedoch zwischen T1 und T3 weiterhin signifikant, der Konzentrationsabfall zwischen T2 und T3 jedoch nicht (Tab. 3.16 + Abb. 3.23).

	MW pg	SEM		p-Wert
T1	6,62	1,41	T1, T2	0,0022
T2	30,10	7,21	T1, T3	0,0076
T3	18,54	3,54	T2, T3	0,071

Tab. 3.16 Mittelwerte und SEM der ECP-Konzentration (in pg) T1-T3 Frühphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

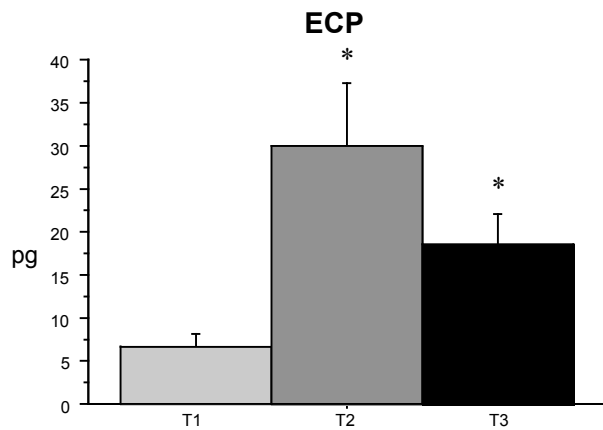


Abb. 3.23 Zeitlicher Verlauf der ECP-Konzentration (pg) von T1, T2, T3 Frühphase

3.3.7 Interleukin-4 und -5

Die Konzentrationsmessungen von IL-4 und IL-5 in der Frühphase zeigten keine signifikanten Änderungen im Vergleich der drei Provokationstage. Die Konzentrationswerte lagen in beiden Fällen im Bereich der Ausgangswerte (Tab. 3.17 und Tab. 3.18). Im Gegensatz zu IL-4, das in den Konzentrationswerten im Bereich der Kontrollprovokationen lag, zeigte sich die IL-5-Konzentration deutlich erhöht und blieb es über die drei Tage auch. Auf eine graphische Darstellung wurde verzichtet.

IL-4	MW pg	SEM		p-Wert
T1	0,17	0,01	T1, T2	0,11
T2	0,19	0,01	T1, T3	0,16
T3	0,20	0,02	T2, T3	0,33

Tab. 3.17 Mittelwerte und SEM der IL-4-Konzentration (in pg) T1-T3 Frühphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

IL-5	MW pg	SEM		p-Wert
T1	199,63	66,05	T1, T2	0,53
T2	206,81	65,23	T1, T3	0,66
T3	147,72	53,23	T2, T3	0,59

Tab. 3.18 Mittelwerte und SEM der IL-5-Konzentration (in pg) T1-T3 Frühphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

3.4. Effekt der wiederholten Allergenprovokationen in der Spätphase

3.4.1 Symptomscore, Niesen, nasaler Flow, Sekretgewicht

Zur Auswertung der Spätphase wurden die an den Zeitpunkten 1.-7. Stunde nach Allergenprovokation erhobenen Symptomparameter addiert und zwischen den drei Tagen der wiederholten Allergenprovokation (T1, T2, T3) verglichen. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede für Symptomscore, Niesen, nasalen Flow und Sekretgewichte in der Spätphase (Tab. 3.19-3.22).

Symptomscore

	MW cm	SEM		p-Wert
T1	27,85	4,09	T1, T2	0,85
T2	27,22	3,98	T1, T3	0,94
T3	29,41	4,56	T2, T3	0,64

Tab. 3.19 Mittelwerte und SEM des Symptomscore (in cm) T1-T3 Spätphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

Niesen

	MW Anzahl	SEM		p-Wert
T1	2	1	T1, T2	0,91
T2	2	1	T1, T3	0,89
T3	2	1	T2, T3	0,92

Tab. 3.20 Mittelwerte und SEM der Anzahl des Niesens T1-T3 Spätphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

Nasaler Flow ipsilateral

	MW ccm/s	SEM		p-Wert
T1	1203	181	T1, T2	0,39
T2	1366	199	T1, T3	>0,99
T3	1179	151	T2, T3	0,39

Tab. 3.21 Mittelwerte und SEM des nasalen Flow ipsilateral (in ccm/s) T1-T3 Spätphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

Sekretgewicht ipsilateral

	MW mg	SEM		p-Wert
T1	141,1	19,6	T1, T2	0,24
T2	116,9	11,1	T1, T3	0,94
T3	139,2	14,2	T2, T3	0,27

Tab. 3.22 Mittelwerte und SEM des Sekretgewichtes ipsilateral (in mg) T1-T3 Spätphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

3.4.2 Histamin

Bei der Auswertung der Histaminkonzentration in der Spätphase zeigte sich eine kontinuierliche Konzentrationsabnahme im Verlauf der drei Versuchstage. Diese war jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant. Insgesamt konnten deutlich höhere Histaminkonzentrationen als in der Frühphase bestimmt werden (Tab. 3.23 + Abb. 3.24).

	MW μg	SEM		p-Wert
T1	43,81	10,90	T1, T2	0,12
T2	26,19	6,17	T1, T3	0,059
T3	23,79	5,46	T2, T3	0,21

Tab. 3.23 Mittelwerte und SEM der Histaminkonzentration (in μg) T1-T3 Spätphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

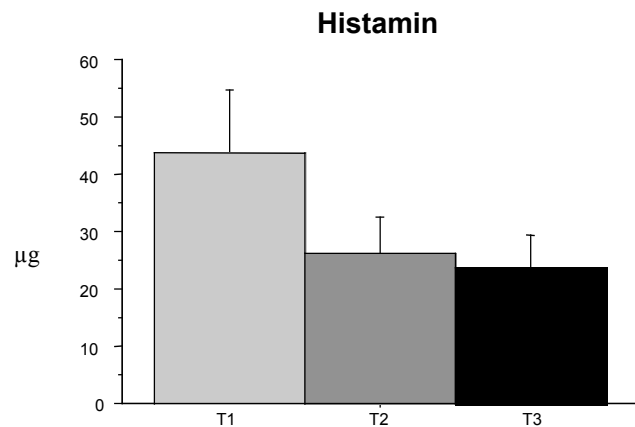


Abb. 3.24 Zeitlicher Verlauf der Histaminkonzentration (μg) von T1, T2, T3 Spätphase

3.4.3 ECP

Die Konzentrationsbestimmung von ECP zeigte ein uneinheitliches Bild. Zunächst sank die Konzentration von T1 zu T2, dann stieg sie wieder an T3 bis beinahe zum Ausgangswert. Obwohl die Konzentrationen auch hier deutlich höher waren, als in der Frühphase, zeigte sich keine gerichtete Veränderung der Konzentrationen. Zu keinem Zeitpunkt war ein signifikanter Unterschied vorhanden. (Tab. 3.24 + Abb. 3.25).

	MW pg	SEM		p-Wert
T1	270,62	66,82	T1, T2	0,071
T2	144,86	30,45	T1, T3	0,31
T3	240,64	90,80	T2, T3	0,21

Tab. 3.24 Mittelwerte und SEM der ECP-Konzentration (in pg) T1-T3 Spätphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

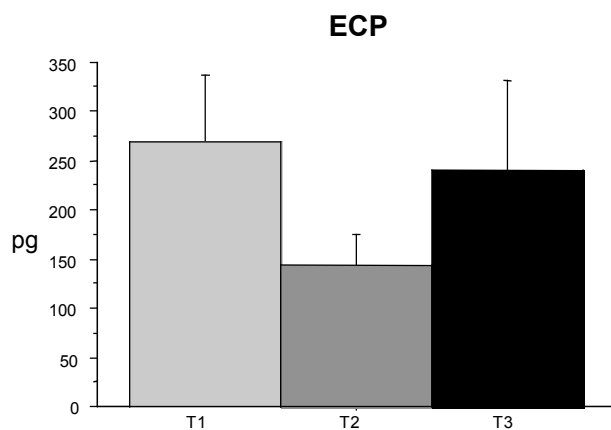


Abb. 3.25 Zeitlicher Verlauf der ECP-Konzentration (pg) von T1, T2, T3 Spätphase

3.4.4 Interleukin 4

Nach einem starken Konzentrationsanstieg in der Spätphase des ersten Provokationstages sank die Konzentration des Th2-Zytokins IL-4 bereits am 2. Tag der wiederholten Provokationen stark ab und blieb auch am 3. Tag erniedrigt (Tab. 3.25 + Abb. 3.26).

	MW pg	SEM		p-Wert
T1	14,51	4,88	T1, T2	0,016
T2	1,10	0,19	T1, T3	0,0047
T3	2,15	0,61	T2, T3	0,24

Tab. 3.25 Mittelwerte und SEM der IL-4-Konzentration (in pg) T1-T3 Spätphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

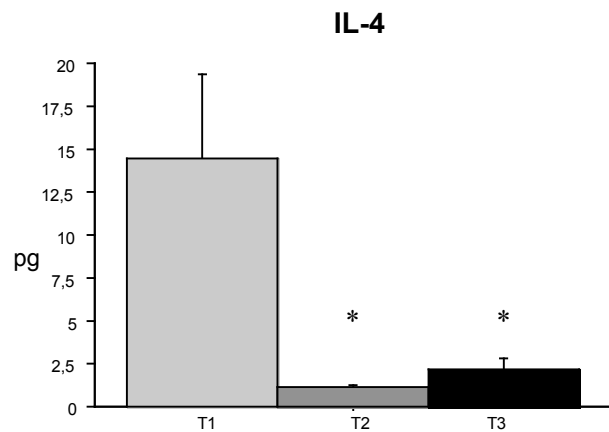


Abb. 3.26 Zeitlicher Verlauf der IL-4-Konzentration (pg) von T1, T2, T3 Spätphase

3.4.5. Interleukin 5

Auch für IL-5 ergab sich eine deutliche Verringerung der Konzentration von T1 zu T2 und T3, die in der Auswertung zwischen T1 und T3 statistisch signifikant war (Tab. 3.26 + Abb. 3.27).

	MW pg	SEM		p-Wert
T1	571,16	151,49	T1, T2	0,18
T2	346,69	125,21	T1, T3	0,041
T3	333,44	87,35	T2, T3	0,94

Tab. 3.26 Mittelwerte und SEM der IL-5-Konzentration (in pg) T1-T3 Spätphase
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

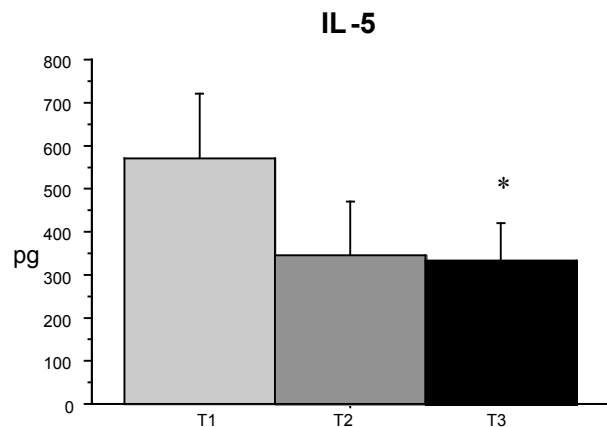


Abb. 3.27 Zeitlicher Verlauf der IL-5-Konzentration (pg) von T1, T2, T3 Spätphase

3.5 Zellzählung und zytologische Auswertung

Zu Beginn jedes Versuchstages wurde vor der Allergenprovokation eine nasale Lavage durchgeführt. Die in der Lavage enthaltenen Zellen wurden nach einer Trypanblaufärbung gezählt und anschließend mit Hilfe einer Pappenheim-Färbung zytologisch differenziert.

3.5.1 Zellzahlen nasale Lavage

Im Verlauf der wiederholten Allergenprovokation zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Gesamtzahl der Zellen in der nasalen Lavage, die allerdings keine statistische Signifikanz erbrachte (Tab. 3.27 + Abb. 3.28).

