

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

Die Zytokinproduktion von T-Zellen und Makrophagen bei Polyposis nasi

**Dissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
vorgelegt von
Adam Chaker
2005**

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

gez. Herr Univ.-Prof. Dr.med. Wolfgang H. M. Raab
Dekan der Medizinischen Fakultät

Referent: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Martin Wagenmann

Korreferentin: Frau Prof. Dr. med. Antje Schuster

Meinen Eltern.

**Our knowledge can only be finite,
while our ignorance must necessarily be infinite.**

Karl R. Popper

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|--|-------|
| <u>1. Einleitung</u> | 1 |
| Polyposis nasi | 1 |
| Begriffliche und klassifikatorische Abgrenzungen | 2 |
| Symptome | 3 |
| Diagnostik | 3 |
| Therapie | 6 |
| Rezidive | 7 |
| Pathophysiologische Vorstellungen | 8 |
| Allergische Rhinosinusitis | 8 |
| Die Immunbiologie der allergischen Rhinosinusitis | 10 |
| Antigenpräsentierende Zellen | 10 |
| T-Zellen | 10 |
| Bildung eines <i>Microenvironments</i> | 11 |
| Th1- und Th2- Subtypen: unterschiedliche Zytokinsekretionsmuster | 12 |
| Zytokine und ihre Relevanz für mögliche Therapien | 12 |
| Zytokine und Polyposis nasi | 13 |
| Fragestellung | 14 |
| | |
| <u>2. Material und Methoden</u> | 15 |
| Patientenkollektiv | 15 |
| Probenmaterial | 15 |
| Generieren einer Einzelzellsuspension | 16 |
| Immunomagnetische Zellseparation | 16 |
| Zellzählung und Viabilitätskontrolle | 19 |
| Messung von Zytokinen mit dem ELISPOT | 20 |
| Messprinzip | 20 |
| Durchführung des ELISPOT-Assay | 21 |
| Detaillierter Aufbau des ELISPOT-Assay | 21 |
| Auswertung und Statistik | 25 |
| Auswertung | 25 |

| | |
|--|----|
| Statistik | 25 |
| <u>3. Ergebnisse</u> | 26 |
| Proinflammatorische Th1- und Th2- Zytokine bei Polyposis nasi | 26 |
| Th1- und Th2-Zytokine bei allergischen und nichtallergischen Polyposispatienten | 29 |
| Die Produktion von Th1- und Th2-Zytokinen bei Patienten mit einer Samters-Triade | 32 |
| Die Zytokinproduktion durch T-Zellen (CD3) | 36 |
| Die Zytokinproduktion durch Makrophagen (CD14) | 41 |
| <u>4. Diskussion</u> | 47 |
| Die Messung von Zytokinen mit dem ELISPOT-Assay | 47 |
| Drei Methoden der Zytokinmessung | 47 |
| Welche Zytokine wurden gemessen? | 48 |
| Immunomagnetische Zellseparation | 50 |
| Das Problem der Depletion und der Zytoselektion | 50 |
| Antikörperbeschichtete magnetisierte Beads | 50 |
| Welche Zellen sind für eine Depletion und positive Selektion interessant? | 52 |
| Grenzen der Methode | 52 |
| Ätiologische Überlegungen | 53 |
| Die Superantigenhypothese | 53 |
| Wird Polyposis nasi durch Pilze verursacht? | 54 |
| Eine instrumentelle Hypothese. | 55 |
| Die Produktion von Zytokinen bei Polyposis nasi | 55 |
| Der ELISPOT zeigt bei Polyposis nasi eine erhöhte Produktion von Th1 und Th2- Zytokinen. | 55 |
| Es stellen sich keine Unterschiede in der Zytokinproduktion bei Polyposispatienten mit allergischer Sensibilisierung oder Patienten mit Samters-Trias dar. | 56 |
| Eine allergische Genese der Polyposis ist unwahrscheinlich. | 56 |
| Es gibt keinen Anhalt für einen protektiven Effekt durch Th1-Zytokine | 57 |
| Die Zytokinproduktion durch T-Zellen bei Polyposis nasi | 57 |