	MW Anzahl	SEM		p-Wert
T1	409440	102550	T1, T2	0,78
T2	559560	309670	T1, T3	0,21
T3	795600	281580	T2, T3	0,26

Tab. 3.27 Mittelwerte und SEM der Zellzahlen nasale Lavage
Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

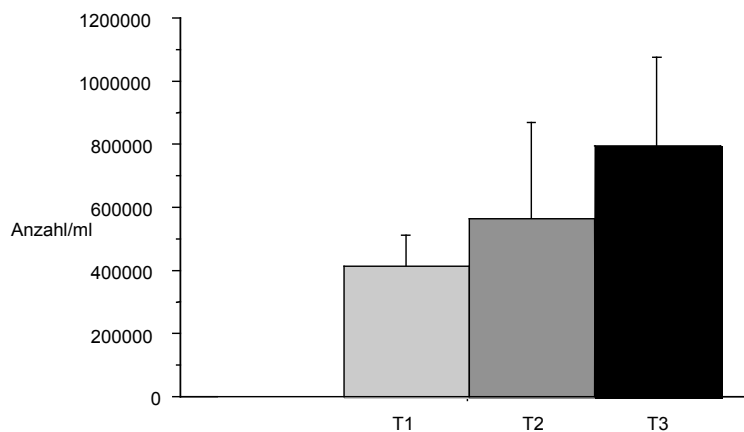


Abb. 3.28 Zellzahlen der nasalen Lavage
T1-T3 vor Allergenprovokation

3.5.2 Zytologische Auswertung

Es zeigten sich ein signifikanter Anstieg des Anteils der eosinophilen Granulozyten und mononucleären Zellen im Zytospin im Verlauf der drei aufeinanderfolgenden Tage T1 bis T3. Der Anteil neutrophiler Granulozyten änderte sich nicht und die Epithelzellen nahmen signifikant ab (Tab. 3.28-31, Abb. 3.29-32).

Neutrophile Granulozyten in %

	MW %	SEM		p-Wert
T1	59,1	9,1	T1, T2	0,80
T2	60,0	7,2	T1, T3	0,13
T3	73,1	4,2	T2, T3	0,17

Tab. 3.28 Mittelwerte und SEM des Anteils neutrophiler Granulozyten im Zytospin (in %) Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

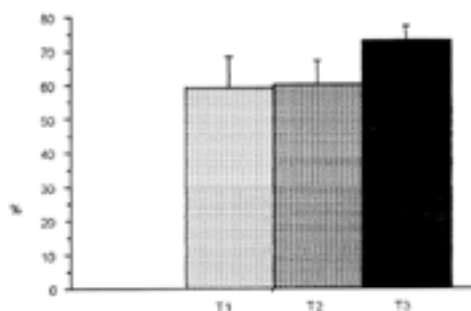


Abb. 3.29 Anteil neutrophiler Granulozyten (%) Zytospin T1-T3

Eosinophile Granulozyten in %

	MW %	SEM		p-Wert
T1	1,4	0,6	T1, T2	0,046
T2	5,8	1,6	T1, T3	0,018
T3	7,1	1,9	T2, T3	0,77

Tab. 3.29 Mittelwerte und SEM des Anteils eosinophiler Granulozyten im Zytospin (in %) Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

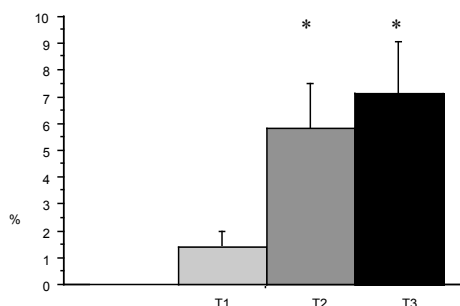


Abb. 3.30 Anteil eosinophiler Granulozyten (%) Zytospin T1-T3

Mononucleäre Zellen in %

	MW %	SEM		p-Wert
T1	1,8	0,4	T1, T2	0,99
T2	1,7	0,3	T1, T3	0,011
T3	4,4	1,6	T2, T3	0,049

Tab. 3.30 Mittelwerte und SEM des Anteils mononucleärer Zellen im Zytospin (in %) Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

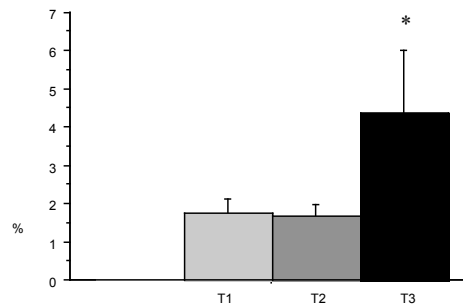


Abb. 3.31 Anteil mononucleärer Zellen (%) Zytospin T1-T3

Epithelzellen in %

	MW %	SEM		p-Wert
T1	1,8	0,4	T1, T2	0,51
T2	1,7	0,3	T1, T3	0,026
T3	4,4	1,6	T2, T3	0,047

Tab. 3.31 Mittelwerte und SEM des Anteils Epithelzellen im Zytospin (in %) Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Signifikanzniveau: 5%

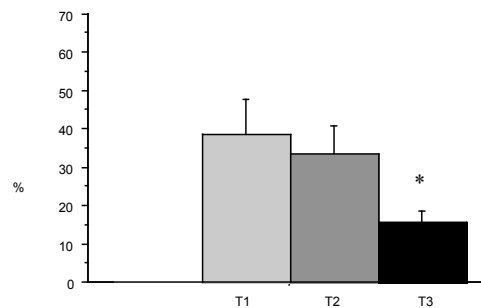


Abb. 3.32 Anteil Epithelzellen (%) Zytospin T1-T3

4. Diskussion

4.1 Effekt der Allergenprovokation

In unserer Studie wurde die experimentelle Allergenprovokation mit der Disc-Methode zur Induktion einer allergischen Reaktion angewandt (Baroody, F.M. et al. 1993).

Zur Provokation wurde eine definierte Menge Allergenlösung auf einer Filterpapier-Disc auf die Schleimhaut des Nasenseptum hinter die mukokutanen Grenze gelegt. Nach einer Einwirkzeit wurde in genau diesem Areal ebenfalls durch eine Disc das dort produzierte Nasensekret gesammelt und anschließend ausgewertet. Eine Verschleppung des Allergens auf die kontralaterale Seite ist nach Ausschluss einer Septumperforation unwahrscheinlich, so dass eine getrennte Auswertung möglich war. Die gesammelte Menge Nasensekret wurde genau bestimmt. Bei den Messungen der Mediator- oder Zytokinkonzentrationen durch ELISA konnte die Menge des Nasensekretes als Bezugspunkt verwendet werden und so eine präzise quantitative Auswertung ermöglichen.

Diese Methode bietet gegenüber der Provokation mit einem Spray und der anschließenden Nasenlavage mehrere Vorteile. Es ist möglich, streng einseitig zu provozieren. Die Provokation ist gut reproduzierbar und steuerbar. Das Sammeln des Nasensekretes mit Kollektionsdiscs erlaubt eine exakte Bestimmung der produzierten Menge. Die Messung des nasalen Flow kann direkt im Anschluss ohne Beeinflussung durch Lavageflüssigkeit erfolgen.

Bei der Auswertung des ersten Provokationstages zeigte sich, dass die Probanden sofort nach der Allergenprovokation symptomatisch reagierten. Der Symptomscore, die Anzahl des Niesens die ipsi- und kontralaterale Sekretion stiegen an, der ipsi- und kontralaterale nasale Flow fiel ab. Auch auf Mediatorebene war die für die Frühphase typische Mastzelldegranulation mit einem Anstieg der Histaminkonzentration zu erkennen. Auch IL-5 war in dem gewonnenen Sekret erhöht nachweisbar. In der Spätphase konnte bei keinem der Symptomparameter ein signifikanter Effekt gezeigt werden. Die begrenzte Provokationsfläche der Schleimhaut bei der Disc-Methode könnte die fehlenden Symptome der Spätphase

erklären. Dem Anschein nach reichte die provozierte Fläche des Nasenseptum nicht aus, um messbare Effekte auszulösen. Als Zeichen der Spätphase auf Mediator- und Zytokinebene konnten wir die Konzentrationen von Histamin, ECP, IL-4 und IL-5 erhöht nachweisen. Der Vergleich der erhobenen Parameter zu den Basiswerten und den Kontrollprovokationen zeigte einen eindeutig auf die Allergenprovokation zurückzuführenden Effekt. Es wurde eine allergische Sofortreaktion ausgelöst, die sich in den Symptomparametern und einer Histaminausschüttung niederschlug, die allergische Spätphase spiegelte sich in den erhöhten Mediator- und Interleukinkonzentrationen in den Stunden nach der Provokation wider.

Wie auch in der Studie von Wagenmann et al. 1997 konnte eine Reaktion der kontralateralen, nicht provozierten Seite ausgelöst werden. Sie zeigt sich im Anstieg des Sekretgewichtes und dem Abfall des nasalen Flow. Diese Effekte könnten wohlmöglich auf eine Steuerung durch zentrale Reflexe ggf. mit nachfolgender Neuropeptidausschüttung zurückzuführen sein. Auch der gesteigerte Niesreiz könnte in diesem Zusammenhang erklärt werden (Wagenmann, M. et al. 1997).

Vergleicht man die Symptome eines allergischen Patienten während der Saison mit den Effekten einer einmaligen experimentellen Allergenprovokation, so lässt sich die klare Aufteilung Früh- und Spätphase nur schwer erkennen. Durch die dauerhafte Allergenpräsenz werden anhaltende pathophysiologische Veränderungen ausgelöst, die nur bedingt standardisiert messbar sind. Das Modell einer wiederholten Allergenprovokation nach 24 h bietet eine Möglichkeit, der natürlichen Situation in der Versuchsanordnung näher zu kommen.

4.2 Der Primingeffect

Die saisonale allergische Rhinitis besteht nicht ausschließlich aus einer akuten Symptomatik mit Niesreiz, Juckreiz und Rhinorrhoe im Rahmen einer punktuellen Allergenexposition. Die Beschwerden können vielmehr über Tage und Wochen andauern. Zudem ist die Symptomatik im Laufe der Pollensaison bei vielen Patienten progredient, obwohl die Pollenbelastung inkonstant oder sogar abnehmend ist. Neben der eindeutigen zeitnahen Allergenwirkung scheint also

zusätzlich eine chronisch entzündliche Komponente bedeutend zu sein. Zwischen dieser Entzündungsreaktion und der Spätphase der allergischen Reaktion besteht ein enger Zusammenhang. Die theoretische Aneinanderreihung allergischer Reaktionskaskaden käme einem dauerhaften Zustand der Spätphase sehr nahe. Durch den verstärkten Einfluss von Mediatoren und Zytokinen, zellulärem Influx und erniedrigten Reflexschwellen sowie Ausschüttung von Neuropeptiden könnte die Stärke der Symptomatik beeinflusst werden. Die Verstärkung der Symptomatik nach wiederholter Allergenexposition wird Primingeffekt genannt.

Ziel unserer Studie war, den Primingeffekt bei der allergischen Rhinitis experimentell zu reproduzieren und den Zusammenhang zur Ausschüttung von Mediatoren und Zytokine zu untersuchen.

Der Primingeffekt wurde erstmals 1969 von John T. Connell beschrieben. Er führte 13 Wochen lang täglich bei einer Testperson mit einer Ragweedpollenallergie experimentelle Allergenprovokationen mit Pollenkörnern durch. Durch die Erhebung eines Symptomscores und Messungen der nasalen Obstruktion konnte Connell feststellen, dass nach wiederholten Allergenprovokationen deutlich geringere Pollenmengen zur Auslösung einer gleichbleibenden oder sogar verstärkten allergischen Reaktion der Nasenschleimhaut führten und nannte dieses Phänomen den "priming effect" (Connell, J.T. 1969). Er zeigte durch weitere Versuche, dass Priming auf verschiedene Allergene, gegen die die Testperson sensibilisiert war, übergriff und nach einigen Tagen reversibel war. Er vermutete, dass diesem Phänomen lokale Veränderungen der Schleimhaut zu Grunde liegen. Erst etwa 20 Jahre später wurden Studien durchgeführt, die diese Untersuchungen weiterführten. Bacon verglich die Reaktion der Nasenschleimhaut nach wiederholter Allergenprovokation mit der Reaktion nach Provokation mit Ammonium Gas. Es konnte nach Allergenprovokation ein Primingeffekt erzeugt werden. Im Gegensatz dazu konnte sie keine signifikante Steigerung der nasalen Reaktivität auf den unspezifischen Reizstoff (Ammonium Gas) nachweisen. Sie zeigte damit, dass der Primingeffekt spezifisch für Allergene ist. (Bacon, J.R. et al. 1981). Diese Ergebnisse bestärken, dass es sich beim Primingeffekt nicht um eine unspezifische Hyperreaktivität der Schleimhaut, sondern um eine durch Allergen getriggerte Reaktion handelt. Auch im Rahmen natürlicher Pollenexposition wurde der Primingeffekt untersucht. Es stellte sich heraus, dass

während und kurz nach der Pollensaison niedrigere Allergenkonzentrationen erforderlich waren, um eine Obstruktion der Nase und der Tuba auditiva zu erreichen, als vor der Saison (Skoner, D.P. et al. 1989). In Bezug auf die nasale Obstruktion konnte Juliusson nachweisen, dass es zum Ende der Pollensaison zu einem Anstieg des mikrovaskulären Blutflusses der Nasenschleimhaut kommt (Juliusson, S. und Bende, M. 1988).