| | |
|---|----|
| Das CD3-Antigen | 57 |
| T- Zellen sind eine wichtige Quelle von IL-5 und IFN- γ bei Polyposis nasi – aber nicht die Alleinige. | 58 |
| Die Zytokinproduktion durch Makrophagen bei Polyposis nasi | 61 |
| Depletion CD14 positiver Zellen | 61 |
| Die erhöhte Produktion von IL-12 bei Polyposis nasi ist nicht auf Makrophagen zurückzuführen. | 62 |
| Die funktionelle Relevanz des IFN- γ - IL-12 Regelkreises | 62 |
| Eine CD14 abhängige IL-8 Produktion | 64 |
| Polyposis nasi- kein Nachweis einer Th1- oderTh2-Polarität | 64 |
| T-Zellen produzieren Th1- und Th2-Zytokine bei Polyposis nasi | 64 |
| Andere zytokinproduzierende Zellen bei Polyposis nasi | 65 |
| | |
| <u>5. Literaturverzeichnis</u> | 66 |
| | |
| <u>6. Zusammenfassung</u> | 70 |
| | |
| <u>7. Anhang</u> | 71 |
| Eidstattliche Erklärung | 71 |
| Curriculum Vitae | 72 |
| Danksagung | 73 |

1. Einleitung

Polyposis nasi

Die Polyposis nasi ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung mit gutartigen, ödematösen Schleimhautprotrusionen der Nasennebenhöhlen- und Nasenschleimhaut, die die Nasennebenhöhlen und Nasenhaupthöhlen teilweise bis vollständig verlegen. Mit einer Prävalenz von 0,2-4,3 % ist sie eine deutlich seltenere Entität als andere chronische Erkrankungen der oberen Atemwege, z.B. die allergische Rhinosinusitis mit einer Prävalenz von 15-25% gemäß der ISAAC-Studie (von Mutius 1996) oder die chronische Rhinosinusitis mit 4 -15% Prävalenz (Kaliner, Osguthorpe et al. 1997; Chen, Dales et al. 2003).

Sie ist histologisch durch eine Infiltration mit eosinophilen Granulozyten und ein hohes Maß an Rekrutierung immunkompetenter Zellen charakterisiert. Es lassen sich neben Eosinophilen auch Basophile, Mastzellen, Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen nachweisen. Des Weiteren imponiert ein hyperplastisches, bindegewebiges Stroma und die Einlagerung von extrazellulärer Flüssigkeit (Fokkens, Holm et al. 1990; Linder, Karlsson-Parra et al. 1993; Lacroix, Zheng et al. 2002). Das Vorhandensein immunkompetenter Zellen geht mit der Sekretion von proinflammatorischen und regulatorischen Zyto- und Chemokinen einher, die auf die Zellen einwirken und von diesen selbst produziert werden.

In vielen Fällen ist die Polyposis nasi einem intrinsischem Asthma und einer Aspirinintoleranz (Syndrome de Widal, Samters oder ASA-Triade (Samter and Beers 1967; Widal, Abrami et al. 1987 / 1922), einer zystischen Fibrose (Mukoviszidose), dem Young-Syndrom oder syndromalen ziliären Dyskinesien (Karthagenersyndrom) assoziiert. Bei zystischer Fibrose, Young- oder Karthagenersyndrom tritt die nasale Polyposis jedoch im Kontrast zu den übrigen Formen mit einer dominierenden Infiltration neutrophiler Granulozyten auf (Rowe-Jones, Shembekar et al. 1997; Bachert, Houmelmann et al. 2003).

7-13 % aller Asthmatiker leiden an einer nasalen Polyposis, 6-10 % an einer Aspirinintoleranz. In der Gruppe der aspirinintoleranten Asthmatiker entwickeln bis zu 95 % eine Polyposis nasi. Während die Polyposis hinsichtlich ihrer Inzidenz mit dem Alter ansteigt und häufiger bei Männern auftritt, ist bei Assoziation zu einem Asthma keine Geschlechtspräferenz nachweisbar (Larsen 1996; Rugina, Serrano et al. 2002;

Bateman, Fahy et al. 2003). Gemäß Bacherts Übersicht zur Polyposis nasi (2003) haben ca. 25 % aller Patienten mit Polyposis eine Aspirinintoleranz, bis zu 40 % leiden an einem intrinsischen Asthma.

Autopsiestudien zeigen einen wesentlich höheren Anteil von Patienten mit Polyposis nasi: bis zu 40 % des im Rahmen einer Autopsiestudie untersuchten Kollektives zeigen polypöse Formationen der Nasennebenhöhlen (Larsen and Tos 2004).

Bei Patienten mit zystischer Fibrose finden sich je nach Autor bei zwischen 10-37% der Patienten nasale Polypen. (Hadfield, Rowe-Jones et al. 2000; Bateman, Fahy et al. 2003).

Begriffliche und klassifikatorische Abgrenzungen

Die Begriffe chronische Rhinitis, chronische Rhinosinusitis und chronisch-polypöse Rhinosinusitis werden im klinischen Sprachgebrauch häufig nur unscharf abgegrenzt: entgegen der in Deutschland häufig pseudogenau durchgeführten anatomisch-begrifflichen Trennung von Rhinitis und Rhinosinusitis hat sich im angelsächsischen Schrifttum der Begriff Rhinosinusitis unter der Vorstellung einheitlicher oberer Atemwege etabliert.

One airway- one disease ist das Schlagwort, mit dem eine generalisierte, aber nicht konkretisierte Schleimhautüberempfindlichkeit und der systemische Aspekt von Krankheiten der Atemwege hervorgehoben werden soll, auch wenn sie zunächst nur einen Teil der Atemwege betreffen. Bei jeder Rhinitis sind letztlich auch die Nasennebenhöhlenschleimhäute in die entzündlichen Prozesse involviert und bei Polyposis nasi findet sich häufig eine pulmonale Komponente. *One airway- one disease* akzentuiert aber vor allem die systemische Komponente der allergischen Rhinosinusitis und der sich hieraus mittelfristig ergebenden Gefahr eines allergischen Asthma.

Die Bezeichnungen „akut“ und „chronisch“ beziehen sich auf die Dauer der bestehenden Symptome: in der aktuellen Diskussion (Fokkens, EAACI 2004, Amsterdam) wird analog den Kriterien der ARIA (Bousquet 2003) zur allergischen Rhinosinusitis eine Symptompersistenz von bis zu 12 Wochen als akut, bei zudem symptomfreien Intervallen als intermittierend klassifiziert. Andere Autoren definieren hier eine Symptompersistenz bis 8 Wochen als Grenze.

Eine darüber hinaus andauernde Erkrankung wird als chronisch oder persistierend bezeichnet. Diese Klassifikation bezieht sich auf die Hauptsymptome: die nasale Obstruktion, die anteriore und posteriore Rhinorrhoe, Cephalgien sowie Gesichtsschmerzen und Hyposmie. Auf weitere Subklassifikationen in chronisch-rezidivierende und chronische Rhinosinusitis mit akuter Exazerbation wird hier nicht eingegangen.

Eine Polyposis ist immer mit entzündlichen Vorgängen verbunden, so dass eine Subsumtion zur chronischen Rhinosinusitis gerechtfertigt ist. Aber nicht jede chronische Rhinosinusitis ist eine Polyposis oder wird sich zu einer entwickeln. Die begriffliche Trennung bezieht sich also auf die Phänomenologie dieser Krankheiten, denn ob die Polyposis nun eine eigene Entität oder ein höheres Stadium einer chronischen Rhinosinusitis ist, ist Gegenstand der aktuellen Diskussion.

Symptome

Symptome einer chronisch-polypösen Rhinosinusitis sind neben einer permanenten Nasenatmungsbehinderung und Hypo- bis Anosmie auch eine aufgrund der Verlegung der Nasenhaupthöhle auftretende Rhinophonia clausa sowie eine posteriore Rhinorrhoe. Es können auch Cephalgien infolge der Ventilations- und Drainagestörungen der Nasennebenhöhlen oder infolge der Entzündungsreaktionen auftreten. Der Symptomkomplex wird jedoch im Vergleich zur nichtpolypösen chronischen Rhinosinusitis weniger von Cephalgien als von der Hyposmie und der zum Teil völligen nasalen Obstruktion dominiert.

Diagnostik

▪ Klinische Untersuchung

Neben einer anterioren Rhinoskopie zur orientierenden Beurteilung des Vestibulums, der Nasenhaupthöhle und septaler Deformitäten ist die nasale Endoskopie mit der starren 0°- oder 30°- Optik die standardisierte Vorgehensweise. Hierbei werden die Nasengänge, die einsehbaren Anteile der ostiomeatalen Einheit – der in die Nasenhaupthöhlen drainierenden Ostien der Nasennebenhöhlen - das Septum und der Nasenrachen genau inspiziert, sofern die Nasengänge nicht durch große polypöse Raumforderungen verlegt sind.