In unserer Studie gelang es, den Primingeffekt experimentell zu reproduzieren. Die Symptomatik steigerte sich an drei aufeinanderfolgenden Tagen in Bezug auf den Symptomscore, Niesen und das Sekretgewicht. Der Primingeffekt konnte insbesondere während der Frühphase nach der Allergenprovokation ausgelöst werden. Der Symptomscore zeigte eine signifikante Steigerung der subjektiven Empfindungen Nasensekretion, -obstruktion und Juckreiz von den ersten beiden Tagen und zum dritten Tag. Die Anzahl des Niesens steigerte sich kontinuierlich von durchschnittlich 4,8 auf 14,7. Das ermittelte Sekretgewicht zeigte sowohl auf der ipsilateralen, als auch auf der kontralateralen, nicht provozierten Seite einen Anstieg zwischen dem ersten und letzten Provokationstag. Dieser war jedoch nur auf der kontralateralen Seite signifikant. Bei der Auswertung des nasalen Flows ergaben sich, im Gegensatz zu früheren Studien keine signifikanten Ergebnisse. Vergleichbar zur Auswertung des ersten Provokationstages kann bei der Allergenprovokation mit der Disc-Methode nur ein kleiner Schleimhautanteil des Nasenseptum direkt provoziert werden, wodurch sich möglicherweise der Effekt der nasalen Obstruktion nicht so stark entwickelt, wie bei anderen Methoden, bei denen die gesamte Nasenhaupthöhle provoziert wird. Bei der Auswertung der Spätphase im Vergleich zwischen T1, T2 und T3 konnte in allen bisher genannten Symptomparametern keine signifikante Änderung festgestellt werden.

Alle Parameter zeigten in aufeinanderfolgenden Allergenprovokationen mit einem 14 tägigen Abstand keine signifikanten Unterschiede. Auch die Kontrollprovokationen mit Lösungsmittel an drei aufeinanderfolgenden Tagen ergaben keine signifikanten Ergebnisse. Der hervorgerufene Primingeffekt lässt sich demnach eindeutig auf die experimentelle Allergenprovokation zurückführen.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Primingeffekt nur in der Frühphase der allergischen Reaktion auftritt und in der Spätphase nicht zum tragen kommt. Da sich bisherige Studien nur auf die Beobachtung der Frühphase bezogen haben

(Wachs, M. et al., 1989), ergeben sich bei der Betrachtung der Früh- und Spätphase neue Ansatzpunkte für die möglichen pathophysiologischen Ursachen des Primingeffektes. Es liegt nahe, typische Mediatoren der Frühphase wie das Histamin, Leukotriene oder Prostaglandine für dieses Phänomen verantwortlich zu machen. Die Mediatoren und Interleukine der Spätphase im Rahmen der chronischen Entzündung sowie der zelluläre Influx spielen wohlmöglich eine untergeordnete Rolle bei der Ausprägung der Symptomatik der Sofortreaktion. Die Parameter Niesreiz, Juckreiz und Sekretion weisen auf das Einwirken von Neuropeptiden und verstärkte reflektorische Mechanismen hin.

4.3 Histamin

Histamin wurde 1911 als eine vasoaktive Substanz entdeckt. Sehr bald wurde seine herausragende Rolle in akuten allergischen Reaktionen wie der allergischen Rhinitis, dem allergischen Asthma, der Urtikaria und der Anaphylaxie erforscht.

In der Frühphase der allergischen Reaktion sind Mastzellen die Haupteffektorzellen, in deren Granula Histamin enthalten ist. Sie zeichnen sich durch membranständige IgE-Rezeptoren aus. Allergenspezifisches IgE bindet sich mit dem Fc-Teil an die hochaffinen Fc ϵ -Rezeptoren (Typ I) der Mastzellen. In die Schleimhaut eingedrungene Allergenmoleküle binden sich an diese IgE-Antikörper. Dies führt zum sogenannten „crosslinking“ von IgE-Molekülen und damit zweier oder mehrerer Fc ϵ -Rezeptoren, wodurch eine Mastzelldegranulation und damit Histaminfreisetzung ausgelöst wird (Metzger, H.G. et al. 1986, Naclerio, R.M. et al. 1983).

Nasale Provokationen mit Histamin haben gezeigt, dass Histamin für die meisten typischen Symptome der Frühphase der allergischen Rhinitis verantwortlich ist. Über die Aktivierung von Histaminrezeptoren auf sensorischen Nerven und über neuronale Reflexe werden Nies- und Juckreiz und glanduläre Sekretion ausgelöst. Gefäßständige Histaminrezeptoren erzeugen eine Vasodilatation, Plasmaexsudation und Ödem, was zu Rhinorrhoe und Schleimhautschwellung führt (Bachert, C. 1998). Die besondere Relevanz von Histamin zeigt sich auch in der hohen Effektivität der medikamentösen H1-Rezeptorantagonisierung durch

Antihistaminika, durch die ein Großteil der allergischen Symptomatik deutlich unterdrückt werden kann.

Der Verlauf der Histaminkonzentration nach wiederholter Allergenprovokation im Rahmen des Primingeffektes wurde auch von Wachs et al. 1989 untersucht. Mit Hilfe eines ähnlichen Protokolls provozierte er die Nasenschleimhaut an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Es stellte sich heraus, dass die Histaminkonzentration im Nasensekret (Lavage) während der Frühphase an den beiden Folgetagen signifikant gegenüber dem ersten Tag anstieg. Zwischen den beiden Folgetagen ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Auch weitere Mediatoren der allergischen Reaktion, wie TAME-Esterase, Kinin, Leukotrien C₄ und Prostaglandin D₂ zeigten eine Konzentrationserhöhung im Verlauf der drei Provokationstage (Wachs, M. et al. 1989).

In unserer Untersuchung zeigte sich zwar in der Frühphase ein signifikanter Anstieg der Histaminkonzentration zwischen dem ersten und zweiten Tag der aufeinanderfolgenden Provokationen. Am dritten Tag fiel die Konzentration jedoch auf den Ausgangswert zurück. Möglicherweise liegt dem initialen Anstieg ein durch den Allergenkontakt induzierter Einstrom von Mastzellen zu Grunde. Der erneute Konzentrationsabfall könnte einer Ausschöpfung der Histaminspeicher in den Granula der Mastzellen entsprechen. Dvorak und Mitarbeiter haben in multiplen Analysen den Erholungs-Zyklus von humanen Lungenmastzellen nach IgE-getriggelter Degranulation untersucht. Neben einer fast vollständigen Ausschüttung der Histamingranula zeigen sich frühe und späte (3-48h) Mechanismen der erneuten Granulabildung. Eine Mastzelle verfügt über die Fähigkeit, ihre Granula erneut zu füllen aber auch neue Granula mit Histamininhalt zu synthetisieren (Dvorak, A. M. et al. 1986; Dvorak A. M. et al. 1988). Der Abfall der Histaminkonzentration könnte durch eine Erschöpfung der Synthesefähigkeit nach mehreren Degranulationszyklen erklärt werden, da zu berücksichtigen ist, dass die Konzentrationen des Allergens deutlich höher sind, als in der natürlichen Pollensaison.

Bei der Analyse der Spätphase zeigte sich in unserer Studie, dass die Konzentration von Histamin im Nasensekret einigen Stunden nach Allergenprovokation sogar deutlich höher ist als in der Frühphase. Die durchschnittliche Histaminkonzentration stieg im Gegensatz zur Frühphase auf

etwa 25 bis 45 µg an. Dieser Befund bestätigt früheren Untersuchungen von Wagenmann et al. aus 1997. Hier konnte ebenfalls eine deutlich höhere Histaminkonzentration in den Stunden nach Allergenprovokation gemessen werden. Dieses Ergebnis war sowohl ipsi- als auch kontralateral nachweisbar. Durch die Disc-Methode konnte auch hier eine Verschleppung des Allergens auf die kontralaterale Seite ausgeschlossen werden. Der mögliche Mechanismus der Histaminausschüttung liegt in der Stimulation der vorhandenen Zellen durch neurale Reflexe oder Neuropeptide (Wagenmann, M. et al. 1997). In unserer Studie findet sich jedoch, wie bereits diskutiert, kein signifikanter Effekt auf den Symptomscore oder die gemessenen Symptomparameter. Trotz der hohen Konzentrationen von Histamin in der Spätphase stehen demnach nicht die Akutsymptome Niesreiz, Juckreiz und wässrige Rhinorrhoe im Vordergrund. Die Wirkung des spät sezernierten Histamin scheint sich deutlich vom frühen Histamineffekt unterscheiden. Möglicherweise spielt die H1-Rezeptorbindung bzw. -blockierung dabei eine Rolle.

In unserer Studie ergab die Auswertung der Histaminkonzentration in der Spätphase bezüglich des Primingeffektes trotz deutlich erhöhter Konzentrationen eine kontinuierliche Abnahme des Histamin im Nasensekret, die jedoch zu keiner Zeit signifikant ist.

Nach der Ausschöpfung der Mastzellgranula in der Frühphase ist es unwahrscheinlich, dass die Histaminausschüttung in der Spätphase auf die gleiche Herkunft zurückzuführen ist. Mastzellen sind nicht die einzigen Zellen, die Histamin ausschütten können. Es findet Stunden nach Allergenprovokation ein Einstrom basophiler Granulozyten statt, die dann nachweislich die Hauptquelle des Histamin darstellen. (Bascom, R. et al. 1988; Iliopoulos, O. et al. 1992). Der von vielen verschiedenen Zelltypen (z.B. Endothelzellen, Lymphozyten, Monozyten) gebildete sogenannter Histamin-Releasing-Faktor kann die Histaminausschüttung basophiler Granulozyten über IgE-Antikörper in der Spätphase mitinduzieren (MacDonald, S.M. et al. 1991).

Wir konnten zeigen, dass nach einer erneuten Allergenbelastung, bzw. Allergenprovokation die subjektiv empfundenen histamininduzierten Symptome (Niesen, Juckreiz, Sekretion) in der Frühphase im Sinne eines Primingeffektes zunehmen. Die Ursache kann jedoch nicht nur auf die Histaminausschüttung

zurückgeführt werden, denn die ermittelten Konzentrationsverläufe sowohl in der Früh-, als auch in der Spätphase zeigen keine kontinuierlich ansteigenden Werte. Eine experimentelle nasale Provokation mit Histamin durch Gronborg et al. unterstützt diese Ergebnisse. Er konnte nachweisen, dass eine ausschließliche Provokation mit Histamin oder Metacholin keinen Primingeffekt hervorruft (Gronborg, H. et al. 1986). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nach mehreren Provokationen mit Histamin eine Tachyphylaxie bezüglich der nasalen Sekretion auftritt (Wagenmann, M. et al. 1997).

In einer Studie von Bachert et al. zeigte sich auch während der natürlichen Pollenexposition bei Birkenallergikern ein Verlauf der Histaminkonzentration im Nasensekret, der nicht mit dem erhobenen Symptomscore übereinstimmte. Es erfolgten in einem 14tägigen Abstand sechs Messungen (V1-6) während und drei Messungen (V7-9) nach der Saison. Die Histaminkonzentration zu Saisonbeginn war interessanterweise gegenüber den Kontrollprobanden nicht erhöht. Auch im Verlauf der sechs Messungen in der Saison waren die Konzentrationen wechselhaft und bis auf V6 nicht signifikant erhöht. Erst nach der Saison stiegen die Histaminwerte ohne eine Auswirkung auf den Symptomscore signifikant an (Bachert, C. et al. 1999).

Nach unseren Ergebnissen ist die Histaminausschüttung nicht der ausschlaggebende Faktor für die Ausprägung des Primingeffektes. Es ist unwahrscheinlich, dass die inkonstante bzw. abnehmende Histaminkonzentration im Nasensekret in Früh- und Spätphase für eine stärkere Reaktionsbereitschaft der Nasenschleimhaut verantwortlich ist.

4.3 Zellulärer Einstrom

Die wiederholte Allergenprovokation führte zu einem Einstrom von Zellen in die Schleimhaut. Wir konnten insgesamt eine Erhöhung der Zellzahl in der nasalen Lavage nachweisen, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. In der zytologischen Auswertung der Lavageflüssigkeit konnte ein signifikanter Anstieg der Zahl der eosinophilen Granulozyten über die drei aufeinanderfolgenden Provokationstage gezeigt werden. Die mononucleären Zellen waren ebenfalls im Cytospin-Präparat signifikant vermehrt. Damit kann insbesondere ein Influx von

T- und B-Lymphozyten sowie Mastzellen vermutet werden. Der Anteil der neutrophilen Granulozyten blieb annähernd gleich, der Anteil der Epithelzellen nahm ab.

Diese Ergebnisse sind Ausdruck eines gesteigerten Influx von Entzündungszellen, insbesondere der eosinophilen Granulozyten, der auf Chemotaxis oder selektiven Einstrom durch die Expression von Adhäsionsmolekülen zurückzuführen ist.

Schon seit über 100 Jahren wird den eosinophilen Granulozyten neben einer Funktion bei der Abwehr parasitärer Infektionen eine wichtige Rolle bei allergischen Erkrankungen zugeschrieben. Chronisch allergische Erkrankungen sind durch eine Gewebs-Eosinophilie charakterisiert. Insbesondere bei Asthma bronchiale bestätigen viele Studien, dass das Ausmaß der Eosinophilie mit der Schwere der Erkrankung korreliert (Bousquet, J. et al. 1990).

Als Ursache der Eosinophilie werden verschiedene Mechanismen diskutiert: die vermehrte Produktion, das verlangsamte Sterben durch die Hemmung der Apoptose, Chemotaxis, selektiver Einstrom durch Adhäsionsmoleküle. Durch IL-5 wird die Apoptose der eosinophilen Granulozyten verzögert. Während andere Entzündungszellen z.B. neutrophile Granulozyten durch den programmierten Zelltod absterben, kommt es zu einem Überwiegen der Eosinophilen im Gewebe (Yamaguchi, Y. et al. 1991; Simon, H.-U. et al. 1995; Simon, H.-U. et al. 1997). Es konnte gezeigt werden, dass zusätzlich im Rahmen eines selektiven Einstroms durch die Wirkung von Zytokinen eosinophile Granulozyten eine Adhärenz zum Endothel entwickeln und vermehrt ins Gewebe einwandern (Resnick, M.B. et al. 1993). Dies gilt auch für den selektiven Einstrom von Eosinophilen, Basophilen und T-Zellen durch eine durch Allergeneinwirkung vermehrte VCAM-1-Expression (Schleimer, R.P. et al. 1992). Altman, L. C. et al. konnten 1993 nachweisen, dass Zytokine und ECP in vitro eine verstärkte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in Nasenschleimhautzellen induziert. Der Influx von Leukozyten wird durch diesen Mechanismus zusätzlich verstärkt (Altman, L. et al. 1993).

Eosinophile Granulozyten entfalten ihre entzündliche Wirkung durch die Freisetzung von Mediatoren aus ihren Granula. Die kationischen Proteine Major Basic Protein (MBP), Eosinophil-derived Neurotoxin (EDN), Eosinophile Peroxidase (EPO) und Eosinophil Cationic Protein (ECP) wirken zytotoxisch auf das respiratorische Epithel (Martin, L.B. et al. 1996). ECP ist nahezu ausschließlich in

eosinophilen Granulozyten enthalten, weniger als 1% findet sich in neutrophilen Granulozyten. ECP kann die Oberflächenmembran von Parasiten und Körperzellen zerstören und zu deren osmotischer Lyse führen. Auf dieser Grundlage studierten Klimek et al. ECP als möglichen Zellaktivierungsmarker für eosinophile Granulozyten bei Rhinitis und Rhinosinusitis. Es zeigte sich eine erhöhte ECP-Konzentration im Nasensekret bei Patienten mit verschiedenen Formen der Rhinitis (chronische Rhinosinusitis, Polyposis nasi, perenniale allergische Rhinitis, saisonale allergische Rhinitis intra- und extrasaisonal) im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden. Interessanterweise konnte die höchste ECP-Konzentration bei saisonalen Allergikern während der Saison gemessen werden (Klimek, L. et al. 1996; Young, J. D. 1986).

In einer Studie von Wang et al. wurde ECP als ein Marker der Spätphase der allergischen Reaktion untersucht. Es wurden die Messung von ECP und die Anzahl von eosinophilen Granulozyten bei saisonalen Allergikern während der Saison mit den Werten nach experimenteller Allergenprovokation verglichen. In der experimentell provozierten Probandengruppe stieg die Konzentration des ECP erst eine Stunde nach Provokation an und erreichte für das ECP die höchsten Werte nach etwa 24h. Diese hohen Konzentrationen des ECP in der Spätphase waren vergleichbar mit den Konzentrationen bei Pollenallergikern während der Saison. Ebenfalls zeigte sich eine gute Korrelation zwischen ECP und Anzahl der eosinophilen Granulozyten. Der Pollenallergiker scheint sich demnach während der Saison in einer kontinuierlichen Spätphase zu befinden, die die chronische Entzündung der Schleimhaut repräsentiert. Wang schließt aus seinen Ergebnissen, dass die kontinuierliche ECP-Erhöhung während der Saison die Grundlage des Primingeffektes sein könnte (Wang D. et al. 1995).

In unserer Studie zeigte sich in der Frühphase am ersten Provokationstag T1 eine ECP-Konzentration von 6,62 pg, die vergleichbar mit den Kontrollprovokationen war. An den Folgetagen stieg die Konzentration auf 30,10 pg am zweiten und 18,54 pg am dritten Provokationstag an. Obwohl die beiden Folgetage gegenüber T1 signifikant erhöht waren, ist die Konzentrationszunahme nicht auf die direkte Einwirkung der Allergenprovokation als Effekt der Frühphase zurückzuführen. Wie bereits erläutert, ist ein Anstieg der ECP-Konzentration frühestens 1h bis 24h nach

Allergenkontakt zu erwarten. Der Anstieg an den Folgetagen könnte daher als Allergenwirkung der Provokation vom Vortag zu interpretieren sein.

Eine deutliche Konzentrationserhöhung des ECP zeigte sich in der Spätphase der Provokation. Im Vergleich der aufeinanderfolgenden Provokationstage zeigte sich jedoch kein signifikanter Effekt. Der Konzentrationsanstieg des ECP sowohl in der Früh- als auch in der Spätphase ist daher nicht zeitlich mit einer gesteigerten Symptomatik gekoppelt.

In einer Studie von Rasp et al. wurde gezeigt, dass der Korrelationskoeffizient zwischen dem Symptomscore von Allergikern und der ECP-Konzentration im Nasensekret bei Allergikern während der Saison nicht auffallend hoch war. Die absoluten ECP-Konzentrationen stiegen jedoch, wie erwartet innerhalb der Saison stark an. Außerhalb der Saison, bei niedrigeren ECP-Werten, war der Korrelationskoeffizient höher (Rasp G. et al. 1994).

Zwischen der ECP-Konzentration und Symptomverstärkung bei den Probanden in der Frühphase ließ sich kein direkter zeitlicher Zusammenhang darstellen. Zweifellos ist die dauerhaft erhöhte ECP-Konzentration in der Spätphase, wie auch der gesteigerte Influx der eosinophilen Granulozyten ein Ausdruck verstärkter chronischer Entzündung und daher indirekt für eine verstärkte Reaktionsbereitschaft verantwortlich.

4.4 Zytokine

Die Zytokine IL-4 und IL-5 werden typischerweise im Rahmen einer allergischen Reaktion gebildet und spielen bei der Chronifizierung der allergischen Entzündung eine entscheidende Rolle. Bisher ist es nur sehr selten geglückt, die Zytokine im Nasensekret nachzuweisen. Im Zuge der Entwicklung sensitiver Assays ist es in unserer Studie gelungen, einen zeitlichen Konzentrationsverlauf parallel zur Entwicklung von Symptomen aufzuzeigen.

Mosmann et al. konnte Ende der 80er Jahre die Unterteilung von Th-Zellen in Th1- und Th2-Zellen anhand ihrer Zytokinmuster erstmals systematisieren. Er stellte die Th1-Zellen mit Indikatorzytokinen IFN- γ und IL-2 den für die allergische Reaktion relevanten Th2-Zellen mit der Produktion von IL-4 und IL-5 gegenüber (Mosmann, T. R. 1989). Diese in-vitro gewonnenen Erkenntnisse bestätigten sich in

Untersuchungen der allergischen Nasenschleimhaut in-vivo. In der Spätphase konnten die IL-4- und IL-5-mRNA produzierenden Zellen der Nasenschleimhaut als T-Lymphozyten identifiziert werden. Eine Quelle von IL-5 sind weiterhin eosinophile Granulozyten. Makrophagen produzieren keins der beiden Interleukine (Ying, S. et al. 1994; Dubucquoi, S. et al. 1994; Kay, A. B. et al. 1995).

In unserer Studie konnte eine prozentuale Zunahme der mononucleären Zellen im zytologischen Präparat gezeigt werden, die im Vergleich zwischen T1/T2 und T3 signifikant war. Eine weitere immunhistochemische Differenzierung der Zellen in T-Helfer-Lymphozyten wurde nicht durchgeführt. Man kann jedoch vermuten, dass es sich um einen Influx von immunkompetenten Entzündungszellen handelt.

IL-4 verursacht die Differenzierung von Th0 zu Th2-Lymphozyten (Swain, S. et al. 1990; Maggi, E. et al. 1992). IL-4 hat bereits in der Sensibilisierungsphase entscheidende Wirkung auf die Entwicklung von B-Lymphozyten und triggert im Rahmen des wiederholten Allergenkontaktes deren IgE-Synthese. Das vorhandene IgE bindet sich an die IgE-Rezeptoren der Mastzellen und löst nach Bindung an das Allergenmolekül die Histamin-vermittelte allergische Sofortreaktion aus (Pène, J. et al. 1988). IL-4 induziert in-vitro die Bildung des Adhäsionsmoleküls VCAM-1. Diese führt zu einem selektiven Einstrom von Entzündungszellen, den eosinophilen und basophilen Granulozyten (Schleimer, R. P. et al. 1992). IL-4 ist damit auf mehreren Ebenen eines der Schlüsselproteine der chronischen allergischen Entzündung.

In der Frühphase unserer Studie konnten nur niedrige IL-4 Konzentrationen (0,17-0,2 pg) gemessen werden, die mit den Konzentrationen direkt nach den Kontrollprovokationen mit Lösungsmittel vergleichbar waren. Dieses deckt sich mit den bisherigen Erkenntnissen, dass IL-4 erst einige Stunden nach Allergenkontakt ausgeschüttet wird und zeigt, dass nach einmaliger Allergenprovokation ohne weiteren kurzfristigen Stimulus IL-4 nach 24h nicht mehr nachweisbar ist. In der Spätphase kam es hingegen zu einem deutlichen Konzentrationsanstieg auf 15,51 pg in der 4.-7. Stunde.

Wang et al. untersuchte den zeitlichen Verlauf der IL-4-Ausschüttung nach Allergenprovokation. Eine signifikante Steigerung des gemessenen IL-4 konnte nach 4 h verzeichnet werden, ein Maximum nach 18 h, wonach ein deutlicher Konzentrationsabfall erfolgte. Er konnte ebenfalls immunhistochemisch zeigen,

dass die frühe IL-4-Produktion (nach 4h) größtenteils von CD117-positiven Zellen, der Mastzell/Basophilen-Reihe ausging, während sich nach 18 h die Dominanz in Richtung CD3-positive Th2-Zellen verschob (Wang, M. et al 1999). Dieser zeitliche Verlauf stimmt mit unseren Ergebnissen überein.

Im Gegensatz zu unserer Hypothese nahmen in der Spätphase die initial um ein vielfaches gesteigerten IL-4-Werte signifikant ab (T1: 15,51 pg, T2: 1,10 pg, T3: 2,15 pg), waren dennoch weiterhin gegenüber der Frühphase erhöht. Hierfür bieten sich verschiedene Erklärungen an. Die Messbarkeit des IL-4 im Nasensekret hängt in-vivo möglicherweise von gesteigerter Metabolisation oder möglicher Gegenregulation auf Zytokinebene ab. Grewe konnte diesbezüglich zeigen, dass eine Abschwächung der Th2-Wirkung in-vitro durch mit IL-4 stimulierte eosinophile Granulozyten und nachfolgende IL-12-Ausschüttung erfolgen kann, die die Entwicklung von Th0-Zellen zu Th1-Zellen unterstützt (Grewe M. et al. 1998).