Polypen stellen sich makroskopisch als meist glasige, ödematöse, gräulich-blasige Raumforderungen dar. Eine weniger glatte Begrenzung und eine eher fleischige Konfiguration sollten vor allem bei einem streng einseitigem Befund den Verdacht auf tumoröse Läsionen, vor allem das submukös wachsende invertierte Papillom lenken. Auch eine allergische Pilzsinusitis kann als streng einseitige polypöse Sinusitis imponieren. Bei Verdacht auf eine ziliäre Dysfunktion ist ein Saccharintest (Stanley, MacWilliam et al. 1984) durchzuführen, der Goldstandard ist jedoch die Elektronenmikroskopie.

▪ Funktionelle Diagnostik der Nase

Hierzu gehören neben einem Riechtest (z.B. mit standardisierten *Sniffin' sticks*®) vor allem eine anteriore Rhinomanometrie zur Objektivierung des nasalen Flows. Ein Geschmackstest kann die funktionelle Diagnostik einer nur selten assoziierten echten Hypogeusie sinnvoll ergänzen. Experimentelle Modelle zur posterioren Geruchswahrnehmung (Landis, Giger et al. 2003) sind ebenfalls etabliert, ihr Eingang in die klinische Routine ist aber unwahrscheinlich.

▪ Bildgebung

Zur genauen Ausdehnungsbestimmung einer nasalen Polyposis hat sich die Computertomographie der Nasennebenhöhlen als Goldstandard erwiesen. Sie hat ihren Wert zum einen in der Klassifikation (Lund and Kennedy 1997; Malm 1997; Johansson, Akerlund et al. 2000) zum anderen ist sie hinsichtlich der Darstellung anatomischer Landmarken und der topographischen Beziehungen zur Schädelbasis, zur medialen Begrenzung der Orbita und zur Arteria carotis interna für die operative Vorgehensweise unverzichtbar. Die Durchführung einer Computertomographie mit definierten extrakraniellen Landmarken und das digitale Einmessen intraoperativ einzusetzender Instrumente ermöglicht eine intraoperative Navigation in dem anatomisch herausfordernden Gebiet. Diese inzwischen mehrfach weiterentwickelte, der Stereotaxie verwandte Navigationstechnologie (CAS= computer assisted surgery) lokalisiert die Instrumentenlage im Situs und bildet diese in der Schnittbildrekonstruktion auf den Millimeter genau ab. Der besondere Wert dieser Technologie liegt in der verbesserten intraoperativen Orientierung und kann insbesondere bei voroperierten Patienten die Sicherheit des Eingriffs verbessern.

Außerdem hat sie sich als wertvolles Hilfsmittel beim Erlernen endoskopischer endonasaler Nebenhöhlenoperationen erwiesen.

▪ Allergologische Diagnostik

Jeder Patient mit einer Polyposis nasi ist allergologisch abzuklären. Bereits durch ausführliche Anamnese lassen sich die Symptome eher chronisch-persistierenden oder akut-intermittierenden Beschwerden zuordnen und die Wahrscheinlichkeit einer allergischen Sensibilisierung taxieren. Als Suchtest ist der hochspezifische modifizierte Skin-Prick-Test am besten geeignet, da er im Vergleich zum Intrakutantest eine geringere Komplikationsrate besitzt. Die standardisierte Allergenlösung wird auf die Haut aufgetragen und mittels einer Pricknadel durch Anheben der Haut in die Cutis eingebracht. Auf diese Weise gelangen ca. 5 µl Allergenlösung in die Haut, das Risiko eines anaphylaktischen Schocks ist außerordentlich gering. Als Referenzmessungen werden Histamin- und Kochsalzkontrollen mitgeführt. Obwohl der modifizierte Skin-Prick-Test hochspezifisch ist, ist er je nach untersuchtem Allergen nur mäßig sensitiv. Hier empfiehlt sich bei manifestem Verdacht und negativem Testergebnis die Bestimmung von allergenspezifischen IgE-Antikörpern im Serum oder die Durchführung einer nasalen Allergenprovokation. Diese ist als Goldstandard anzusehen. Die spezifische Reaktion auf das applizierte Allergen wird mittels Symptomscore (Nasejucken, Niesen, Sekretbildung) und Messung des nasalen Flows durch eine anteriore Rhinomanometrie direkt am Erfolgsorgan objektiviert. Eine nasale Allergenprovokation kann jedoch aufgrund der völligen nasalen Obstruktion durch Polypen undurchführbar oder im postoperativen Zustand kontraindiziert sein. Der hochsensitive Nachweis allergenspezifischer IgE-Antikörper im Serum ist in seiner Aussage auf die Relevanz im Erfolgsorgan Nase eingeschränkt, aber die sensitivste Methode zur Bestimmung einer allergischen Sensibilisierung.