In unserer Studie war kein zeitlicher Zusammenhang zwischen Konzentrationsanstieg und Symptomausprägung zu erkennen. Bei hohen Konzentrationen von IL-4 in der Spätphase zeigten sich keinerlei Effekte in Bezug auf Symptomscore, Niesreiz und Sekretion. Unerklärt ist bisher, warum eine initial um etwa das 100fache des Ausgangswertes gesteigerte IL-4-Konzentration in der Spätphase von T1 trotz erneutem Allergenangebot durch wiederholte Provokation auf einen Wert um das 10fache des Ausgangswertes zurückfiel. Bei diesem unerwarteten Ergebnis liegt die Erklärung nahe, dass es zu einer Erschöpfung der IL-4-Sekretion gekommen sein könnte. Um die Wirkungsweise der Th2-Zytokine bewerten zu können, ist jedoch neben der IL-4- und IL-5-Konzentration im Nasensekret auch die Verarbeitung am Rezeptor zu untersuchen. In einer Arbeit von Wright et al. wurde gezeigt, dass 24h nach in vivo Allergenprovokation in immunhistochemischen Präparaten der Nasenschleimhaut von Allergikern die Expression von IL-4R und IL-5R im Vergleich zu Proben vor der Provokation signifikant erhöht waren (Wright, E. D. et al. 1999). Eine mögliche Erklärung für den Konzentrationsabfall von IL-4 (und IL-5) könnte demnach das erhöhte Rezeptorangebot oder eine verstärkte Bindung am Rezeptor sein. Trotz höherer Ausschüttung wäre dann ein reduzierter Nachweis im Nasensekret möglich.

Der Effekt des IL-4 scheint auch in anderen Studien kein direktes klinisches Korrelat im Sinne von gesteigerter Symptomatik zu haben. Die Arbeitsgruppe von

Kakinoki und Nakai zeigte 1998, dass während einer Allergensaison bei sensibilisierten Probanden die Konzentration des durch IL-4-Einfluss gebildeten spezifischen IgE im Serum bei symptomatischem und asymptomatischem Verlauf auf vergleichbare Werte anstieg (Kakinoki, Y. 1998). Im Jahr 2000 konnte aufbauend auf diese Ergebnisse von der gleichen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass, vergleichbar mit dem spezifischen IgE, auch die Expression der IL-4-mRNA sowohl bei symptomatischen als auch bei asymptomatischen sensibilisierten Probanden während der Saison gleich erhöht war. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein IL-5-mRNA-Erhöhung nur bei symptomatischen Probanden. Diese Ergebnisse wurden im Sinne einer Bedeutung des IL-4 als Marker für eine Sensibilisierung, des IL-5 als Marker für klinische Manifestation interpretiert (Nakai, Y. 2000).

IL-5 hat seinen hauptsächlichen Effekt auf die Reifung (Yamaguchi, Y. et al. 1/1988), Aktivierung und die Verlängerung der Überlebenszeit der Eosinophilen durch Hinauszögern der Apoptose (Yamaguchi, Y. et al. 5/1988, Yamaguchi, Y. et al. 1991). Ein Anstieg des eosinophilen Influxes wird möglicherweise zusätzlich durch eine chemotaktische Wirkung des IL-5 erzeugt (Wang, J. M. et al. 1989). Ebenso ist eine Steigerung des selektiven Einstroms durch zelluläre Adhäsion von Eosinophilen durch IL-5 in vitro gezeigt worden (Walsh, G.-M. et al. 1990). Diese Mechanismen bewirken die für die allergische Reaktion typische Eosinophilie. Es kommt zur Ausschüttung von eosinophilen Mediatoren wie z.B. des ECP. Zusätzlich hat IL-5 in vitro einen Einfluss auf die Hochregulation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, wodurch andere Entzündungszellen in die Schleimhaut gelangen (Terada, N. et al. 1995).

In unserer Studie kam es bereits in der Frühphase zu einer deutlich erhöhten IL-5-Konzentration im Vergleich zur Kontrollprovokation (5-10 pg), die sich jedoch zwischen T1, T2 und T3 nicht signifikant unterschied (T1: 199,63 pg, T2: 206,81 pg, T3: 147,72 pg). Die IL-5-Ausschüttung scheint demnach auf einen Allergenstimulus zeitnah zu erfolgen. Möglicherweise ist diese frühe IL-5-Ausschüttung auf Mastzellen zurückzuführen. Sowohl die IL-5-Freisetzung aus Th-Lymphozyten als auch aus eosinophilen Granulozyten findet erst in der Spätphase statt und würde nicht sofort einsetzen. Plaut konnte 1989 zeigen, dass das IgE-induzierte „crosslinking“ an hochaffinen Fc ϵ -Rezeptoren (Fc ϵ RI) von Mastzellen neben einer Ausschüttung von Histamin und Arachidonsäuremetaboliten auch die

Produktion und Ausschüttung von IL-3, IL-4, IL-5 und IL-6 induziert. Er interpretierte die Präsenz dieser Interleukine als Trigger für die T-Helfer-Zellen (Plaut, M. 1989). Die Beteiligung von eosinophilen Granulozyten an der Ausschüttung von IL-4 und IL-5 scheint zeitversetzt relevant zu werden. Etwa 6h nach experimenteller Allergenprovokation konnten Anteile von IL-4- und IL-5-mRNA in eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Einen kleineren Anteil an der Produktion dieser Zytokine zu diesem Zeitpunkt machten CD3-positive T-Helfer-Zellen aus (Nouri-Aria, K. T. et al. 2000).

In unserer Studie zeigte sich in der Spätphase zunächst eine deutliche Steigerung der IL-5-Konzentration (T1: 571,16 pg), die der Ausschüttung des Zytokins durch eingewanderte Zellen entsprechen könnte. Bei nachgewiesenem Influx von mononucleären Zellen und eosinophilen Granulozyten sind diese als Quelle der anhaltenden IL-5-Produktion anzusehen. IL-5 ist im Nasensekret in höheren Konzentrationen als IL-4 nachzuweisen. Trotz der hohen IL-5-Konzentrationen findet an den aufeinanderfolgenden Tagen, vergleichbar mit IL-4, ein signifikanter Konzentrationsabfall (T2: 346,69 pg, T3: 333,44 pg) statt. Terada untersuchte 1992 den Effekt einer nasalen Provokation mit IL-5 in vivo. Er konnte in der gewonnenen Lavageflüssigkeit signifikant mehr eosinophile Granulozyten und ECP nachweisen. Die Applikation von IL-5 führte zu keiner signifikant gesteigerten Symptomatik. Auch die nasale Reaktivität auf eine Histaminprovokation wurde von der IL-5-Gabe nicht beeinflusst. Es waren in beiden Fällen weder eine vermehrte Frequenz des Niesens noch ein signifikanter Anstieg des Sekretgewichtes vorhanden. Auch die Messung des nasalen Widerstandes war im Vergleich zu Kontrollprovokationen nicht erhöht (Terada, N. et al. 1992).

Die Therapie mit Anti-IL-5 wird seit einigen Jahren als große Hoffnung in der Forschung nach spezifischen anti-allergischen und insbesondere anti-asthmatischen Therapien gehandelt. Man verspricht sich davon die biologische Ausschaltung des zentralen Zytokins in Bezug auf die Eosinophilie (Danzig, M.; Cuss, F. 1997). In einem Tiermodell untersuchte Cieslewicz 1999 die Wirkung von Anti-IL-5 bei Mäusen mit induziertem allergischem Asthma. Er konnte eine deutliche Reduktion der Spätphase sowie eine deutliche Reduktion des Influxes eosinophiler Granulozyten feststellen, einen Einfluss auf die Frühphase blieb aus

(Cieslewicz, G. et al. 1999), was unsere Ergebnisse bestätigt. Dies zeigt, dass IL-5 möglicherweise als Marker für die klinische Manifestation nicht in Frage kommt.

4.5 Neuropeptide und reflektorische Mechanismen

Die Nasenschleimhaut wird durch sensorische, sympathische und parasympathische Nervenfasern innerviert. Diese Nerven schütten klassische Neurotransmitter und Neuropeptide aus. Das Immunsystem und das Nervensystem interagieren bei der Reaktion der Nasenschleimhaut auf Allergene wie in einem Netzwerk.

Durch Synapsen mit dem ZNS und lokale Axon-Mechanismen werden sympathische und parasympathische Reflexbögen angeregt und gleichzeitig durch Neuropeptide eine lokale neurogene Entzündung induziert. All diese Mechanismen sind natürlicherweise zum Schutz des oberen Aerodigestivtraktes vor Fremdkörpern, mikrobiologischer Besiedlung und Infektionen eingesetzt und werden im Rahmen einer allergischen Erkrankungen pathologisch aktiviert.

Ein wichtiger Neurotransmitter, Substance P, wird von sensorischen Nerven ausgehend vom Nervus trigeminus freigesetzt. Seine Wirkung in der Nasenschleimhaut umfasst Gefäßdilatation, Permeabilitätserhöhung der Gefäße, Schleimsekretion und sogar Leukozyteninfiltration. Substance P ist nach Allergenprovokation bei Allergikern in nasaler Lavage erhöht nachweisbar. Eine vermehrte Konzentration von IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α und γ -Interferon in Gegenwart von Substance P wurde ebenfalls gezeigt. Auch eine Mastzelldegranulation kann durch Neuropeptide, z.B. Neuropeptid Y und Substance P induziert werden (Arzubiaga, C. et al. 1991). Viele weitere Neuropeptide z.B. Acetylcholin und Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) stimulieren die Schleimsekretion und Vasodilatation und führen insgesamt zu einem komplexen System, das sich selbst triggern kann (Baraniuk, J. N. 1998). Der gesamte Symptomkomplex der allergischen Sofortreaktion kann demnach theoretisch durch neurale Mechanismen ausgelöst werden. Zusätzlich ist die Exzitabilität sensorischer Nerven unter Allergeneinfluss gesteigert und langanhaltender, als ohne Allergeneinfluss (Undem, B. J. et al. 1991).

Durch einseitige Allergenprovokationen, z.B. mit der Disc-Methode, ist bereits in mehreren Studien nachgewiesen worden, dass die allergische Reaktion sich ohne direkten Kontakt zum Allergen auf die kontralaterale Seite überträgt. Die Reaktion beinhaltet eine Steigerung der Sekretion, der Obstruktion, des Niesreizes. Nachweislich kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von allergiespezifischen Mediatoren, wie Histamin (Wagenmann, M. 1997), Prostaglandin D₂ (Wagenmann, M. 1996). Auch ein zellulärer Influx ist zu verzeichnen (Philip, G. et al. 1996). Die Ursachen müssen bei fehlendem Allergenkontakt auf neurale Mechanismen zurückzuführen sein.

Histamin, einer der wichtigsten Mediatoren der Frühphase der allergischen Reaktion, ruft über cholinerge neuronale Reflexe eine Steigerung der Sekretion hervor. Konno et al. konnten 1987 in einer Studie Histaminprovokationen an der Nase vor und nach einer Denervierung der sekretorischen Fasern des Nervus trigeminus vergleichen. Es zeigte sich bei intakter Innervation eine erhöhte Sekretion ipsi- und kontralateral mit sehr geringem Albuminanteil im Vergleich zum Plasma. Dies spricht für eine cholinerge Stimulation der mucösen Drüsen und stellt die direkte Wirkung des Histamin auf die Gefäßpermeabilität in den Hintergrund. Postoperativ zeigte sich bei sehr geringer Restsekretion nach Histaminprovokation ein hoher Albuminanteil im Nasensekret (Konno et al. 1987).

In unserer Studie ist im Vergleich der drei aufeinanderfolgenden Provokationstage interessanterweise ebenfalls eine signifikante Steigerung speziell der kontralateralen Sekretion und des Niesens im Sinne des Primingeffektes in der Frühphase aufgetreten. Dieses Ergebnis weist eindeutig darauf hin, dass eine mögliche Erklärung des Primingeffektes die Herabsetzung der Schwellen neuronaler Reflexbögen oder die verstärkte Triggerung o.g. Parameter durch vermehrte Neuropeptidwirkung sein könnte.

Die Ausschüttung von Neuropeptiden führt wiederum zu einer Verstärkung der chronischen Entzündung durch ihren Einfluss auf Mediatoren und Zytokine sowie Influx von Entzündungszellen. In der Spätphase zeigt sich in unserer Studie bei unilateraler Provokation ein Anstieg der Histaminkonzentration auf der Gegenseite, der auch von basophilen Granulozyten stammen muss, die aufgrund von reflektorischen Mechanismen unabhängig vom Allergenkontakt eingewandert sind

(Wagenmann, M. et al. 1997). Auch die psychosomatische Komponente der zentralnervösen Steuerung ist zu diskutieren und weiter zu untersuchen.

Die angestellten Vermutungen legen nahe, dass der in der Versuchssituation ausgelöste Primingeffekt in der Frühphase maßgeblich durch neurogene Mechanismen induziert wurde. Dieses Ergebnis könnte ein sehr vielversprechender Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen und Therapieansätze sein.

5. Zusammenfassung

Die allergische Rhinitis ist mit 20% Prävalenz in der Bevölkerung eine sehr häufige und sozioökonomisch bedeutende Erkrankung. Das Erfolgsorgan bei der saisonalen und perennialen allergischen Rhinitis ist der obere Respirationstrakt, insbesondere die Nasenschleimhaut. Charakteristische Symptome der saisonalen allergischen Rhinitis sind eine gesteigerte, wässrige Nasensekretion, nasale Obstruktion, sowie Juck- und Niesreiz.

In die Schleimhaut eingedrungene Allergenmoleküle binden an spezifische IgE-Antikörper, die auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten an hochaffine Fc ϵ RI-Rezeptoren gebunden sind. Dies führt zum sogenannten „crosslinking“ der IgE-Moleküle, welches eine Mastzelldegranulation und Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Leukotriene, Prostaglandine, Tryptase und präformierten Zytokinen auslöst. Diese Mediatoren wirken innerhalb kürzester Zeit auf Blutgefäße, Drüsen und Nervenfasern in der Nasenschleimhaut und führen zu den klassischen Symptomen der allergischen Sofortreaktion. Die Stimulation der sensorischen Fasern in der Schleimhaut führt über Axonreflexe auch zur Freisetzung von Neuropeptiden. Einige Stunden nach Allergenkontakt, in der sogenannten Spätphase, kommt es zu einem erneuten Anstieg der Mediatorkonzentrationen. Zusätzlich lässt sich ein Einstrom von Entzündungszellen nachweisen. In der allergischen Nasenschleimhaut lassen sich vorwiegend Zellen, die das Th2-Muster aufweisen, darstellen. Die Zytokine des Th2-Typs sind für allergische Reaktionen in zweierlei Hinsicht bedeutsam: Einerseits spielen vor allem IL-4 und IL-13 eine zentrale Rolle bei der Induktion und Unterhaltung der Synthese von IgE, andererseits sind es IL-4, IL-5 und IL-13, die für die Anreicherung von Eosinophilen, Basophilen und T-Zellen in der Schleimhaut verantwortlich sind. Dies geschieht sowohl über die Expression von Adhäsionsmolekülen, als auch über die Wirkung von IL-5 als Wachstums- und Überlebensfaktor für eosinophile Granulozyten in der Schleimhaut.

Der Primingeffect wurde erstmals 1969 von John T. Connell beschrieben. Er führte täglich über mehrere Wochen bei einer Testperson experimentelle Allergenprovokationen durch. Connell konnte feststellen, dass nach wiederholten

Allergenprovokationen deutlich geringere Pollenmengen zur Auslösung einer verstärkten allergische Reaktion der Nasenschleimhaut führten nannte dieses Phänomen den "priming effect".

In unserer Studie wurde der Primingeffekt bei der allergischen Rhinitis durch wiederholte Allergenprovokationen experimentell erzeugt und untersucht. Dazu wurden bei 12 Probanden mit einer saisonalen allergischen Rhinitis außerhalb der Saison an drei aufeinanderfolgenden Tagen Allergenprovokationen mit der Disc-Methode durchgeführt. Es wurden ein Symptomscore erhoben, die Anzahl des Niesens erfasst, Nasensekret mit Filterpapierdiscs gesammelt und der nasale Flow mit einer anterioren Rhinomanometrie bestimmt. Nach Herauslösen des Nasensekretes aus den Discs wurden mit spezifischen ELISA-Assays Histamin, ECP, IL-4 und IL-5 bestimmt.

Lässt sich Priming experimentell reproduzieren?

Bereits bei der Auswertung des ersten Provokationstages zeigten sich signifikante Effekte in Bezug auf den Symptomscore, die Anzahl des Niesens den ipsi- und kontralateralen nasalen Flow und die ipsi- und kontralaterale Sekretion in der Frühphase. Der Vergleich dieser Parameter zu den Basiswerten und den Kontrollprovokationen zeigte einen eindeutig auf die Allergenprovokation zurückzuführenden Effekt. Es wurde eine allergische Sofortreaktion ausgelöst, die sich in den Symptomparametern und einer Histaminausschüttung niederschlug, die allergische Spätphase spiegelte sich in den erhöhten Mediator- und Interleukinkonzentrationen in den Stunden nach der Provokation wider.

Im Vergleich der drei aufeinanderfolgenden Provokationstage ließ sich der Primingeffekt experimentell reproduzieren. Er trat jedoch ausschließlich in der Frühphase auf. Es kam zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl des Niesens und des ipsi- und kontralateralen Sekretgewichtes und zu einem Anstieg des Symptomscores in der Frühphase über drei aufeinanderfolgende Tage. Die Auswertung der Spätphase ergab keine messbare Steigerung hinsichtlich der erfassten Symptome.

Führt Priming zu einer gesteigerten Mediator- und Zytokinfreisetzung?

Durch die Allergenprovokation wurde Histamin und IL-5 in der Frühphase, Histamin, ECP, IL-4 und IL-5 in der Spätphase in hohen Konzentrationen im Nasensekret freigesetzt. Es war jedoch bei keinem der gemessenen Mediatoren und Zytokine eine signifikante Konzentrationserhöhung als direkte Folge der wiederholten Provokation zu erkennen. Eine gesteigerte Produktion von Histamin, ECP oder der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 kann daher nicht als direkte Grundlage des Primingeffektes gesehen werden, sondern als Faktoren der chronifizierten allergischen Entzündung. Der fehlende direkte Zusammenhang zwischen den Parametern der Entzündung in der Spätphase und den Symptomen liegt wesentlich darin begründet, dass die Wirkungen dieser Stoffe nicht die Endorgane betreffen, sondern indirekt erfolgen.

Gibt es Unterschiede in der Früh- und Spätphase?

In der Frühphase ließ sich Histamin in zunächst ansteigender Konzentration nachweisen, diese fiel jedoch am dritten Provokationstag wieder auf den Ausgangswert zurück. Eine Ursache für diesen Konzentrationsabfall könnte eine Ausschöpfung der Histaminspeicher in den Granula der Mastzellen sein. In Analysen des Erholungs-Zyklus von Mastzellen nach IgE-getriggelter Degranulation zeigt sich eine fast vollständigen Ausschüttung der Histamingranula, die innerhalb von 3-48h erneut gefüllt werden können. Der Abfall der Histaminkonzentration könnte durch eine Erschöpfung der Synthesefähigkeit nach mehreren Degranulationszyklen erklärt werden.

Wir konnten zeigen, dass nach einer erneuten Allergenbelastung, bzw. Allergenprovokation die subjektiv empfundenen histamininduzierten Symptome (Niesen, Juckreiz, Sekretion) in der Frühphase im Sinne eines Primingeffektes zunahmen. Die Ursache kann jedoch nicht nur auf die Histaminausschüttung zurückgeführt werden, denn die ermittelten Konzentrationsverläufe zeigten keine kontinuierlich ansteigenden Werte. Eine experimentelle nasale Provokation mit Histamin durch Gronborg et al. unterstützt diese Ergebnisse. Er konnte

nachweisen, dass eine ausschließliche Provokation mit Histamin oder Metacholin keinen Primingeffekt hervorruft.

Der Konzentrationszunahme von ECP am zweiten und dritten Provokationstag in der Frühphase kann ebenfalls nicht auf die direkte Einwirkung der Allergenprovokation zurückgeführt werden. Ein Anstieg der ECP-Konzentration ist frühestens 1h bis 24h nach Allergenkontakt zu erwarten. Der Anstieg an den Folgetagen ist daher als Allergenwirkung der Provokation vom Vortag zu interpretieren. ECP kann demnach kein für den Primingeffekt auslösender Faktor sein.

Im Gegensatz zu IL-4, das in der Frühphase nur in niedrigsten Konzentrationen messbar war, konnte eine hohe, jedoch über drei Tage gleichbleibender IL-5-Konzentration in der Frühphase nachgewiesen werden, die initial von Mastzellen, später von eingewanderten eosinophilen Granulozyten stammen könnte. In der Literatur ist mehrfach ein Zusammenhang zwischen einer gesteigerten IL-5-Konzentration und der Stärke der Symptomatik beschrieben worden. Trotz der hohen IL-5-Konzentrationen fand an den aufeinanderfolgenden Tagen keine Konzentrationszunahme statt. Sowohl die in der Frühphase ermittelten Konzentrationsverläufe als auch die Analyse der Spätphase ergaben trotz widersprüchlicher Aussagen in der Literatur keinen Zusammenhang zur Progredienz der Symptomatik im Sinne des Primingeffektes in der Frühphase. Der mangelnde Effekt auf die Frühphase wurde im Rahmen der Erforschung der Anti-IL-5 Therapie ebenfalls festgestellt.

Histamin war in der Spätphase trotz fehlender typischer Symptomatik in höherem Maße nachweisbar, als in der Frühphase. Es findet Stunden nach Allergenprovokation ein Einstrom basophiler Granulozyten statt, die dann nachweislich die Hauptquelle des Histamin darstellen. Trotz der hohen Konzentrationen von Histamin in der Spätphase standen nicht die Akutsymptome Niesreiz, Juckreiz und wässrige Rhinorrhoe im Vordergrund. Die Wirkung des spät sezernierten Histamin scheint sich deutlich vom frühen Histamineffekt zu unterscheiden.

In der Spätphase zeigten sich zunächst hohe Konzentrationen von ECP, IL-4 und IL-5 als Zeichen eines zellulären Influxes von Th2-Lymphozyten. In unserer Studie bestätigte sich dies im zytologischen Präparat, in dem ein ansteigender Anteil

mononucleärer Zellen zu sehen war. Die Konzentrationen der Th2-Zytokine fielen jedoch signifikant über den dreitägigen Verlauf ab.

IL-4 scheint bei initial hoher Konzentration eine kurz anhaltende Präsenz und eine hohe Abbaurate zu haben. Die deutliche Abnahme der IL-4-Konzentration im Verlauf der Spätphase kann nicht letztendlich geklärt werden. Die Messbarkeit des IL-4 im Nasensekret hängt in-vivo möglicherweise von gesteigerter Metabolisation oder Rezeptorbindung ab. Auch eine Gegenregulation auf Zytokinebene in Richtung Th1-Antwort wird diskutiert. In unserer Studie war kein zeitlicher Zusammenhang zwischen Konzentrationsanstieg und Symptomausprägung zu erkennen. Bei hohen Konzentrationen von IL-4 in der Spätphase zeigten sich keinerlei Effekte in Bezug auf Symptomscore, Niesreiz und Sekretion. Der Effekt des IL-4 scheint auch in anderen Studien kein direktes klinisches Korrelat im Sinne von gesteigerter Symptomatik zu haben.

Die Konzentration von IL-5 war über die drei Provokationstage deutlich erhöht. In unserer Studie zeigte sich in der Spätphase zunächst eine deutliche Steigerung der IL-5-Konzentration. Trotz der hohen IL-5-Konzentrationen fand an den aufeinanderfolgenden Tagen, vergleichbar mit IL-4, ein signifikanter Konzentrationsabfall statt. Sowohl die in der Frühphase ermittelten Konzentrationsverläufe als auch die Analyse der Spätphase ergaben trotz widersprüchlicher Aussagen in der Literatur keinen Zusammenhang zur Progredienz der Symptomatik im Sinne des Primingeffektes. Der Einfluss auf den Influx eosinophiler Granulozyten war vorhanden, da es zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils der Eosinophilen im Zellpräparat der Nasenlavage kam.

Sind Reflexe und neuronale Mechanismen mitbetroffen?