Anamnestisch ist in diesem Kontext in jedem Falle die Frage eines Asthma zu eruieren. Dieses kann als extrinsisches Asthma bei vorhandener allergischer Sensibilisierung oder im Symptomkomplex der Samters Triade (s.o.) als intrinsisches Asthma und einer Analgetikaintoleranz, typischer Weise als Aspirinsensitivität, auftreten.

Bei Verdacht auf ein solches Geschehen ist eine pulmonologische Diagnostik mit Spirometrie indiziert. Eine Aspirinprovokation ist in unklaren Fällen ebenfalls durchführbar.

Therapie

Es gibt im Prinzip zwei Vorgehensweisen zur Behandlung einer Polyposis:

Eine medikamentöse und eine operative.

Eine medikamentöse Therapie der Polyposis kann mit topischen Steroiden (Mygind 1999; Badia and Lund 2001) über einen mehrwöchigen Zeitraum oder mit systemischen Steroiden über einen kurzen Zeitraum (Lildholdt, Fogstrup et al. 1988; Holmberg and Karlsson 1996; Lildholdt, Rundcrantz et al. 1997; Scadding 2002; Ragab, Lund et al. 2004) erfolgen. Auch eine Kombination zu einem sequentiell gestalteten Schema - erst systemisch, dann topisch - ist möglich. Aktuelle Arbeiten aus der Arbeitsgruppe Lund und Scadding (Ragab, Lund et al. 2004) berichten, dass die medikamentöse Therapie bei chronischen Rhinosinuitiden (mit oder ohne Polypen) der chirurgischen ebenbürtig sei und ein chirurgisches Vorgehen den therapieresistenten Fällen vorzubehalten wäre. Dieses ist jedoch umstritten.

Die Induktion eines medikamentös induzierten M. Cushing durch eine Dauertherapie mit topischen Steroiden ist bei modernen, topischen Steroiden extrem unwahrscheinlich (Fowler, Gazis et al. 2002). Vor allem der unkritische Einsatz von Betamethason führte zu Berichten über Alterationen der hypophysären-adrenalen Achse (Stevens 1988; Flynn, Beasley et al. 1992). Betamethason wird im Gegensatz zu modernen topischen Steroiden nicht durch *first-pass* Effekte umgehend metabolisiert und kann somit systemische Wirkungen entfalten.

Die Gabe von Antibiotika vom Makrolidtyp, z.B. Clarithromycin, ist bereits von mehreren Arbeitsgruppen berichtet worden (Ichimura, Shimazaki et al. 1996; Cervin 2001; Wallwork, Coman et al. 2002), die breite Anwendung aber zum einen vor dem Hintergrund nur fraglicher Verbesserung der Klinik, zum anderen wegen möglicher weiterer Resistenzentwicklungen der mikrobiellen Flora skeptisch zu beurteilen. Kontrollierte, doppelblinde und randomisierte Studien fehlen. Experimentell wird von einer Reduktion der IL-8 Sekretion (Suzuki, Shimomura et al. 1997; Kikuchi, Hagiwara et al. 2002) und von vergleichbaren Effekten von Prednisolon und

Clarythromycin auf die Zytokinproduktion in einem Kulturmodell mit Nasenschleimhaut von Patienten mit chronischer Rhinosinusitis (Wallwork, Coman et al. 2002) berichtet.

Die lokale Gabe von Amphotericin B wird zur Zeit in einer großen europäischen Multicenterstudie (randomisiert, doppelblind) erprobt und basiert auf der Vorstellung, dass Pilze die Ursache einer Polyposis sein könnten (Ponikau, Sherris et al. 1999). Berichtet wird auch die Gabe von Capsaicin (Zheng, Wang et al. 2000). Auch diese Therapie kann zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund fehlender doppelblinder, randomisierter Studien nicht bewertet werden.

Die chirurgische Vorgehensweise mittels transnasaler, funktioneller, endoskopischer Sinusoperationen (*functional endoscopic sinus surgery*, FESS) hat bisher ihren Status als Therapie der Wahl beibehalten. Sie kann durch die computertomographiebasierte, intraoperative Navigation optimiert werden (s.o.).

Das Prinzip der funktionellen endoskopischen Nebenhöhlenchirurgie besteht in der Entfernung der Polypen, einer Eröffnung der ostiomeatalen Einheit, der Erweiterung der natürlichen Ostien der Nasennebenhöhlen und der operativen Sanierung der Nebenhöhlen durch Ausräumen der entzündlich veränderten Schleimhaut. Durch die Wiederherstellung der physiologischen Ventilation der Nasennebenhöhlen unter Berücksichtigung der mukoziliären Clearance wird im Vergleich zu anderen Nebenhöhlenoperationstechniken der nasalen Physiologie vermehrt Rechnung getragen. Bestehende septale Deformitäten können bei Bedarf in der gleichen Operation korrigiert werden.