Durch einseitige Allergenprovokationen, z.B. mit der Disc-Methode, ist bereits in mehreren Studien nachgewiesen worden, dass die allergische Reaktion sich ohne direkten Kontakt des Allergen zur Schleimhaut auf die kontralaterale Seite überträgt. Die Reaktion beinhaltet eine Steigerung der Sekretion, der Obstruktion, des Niesreizes. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von allergiespezifischen Mediatoren, wie z.B. Histamin. Auch ein zellulärer Influx ist zu verzeichnen. In unserer Studie ist im Vergleich der drei aufeinanderfolgenden

Provokationstage ebenfalls eine signifikante Steigerung der kontralateralen Sekretion und des Niesens im Sinne des Primingeffektes in der Frühphase aufgetreten. In der Spätphase zeigte sich in unserer Studie bei unilateraler Provokation ein Anstieg der Histaminkonzentration auf der Gegenseite, der auch von basophilen Granulozyten stammen muss, die aufgrund von reflektorischen Mechanismen unabhängig vom Allergenkontakt eingewandert sind.

Die angestellten Vermutungen legen nahe, dass der in der Versuchssituation ausgelöste Primingeffekt in der Frühphase maßgeblich durch neurogene Mechanismen induziert wurde. Die Erhöhung der neural vermittelten Parameter Niesen und kontralaterale Sekretgewichte nach wiederholter Allergenprovokation ließe sich durch eine reduzierte Reizschwelle der sensorischen Afferenzen oder eine gesteigerte Reagibilität der Endorgane erklären. Ursache könnte der vermehrte Einfluss von Neuropeptiden sein.

6. Literaturverzeichnis

Altman, L.C.; Ayars, G.H.; Baker, C. et al.:

Cytokines and eosinophil-derived cationic proteins upregulate intercellular adhesion molecule-1 on human nasal epithelial cells.

J Allergy Clin Immunol 1993; 92: 527-536

Arzubiaga, C.; Morrow, L.; Roberts, L. und Biaggioni, I.:

Neuropeptide Y, a putative cotransmitter in noradrenergic neurons, induces mast cell degranulation but not prostaglandin D2 release.

J Allergy Clin Immunol 1991; 87: 88-93

Bachert, C.; Schindelbeck, G.; Hauser, U.:

Cellular infiltration in allergic late-phase reaction of the nose: Immunohistochemical studies.

Am J Rhinol 1991; 5 (6): 227-233

Bachert, C.:

Histamine - a major role in allergy?

Clinical and Experimental Allergy 1998; 28, Suppl. 6: 15-19

Bachert, C.; van Kempen M. und Van Cauwenberge P.:

Regulation of proinflammatory cytokines in seasonal allergic rhinitis.

Int Arch Allergy Immunol 1999; 118: 375-379

Bacon, J.R.; McLean, J.A.; Mathews, K.P. et al.:

Priming of the nasal mucosa by ragweed extract or by an irritant (ammonia).

J Allergy Clin Immunol 1981; 67(2): 111-116

Baraniuk, J.N.:

Pathogenesis of allergic rhinitis.

J Allergy Clin Immunol 1997; 99: 763-772

Baraniuk, J. N.:

Neuropeptides.

American Journal of Rhinology 1998, 12 : 9-16

Baroody, F.M.; Wagenmann, M.; Naclerio, R.M.:

Comparison of the secretory response of the nasal mucosa to methacholine and histamine.

J App Physiol 1993; 74(6): 2661-2671

Bascom, R.; Pipkorn, U.; Lichtenstein, L.M. und Naclerio, R.M.:

The influx of inflammatory cells into nasal washings during the late response to antigen challenge.

Am Rev Respir Dis 1988; 138: 406-412

Bascom, R.; Wachs, R.; Naclerio, R.M. et al.:

Basophil influx occurs after nasal antigen challenge: effects of topical corticosteroid pretreatment.

J Allergy Clin Immunol 1988; 81: 580-589

Becker, W.-M.; Bufe, A. ;Kleine-Tebe, J. et al.:

Positionspapier der DGAI zur in-vitro-Allergiediagnostik.

Allergo J 2000

Bousquet, J. et al.:

Eosinophilic inflammation in asthma

New Engl J Med 1990; 323: 1033-1039

Bousquet, J.; Vignola, A.M.; Campbell, A.M.; Michel, F.:

Pathophysiology of allergic rhinitis.

Int Arch Allergy Immunol 1996; 110: 207-218

Cieslewicz, G.; Tomkinson, A.; Adler, A. et al.:

The late, but not early, asthmatic response is dependent on IL-5 and correlates with eosinophil infiltration.

J Clin Invest 1999; 104 (3): 301-308

Connell, J.T.:

Quantitative intranasal pollen challenges. III. The priming effect in allergic rhinitis.

J Allergy 1969; 43: 33-44

Danzig, M.; Cuss, F.:

Inhibition of interleukin-5 with a monoclonal antibody attenuates allergic inflammation.

Allergy 1997, 52: 787-794

Dubucquoi, S. Desreumaux, P.; Janin, A. et al.:

Interleukin-5 synthesis by eosinophils: Association with granules and immunoglobulin-dependent secretion.

J Exp Med 1994; Feb 1; 179 (2): 703-708

Durham, S.R.; Ying, S.; Varney, V.A. 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): 2390-2394

Durham, S.R.; Ying, S.; Varney, V.A. 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: 1356-1365

Dvorak, A.M.; Schleimer, R.P.; Schulman, E.S. und Lichtenstein, L.M.:

Human mast cells use conservation and condensation mechanisms during recovery from degranulation. In vitro studies with mast cells purified from human lungs.

Lab Invest 1986; 54 (6): 663-678

Dvorak, A.M.; Schleimer, R.P. und Lichtenstein, L.M.:

Human mast cells synthesize new granules during recovery from degranulation. In vitro studies with mast cells purified from human lungs.

Blood 1988; 71 (1): 76-85

Grewe, M.; Czech, W.; Morita, A. et al.:

Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses.

J Immunol 1998; Jul 1; 161 (1): 415-420

Gronborg, H.; Borum, P. und Mygind, N.:

Histamin and methacholine do not increase nasal reactivity.

Clin Allergy 1986; 16:597-602

Iliopoulos, O.; Baroody, F.M.; Naclerio, R.M. et al.:

Histamine-containing cells obtained from the nose hours after antigen challenge have functional and phenotypic characteristics of basophils.

J Immunol 1992; 148: 2223-2228

Jacobson, L.; Dreborg, S.; Ferduosi, H.A. et al.:

Prevention of asthma by specific immunotherapy (the PAT study). Five year follow up.

Allergy, 1998; 53: (Suppl): 168

Juliusson S.; Bende, M.:

Priming effect of a birch pollen season studied with laser Doppler flowmetry in patients with allergic rhinitis.

Clin Allergy 1988; 18:615-618

Juliusson, S.; Pipkorn, U.; Karlsson, G. und Enerbäck, L.:

Mast cells and eosinophils in the allergic mucosal response to allergen challenge: Changes in distribution and signs of activation in relation to symptoms.

J Allergy Clin Immunol 1992; 90: 898-909

Kakinoki, Y.; Ohashi, Y.; Kato, A. et al.:

Seasonal increase in specific IgE in serum induced by natural Japanese cedar pollen exposure in asymptomatic and symptomatic sensitized individuals.

Acta Otolaryngol Suppl 1998; 538: 152-155

Kay, A.B.; Ying, S.; Durham, S.R.:

Phenotype of cells positive for interleukin-4 and interleukin-5 mRNA in allergic tissue reactions.

Int Arch Allergy Immunol 1995; 107:208-210

Klimek, L.; Rasp, G.:

Zellaktivierungsmarker bei Rhinitis und Rhinosinusitis; Teil 1: Eosinophiles kationisches Protein (ECP).

Laryngo-Rhino-Otol. 1996; 75: 665-670

Konno, A.; Terada, N.; Okamoto, Y. und Togawa, K.:

The role of chemical mediators and mucosal hyperreactivity in nasal hypersecretion in nasal allergy.

J Allergy Clin Immunol 1987; 79: 620-626

Maggi, E.; Parronchi, P.; Manetti, R. et al.:

Reciprocal regulatory effect of IFN- γ and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones.

J Immunol 1992; 148: 2142-2147

MacDonald, S.M.; Langdon, J.M.; Greenlee, B.M. et al.:

IgE-dependent histamine-releasing factors.

Int Arch Allergy Appl Immunol 1991; 94: 144-147

Malmberg, H. ; Binder, E.; Fräki, J. et al:

Nasal reactions elicited by unilateral allergen challenge.

Acta Otolaryngol (Stockh) 1989; 107: 446-449

Martin, L.B.; Kita, H.; Leiferman, K.M. und Gleich, G.J.:

Eosinophils in allergy: role in disease, degranulation, and cytokines.

Int Arch Allergy Immunol 1996; 109: 207-215

Metzger H.G.; Alcaraz, R.; Hoffman, J.P. et al.:

The receptor with high affinity for immunoglobulin E.

Annu Rev Immunol 1986; 4 : 419-470

Mosmann, T..R.; Coffman, R. L.:

Heterogeneity of cytokine secretion patterns and function of helper T cells.

Adv Immunol 1989; 46: 111-147

Mosimann, B.L.; White, M.V.; Hohman, R.J. et al.:

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

Naclerio, R.M.; Meier, H.L.; Kagey-Sobotka, A. et al.:

Mediator release after nasal airway challenge with allergen.

Am Rev Respir Dis 1983; 128: 597-602.

Naclerio, R.M.; Proud, D.; Togias, A. et al.:

Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis.

N Engl J Med 1985; 313: 65-70

Naclerio, R.M.:

The pathophysiology of allergic rhinitis: Impact of therapeutic intervention.

J Allergy Clin Immunol 1988; 82: 927-934

Naclerio, R. and Solomon, W.:
Rhinitis and inhalant allergens.
JAMA 1997; 278: 1842-1848

Nakai, Y.; Ohashi, Y.; Kakinoki, Y. et al.:
Allergen-induced mRNA expression of Il-5, but not of Il-4 and IFN- γ in peripheral
blood mononuclear cells is a key feature of clinical manifestation of seasonal
allergic rhinitis.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2000; 126: 992-996

Nicolai T. ; Bellach B. ; von Mutius E. et al.:
Increased prevalence of sensitization against aeroallergens in adults in West
compared with East Germany.
Clin Exp Allergy 1997; 27: 886-892

Nouri-Aria, K.T.; O'Brian, F.; Noble, W. et al.:
Cytokine expression during allergen-induced late nasal responses: Il-4 and Il-5
mRNA is expressed early (at 6 h) predominantly by eosinophils.
Clin Exp All 2000; 30: 1709-1716

Nowak D.; Heinrich J.; Jörres R. et al.:
Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy
among adults: West and East Germany.
Eur Respir J 1996; 9: 2541-2553

Pène, J.; Rousset, F.; Brière, F. et al.:
IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and
suppressed by interferons γ and α and prostaglandin E_2 .
Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 6880-6884

Philip, G.; Sanico, A.M. und Togias, A.:
Inflammatory cellular influx follows capsaicin nasal challenge.
Am Respir Crit Care Med 1996; 153: 1222-1229

Plaut, M.; Pierce, J.H.; Watson, C. J. et al.:

Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc ϵ RI or to calcium ionophores.

Nature 1989; Vol 339: 64-67

Raphael, G.D.; Meredith, S.D.; Baraniuk, H.M. et al.:

Pathophysiology of rhinitis. II: Assessment of the sources of protein in histamine-induced nasal secretions.

Am Rev Respir Dis 1989; 139: 791-800

Rasp, G.; Thomas, P.A. und Bujia, J.:

Eosinophil inflammation of the nasal mucosa in allergic and non-allergic rhinitis measured by eosinophil cationic protein levels in native nasal fluid and serum.

Clinical and Experimental Allergy 1994; Vol. 24: 1151-1156

Resnick, M.B.; Weller, P.F.:

Mechanisms of eosinophil recruitment.

Am J Respir Cell Mol Biol 1993; 8; 349-355

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: 224-230

Schleimer, R.P.; Sterbinsky, S.A.; Kaiser, J. et al.:

IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium.

J Immunol 1992; 148: 1086-1092

Simon, H.-U.; Blaser, K. et al.:

Inhibition of programmed eosinophil death : a key pathogenic event for eosinophilia?

Immunol Today 1995; 16: 53-55

Simon, H.-U. et al.:

Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia.

J Immunol 1997 ; 158: 3902-3908

Skoner, D.P.; Doyle, W.J.; Boehm S.; Fireman, P.:

Priming of the nose and eustachian tube during natural pollen season.

Am J Rhinol 1989; 3(2): 53-57

Sondergutachten "Umwelt und Gesundheit". Risiken richtig einschätzen.

Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen.

Stuttgart: Metzler-Poeschel, 1999

Stoop, A.E.; Hamelers, D.M.H.; v. Run, P.E.M. et al.:

Lymphocytes and nonlymphoid cells in the nasal mucosa of patients with nasal polyps and of healthy subjects.

J Allergy Clin Immunol 1989; 84: 734-741

Swain, S.; Weinberg, A.D.; English, M. und Huston G.:

IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors.

J Immunol 1990; 145: 3796-3806

Terada, N.; Konno, A.; Tada, H. et al.:

The effect of recombinant human interleukin-5 on eosinophil accumulation and degranulation in human nasal mucosa.

J Allergy Clin Immunol 1992; 90: 160-168

Terada, N.; Konno A.; Fukuda, S. et al.:

Interleukin-5 upregulates intercellular adhesion molecule-1 gene expression in the nasal mucosa in nasal allergy but not in nonallergic rhinitis.

Int Arch Allergy Immunol 1995; 106: 139-145

The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)
Steering Committee.

Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic
rhinoconjunctivitis and atopic eczema: ISAAC.

Lancet 1998; 351: 1225-1232

Undem, B.J.; Meyers, A.C. und Weinreich, D.:

Antigen-induced modulation of autonomic and sensory neurons in vitro.

Arch Allergy Appl Immunol 1991, 94: 319-324

Varney, V.A.; Jacobson, M.R.; Sudderick, R.M. et al.:

Immunohistology of the nasal mucosa following allergen-induced rhinitis.

Identification of activated T lymphocytes, eosinophils and neutrophils.

Am Rev Respir Dis 1992; 146 (1): 170-176

Wachs, M.; Proud, D.; Lawrence, M. et al.:

Observations on the pathogenesis of nasal priming.

J Allergy Clin Immunol 1989; 84: 492-501

Wagenmann, M.; Baroody, F.M.; Kagey-Sobotka, A. et al.:

The effect of terfenadine on unilateral nasal challenge with allergen.

J Allergy Clin Immunol 1994; 93 (3): 594-605

Wagenmann, M.; Baroody, F.M.; Desroisiers, M. et al.:

Unilateral nasal allergen challenge leads to bilateral release of prostaglandin D₂.

Clin Exp Allergy 1996; 26 (4): 371-378

Wagenmann, M., Baroody, F.M.; Cheng, C. et al.:

Bilateral increases in histamine after unilateral nasal allergen challenge.

Am J Respir Crit Care Med 1997; 155: 426-431

Walsh, G.M.; Hartnell, A.; Wardlaw, A. J. et al.:

IL-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/18)-dependent manner.

Immunology 1990, 71 (2): 258-265

Wang, D.; Clement, P.; Smitz, J. und Derde, M.:

Concentrations of chemical mediators in nasal secretions of patients with hay fever during natural allergen exposure.

Acta Otolaryngol (Stockh) 1994; 114: 552-555

Wang, D.; Clement, P.; Smitz, J. und Derde M.:

Concentrations of chemical mediators in the nasal secretions after nasal allergen challenge in atopic patients.

Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl. 1995; 1: S40-43

Wang, D.; Clement, P.; Smitz, J. et al.:

Correlations between complaints, inflammatory cells and mediator concentrations in nasal secretions after nasal allergen challenge and during natural allergen exposure. Int Arch Allergy Immunol 1995; 106: 278-285

Wang, D.; Clement, P.; Smitz, J. et al.:

Monitoring nasal allergic inflammation by measuring the concentration of eosinophil cationic protein and eosinophils in nasal secretions.

Allergy 1995; 50: 147-151

Wang, D.; Clement, P.; De Waele, M.; Derde, M.:

Study of nasal cytology in atopic patients after nasal allergen challenge.

Rhinology 1995; 33: 78-81

Wang, M.; Saxon, A. und Diaz-Sanchez, D.:

Early IL-4 production driving Th2 differentiation in a human in vivo allergic model is mast cell derived.

Clin Immunol 1999; 90: 47-54

Wang, J.M.; Rambaldi, A.; Biondi, A. et al.:

Recombinant human interleukin 5 is a selective eosinophil chemoattractant.

Eur J Immunol 1989; 19: 701-705

World Health Organization (WHO): Bousquet, J.; Lockey, R.F. ; Malling, H. et al.:
WHO Position Paper: Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases.

Allergy 1998; 53 (Suppl 44): 1-42

Wright, E.D.; Christodoulopoulos, P; Small, P. et al.:

Th-2 type cytokine receptors in allergic rhinitis and in response to topical steroids.

Laryngoscope 1999, 109: 551-556

Yamaguchi, Y.; Hayashi, Y.; Sugama, Y. et al.:

Highly purified murine interleukin-5 stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor.

J Exp Med 1988; May 1; 167 (5): 1737-1742

Yamaguchi, Y.; Suda, T.; Suda, J. et al.:

Purified interleukin-5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors.

J Exp Med 1988; Jan 1; 167 (1): 43-56

Yamaguchi, Y.; Suda, T.; Ohta, K. et al.:

Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils.

Blood 1991; 78 (10): 2542-2547

Ying, S.; Durham, S.R.; Jacobson, M.R. et al.:

T lymphocytes and mast cells express messenger RNA for interleukin-4 in the nasal mucosa in allergen-induced rhinitis.

Immunology 1994; 82: 200-206

Young, J.D.; Peterson, C.G.; Venge, P. und Cohn, Z.A.:

Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein.

Nature 1986; Vol. 321 5 June: 613-615

7. Anhang

- Symptomscore
- Muster Einverständniserklärung

Probandennr.:
Probandeninitialen:

Datum:
Messung:

Termin:

Symptomscore:

Bitte mit einem Strich die Intensität markieren:

Sekretion der Nase:

gar nicht

maximale Symptomatik

Obstruktion der Nase:

gar nicht

maximale Symptomatik

Jucken in der Nase/Ohren/Rachen/Augen:

gar nicht

maximale Symptomatik

Niesen:

Ergebnis Atemwiderstandsmessung:

Flow	150 ccm/s
L	R + L =
R	L / R =



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT
DÜSSELDORF
MEDIZINISCHE EINRICHTUNGEN

Hals-, Nasen- und Ohrenklinik
Direktor: Universitätsprofessor Dr. U. Ganzer

Einverständniserklärung zur Durchführung nasaler Allergenprovokationen

Im Rahmen unserer Studien zur Untersuchung der allergischen Rhinitis möchten wir bei Ihnen eine nasale Provokation mit Allergen durchführen. Dazu werden wir 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 entweder mit einem Spray oder einer kleinen Filterpapierscheibe. 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 Ihr Nasensekret sammeln und zwar entweder mit Hilfe von Lavagen (das sind Spülungen mit einer physiologischen Kochsalzlösung) oder durch das Auflegen von kleinen Filterpapierscheibchen (Discs) auf die Nasenschleimhaut. In diesem Sekret möchten wir verschiedene Substanzen, die als Antwort auf die Allergenprovokation in Ihrer Nase produziert werden, messen.

Risiken:

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.

Extrem selten kann es nach einer nasalen Allergenprovokation zum Auftreten von Allgemeinsymptomen im Sinne eines anaphylaktischen Schocks kommen. 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. Anzeichen für die Entwicklung eines anaphylaktischen Schocks wären ein Hautausschlag, Jucken der Handflächen, Atemnot, Kurzatmigkeit, schneller Pulsschlag, Unruhe.

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

Komplikationen durch die beiden Methoden zum Gewinnen des Nasensekrets sind nicht bekannt.



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT
DUSSELDORF
MEDIZINISCHE EINRICHTUNGEN

Hals-, Nasen- und Ohrenklinik

Direktor: Universitätsprofessor Dr. U. Ganzer

Haben Sie noch Fragen zu den zuvor geschilderten Risiken oder der Durchführung der Allergenprovokation?

Wenn Sie alles verstanden haben und einverstanden sind, unterschreiben Sie bitte dieses Dokument:

Hiermit stimme ich der Durchführung nasaler Allergenprovokationen im Rahmen der mir geschilderten Studien zu.

Name _____

Ort und Datum _____ Unterschrift _____

Die Aufklärung erfolgte durch:

1. Name _____

Ort und Datum _____ Unterschrift _____

2. Name _____

Ort und Datum _____ Unterschrift _____

Danksagung

Ich danke meinem Oberarzt, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Martin Wagenmann für die Überlassung des Themas und die konstruktiven Anregungen.

Meinem Doktorvater, dem Direktor der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Uniklinik Düsseldorf, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Uwe Ganzer danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Markus Grewe danke ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Bei allen Mitarbeitern des HNO-Forschungslabors bedanke ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und die tatkräftige Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zum Primingeffekt bei der allergischen Rhinitis durch wiederholte Allergenprovokation“ 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 Mai 2003

Lebenslauf

Claudia Jonkmanns
Am Steinberg 52
40225 Düsseldorf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 23. August 1972
Geburtsort: Dinslaken
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung:

1979 - 1983 Grundschule an der Gartenstraße in Dinslaken
1983 - 1992 Theodor-Heuss-Gymnasium in Dinslaken, Abschluss Abitur

Studium:

1992 - 1999 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität (HHU), Düsseldorf
August 1994 Ärztliche Vorprüfung
August 1995 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1998 – 1999 Praktisches Jahr in der Uniklinik Düsseldorf und in der Marshfield Clinic, Wisconsin, USA
Mai 1999 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

1999 – 2000 Ärztin im Praktikum in der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Uniklinik Düsseldorf
seit Februar 2001 Weiterbildung zur Fachärztin für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Uniklinik Düsseldorf

Düsseldorf, im Mai 2003

Claudia Jonkmanns

„Untersuchungen zum Primingeffekt bei der allergischen Rhinitis durch wiederholte Allergenprovokation“

Der Primingeffekt bei der allergischen Rhinitis wurde erstmals 1969 von John T. Connell beschrieben. Er konnte feststellen, dass nach wiederholten Allergenprovokationen deutlich geringere Pollenmengen zur Auslösung einer verstärkten allergischen Reaktion der Nasenschleimhaut führten und nannte dieses Phänomen den "priming effect". In unserer Studie wurde der Primingeffekt bei der allergischen Rhinitis durch wiederholte Allergenprovokationen experimentell erzeugt und untersucht. Dazu wurden bei 12 Probanden mit einer saisonalen allergischen Rhinitis außerhalb der Saison an drei aufeinanderfolgenden Tagen Allergenprovokationen mit der Disc-Methode durchgeführt.

Lässt sich Priming experimentell reproduzieren?

Im Vergleich der drei aufeinanderfolgenden Provokationstage ließ sich der Primingeffekt experimentell reproduzieren. Er trat jedoch ausschließlich in der Frühphase auf. Es kam zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl des Niesens und des ipsi- und kontralateralen Sekretgewichtes und zu einem Anstieg des Symptomscores in der Frühphase über drei aufeinanderfolgende Tage. Die Auswertung der Spätphase ergab keine messbare Steigerung hinsichtlich der erfassten Symptome.

Führt Priming zu einer gesteigerten Mediator- und Zytokinfreisetzung?

Durch die Allergenprovokation wurde Histamin und IL-5 in der Frühphase, Histamin, ECP, IL-4 und IL-5 in der Spätphase in hohen Konzentrationen im Nasensekret freigesetzt. Es war jedoch bei keinem der gemessenen Mediatoren und Zytokine eine signifikante Konzentrationserhöhung als direkte Folge der wiederholten Provokation zu erkennen.

Sind Reflexe und neuronale Mechanismen mitbetroffen?

Im Vergleich der drei aufeinanderfolgenden Provokationstage ist eine signifikante Steigerung der kontralateralen Sekretion und des Niesens in der Frühphase aufgetreten. In der Versuchssituation könnte der Primingeffekt maßgeblich durch neurogene Mechanismen induziert worden sein. Er ließe sich durch eine reduzierte Reizschwelle der sensorischen Afferenzen oder eine gesteigerte Reagibilität der Endorgane erklären. Ursache könnte der vermehrte Einfluss von Neuropeptiden sein.



Univ.-Prof. Dr. med. U. Ganzer