Die postoperative Nachsorge wird ebenfalls endoskopisch durchgeführt und umfasst eine Wundpflege (Entfernung von Krusten, Sekretionen und Detritus) sowie die Verabreichung topischer Steroide zur Rezidivprophylaxe.

Rezidive

Die Polyposis nasi hat eine hohe Rezidivrate von 20-50% (Senior, Kennedy et al. 1998), selbst bei umfassender Sanierung der Nasennebenhöhlen durch eine funktionelle endoskopische Operation und Nachsorge. Das Bestehen einer

allergischen Sensibilisierung gegen Aeroallergene oder einer Samters-Trias stellen Risikofaktoren für die Rezidivpolyposis dar.

Eine spezifische Immuntherapie könnte bei allergisch sensibilisierten Patienten einen protektiven Effekt im Hinblick auf eine Rezidivpolyposis haben, hier kann man jedoch lediglich auf eine unkontrollierte Studie (Nishioka, Cook et al. 1994) verweisen. Die Desensitivierung einer Aspirinintoleranz bei Vorliegen eines Syndrome de Widal respektive einer Samters Trias scheint einen günstigen Einfluss im Hinblick auf die Rezidivneigung bei Polyposis nasi zu haben (Gosepath, Schafer et al. 2002), ist aber ob der Praktikabilität und der Nebenwirkungen einer permanenten Gabe von hohen Dosen Acetylsalicylsäure kritisch zu werten. Die Thematik Rezidive und Risikofaktoren wird in der Literatur kontrovers diskutiert und lässt sich nicht abschließend beurteilen.

Pathophysiologische Vorstellungen

Gerade die Eosinophilie, aber auch Mastzelldegranulationen und die Gewebeeinfiltration durch andere immunkompetente Zellen mit z.B. T-Lymphozyten und Makrophagen und zudem der Nachweis von IgE-Antikörpern und proinflammatorischen und regulatorischen Zytokine, v.a. IL-4 und IL-5 (IL = Interleukin) könnten nahelegen, eine allergische Genese der Polyposis nasi zu vermuten. Die Prävalenz von Allergien ist bei Patienten mit Polyposis nasi im Vergleich zur Normalbevölkerung jedoch nicht erhöht (Bateman, Fahy et al. 2003). Des Weiteren gibt es das Konzept einer lokalen Allergie und eine „Superantigenhypothese“: hierbei werden lokal überschüssige Immunreaktionen gegen Bakterien – oder Pilzantigene ursächlich zu Grunde gelegt. Komplettiert wird dieses durch Konzepte, die von Defekten in der leukotrien- und cyclooxygenasenassoziierten Signaltransduktion ausgehen.

Eher historisch ist die Auffassung von proliferativen Effekten an lokalen Engstellen mit aufeinanderliegenden Schleimhautanteilen, z.B. im Siebbein.

Allergische Rhinosinusitis

Allergie ist eine hypererge, unangemessene Reaktion des Immunsystems gegen eine körperfremde, jedoch eine die körperliche Integrität nicht an sich bedrohende Struktur, ein sog. Antigen respektive Allergen. Sie ist a priori assoziiert mit einer

immunologischen Typ 1 Reaktion nach Coombs und Gell, die, wie wir seit 1967 durch Teruko und Kimishige Ishizaka sowie S.Gunnar Johannsson und Hans Bennich wissen, IgE vermittelt ist.

Zunehmend ins Blickfeld fiel seit Anfang der 1990er Jahre die Spätphasereaktion (*late-phase response*, LPR), die sich mit der schnellen, perakuten IgE-vermittelten Reaktion nicht erklären lässt und vielmehr die charakteristischen Zeichen einer klassischen Entzündung aufweist.

Abhängig von den betroffenen Organen und der Symptomatologie manifestieren sich eine allergische Konjunktivitis, eine allergische (intermittierende oder persistierende) Rhinitis respektive Rhinosinusitis oder/und ein extrinsisches Asthma bronchiale.

Die häufigste Manifestationsform allergischer Erkrankungen ist mit weiterhin steigender Prävalenz und hoher volkswirtschaftlicher Bedeutung die allergische Rhinosinusitis. Gemäß der ISAAC-Studie sind ca. 15-25 % der Bevölkerung sind betroffen. Da in 25% dieser Fälle innerhalb von 10 Jahren ein „Etagenwechsel“ in die tiefen Atemwege mit der Gefahr der Ausbildung eines extrinsischen Asthma bronchiale droht, entsteht eine potentiell lebensgefährliche Erkrankung, von der Gefahr der Anaphylaxie und möglichen Kreuzallergien zu Lebensmittelallergenen einmal abgesehen.

Gegenüber der weit verbreiteten Auffassung eines Kausalzusammenhangs zwischen Polyposis nasi und einer allergischen Sensibilisierung besteht eine konträre Datenlage: Allergien haben in einem Kollektiv mit Patienten mit Polyposis nasi eine Prävalenz von 5%, in der Normalbevölkerung gilt eine Allergieprävalenz von 15 %. Umgekehrt gilt eine Prävalenz von 0,5 % für nasale Polyposis in einem Atopikerkollektiv, während in der Normalbevölkerung in einzelnen Stichproben eine Prävalenz von 4,5 % konstatiert wird (Settipane 1996).

Allergiker haben demnach kein höheres Risiko an einer nasalen Polyposis zu erkranken. Manche Autoren favorisieren wegen des Vorhandenseins von spezifischen IgE-Antikörpern in den Polypen und dem gleichzeitigem Fehlen einer systemischen allergischen Sensibilisierung das Konzept einer „Lokalen Allergie“ (siehe auch Kapitel 4: Diskussion).

Die Immunbiologie der allergischen Rhinosinusitis

Grob lässt sich das Immunsystem in unspezifische, angeborene Mechanismen und spezifische, erworbene Abwehrmechanismen untergliedern. Die Allergie ist ein erworbener Abwehrmechanismus gegen ein Allergen (s.o.). Ein solches besteht molekular aus verschiedenen Epitopen.

Antigene weisen neben Epitopen, auf welche B-Zellen mit IgE-Produktion reagieren, auch sog. T-Zellepitope auf. Die T-Zellvermittelte Reaktion dauert länger an, unterliegt einem *Priming* und moderiert und unterhält sich selbst aufrecht. Dieses wird erreicht durch ein selbstgeschaffenes und lokal im Gewebe induziertes *Microenvironment*. Beteiligt sind trophische, Haftungs- und Kommunikationsfaktoren, also Wachstumsfaktoren und Lokalhormone im weiteren Sinne, Zyto- und Chemokine sowie Adhäsionsmoleküle.

Antigenpräsentierende Zellen

Noch bevor die Effektorzellen des Immunsystems in Aktion treten können sind diejenigen Zellen von großer Bedeutung, die die Antigene aufnehmen, prozessieren und aufbereitet, d.h. in „lesbare“ Form gebracht, den Effektoren, also den T- und B-Lymphozyten präsentieren. Sie stellen einen sog. *Hub*, einen Verteiler und Multiplikator im Immunsystem dar und sind konsequent für die Reaktion der T-Zellen mitverantwortlich. Bei diesen antigenpräsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APC) handelt es sich vornehmlich um Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Ihre Funktion beschränkt sich nicht nur auf die Präsentation der Antigene. Sie gehören den Phagozyten an und üben damit auch eine essentiell wichtige Effektorfunktion aus. Sie interagieren über Mediatoren modulierend auf immunologische Vorgänge und stellen die wichtigste Brücke zwischen angeborener unspezifischer und erworbener spezifischer Abwehr dar.

T-Zellen

Aufgrund ihrer pathophysiologischen Bedeutung stellt die T-Zellfunktion einen interessanten Hebel für zukünftige Therapien dar. Die T-Zellen sind Effektor-, Regulator- und auch Gedächtniszellen der spezifischen zellulären Abwehr. Ihre Prägung oder Reifung, respektive das Lernen, zwischen körperfremd und

körperigen zu unterscheiden, findet vor allem im juvenilen Thymus statt, deshalb T-Lymphozyten. Sie ergänzen das System der humoralen, antikörper-vermittelten Abwehr, deren zelluläres Korrelat die B-Zellen (von Bone-marrow bzw. der Bursa fabricii) darstellen. Es gibt T-Helfer, T-Gedächtnis, T-Supressor und zytotoxische T-Zellen -und in letzter Zeit mit zunehmendem Interesse betrachtet- regulatorische T-Zellen.

Sie lassen sich vielfach molekular subtypisieren. T-Zellen lösen Immunreaktionen vom verzögerten Typ aus (u.a. auch die Tuberkulinreaktion und die späte Transplantatabstoßung), und werden für den *late-phase response* bei allergischen Entzündungen im oberen Respirationstrakt verantwortlich gemacht.

Bildung eines *Microenvironments*

Wer sind die Akteure in der Vermittlung dieser immunologischen Vorgänge? Lässt sich möglicher Weise ein maßgeblich pathogenetisch verantwortliches und schädliches Agens identifizieren? Die Kommunikation, Koordination und Modulation einer Entzündung als aktiver Leistung des Immunsystems erfolgt durch direkte Zellkontakte (MHC I & II, B7, ICOS, CD40, CD80), durch parakrine Sekretion von proinflammatorischen (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-18, IFN- γ , TNF- α) oder regulatorischen Zytokinen (IL-10, TGF- β), von Chemokinen (IL-8, Eotaxin, MCP, Rantes) und der Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1). Beispiele für die Kommunikation durch direkte Zell- Zellkontakte sind die Antigenpräsentation und die Unterscheidung zwischen körperfremd und körpereigen. Die Sekretion von Zytokinen moduliert und reguliert letztlich den gesamten Entzündungsprozess, und ruft ihrerseits wiederum Antworten ihrer Zielzellen hervor. Chemokine bewirken eine Zellmigration ins Entzündungsgebiet entlang des Konzentrationsgradienten des sezernierten Chemokins. Die Expression von Adhäsionsmolekülen begünstigt die Migration verschiedener Zelltypen aus der Blutbahn ins Gewebe, indem sie den durch Zytokine und Chemokine *klebrig* gemachten Entzündungszellen eine *Schiene* ins Entzündungsgebiet bauen. Alle diese Faktoren zusammen schaffen ein *Microenvironment*.

Th1- und Th2- Subtypen: unterschiedliche Zytokinsekretionsmuster

1986 stellten Mossmann, Coffmann et al. im Mausmodell fest, dass unterschiedliche T-Helfer Zellklone jeweils bestimmte Zytokinmuster sezernieren. Der Th1-Subtyp sezerniert IL-2, IFN- γ und Lymphotoxin (TNF- β), der Th2- Subtyp sezerniert IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13.

Die Sekretionsmuster von IL-2, IL-10 und IL-13 sind beim Menschen jedoch nicht so streng an einen Th-Subtyp gebunden (Mosmann and Coffman 1989). Aufgrund dieses neuen immunologischen Paradigma wurden zunehmend immunologische Vorgänge und Erkrankungen als Th1 oder Th2 gewichtet klassifiziert. Während das Th1-Sekretionsmuster eher eine zytotoxisch vermittelte Immunantwort und eine Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV) begünstigt, beobachtet man bei einem Th2-Sekretionsmuster eine überwiegend humorale, antikörper-, häufig IgE-vermittelte Reaktion (Typ I), ferner eine Eosinophilie. Allergien wurden somit unter die Th2-Reaktionen subsummiert. Modifiziert sprechen Mosmann et al. inzwischen vom expandierenden Universum der Th-Subtypen (Mosmann T.R. 1996), da das didaktisch klare, dichotome Modell nicht der hohen Komplexität der zu beobachtenden Zytokinsekretionsmuster verschiedenster immunologischer Entitäten Rechnung tragen kann. Es zeigt sich eine zunehmende Vielfalt: Th3-Zellen, die IL-4 und IL-10 sowie TGF- β produzieren, TR1-Zellen, die eine Sekretion von IL-10 und wenig IL-2, jedoch keine von IL-4 und TGF- β aufweisen (Umetsu, Akbari et al. 2003).

Zytokine und ihre Relevanz für mögliche Therapien

Die komplexen Regulationsvorgänge, die vielen verschiedenen Akteure und ihre bisher im Zusammenspiel unverstandene Kybernetik zeigen vor allem zweierlei:

Es besteht eine hohe Systemredundanz und wir haben bisher kein pathogenetisches Agens identifizieren können, dessen z.B. pharmakologische Unschädlichmachung diese Entzündungskaskaden selektiv unterbricht. Bisherige Eingriffe erfolgen überwiegend nicht-selektiv, gerne mit dem Attribut immunmodulierend versehen, durch z.B. Glucokortikoide. Etwas selektiver sind die Eingriffe in das T-Zellsystem in der Transplantationsmedizin mittels Calcineurininhibitoren und Zyklosporinen, die über eine „gemeinsame Endstrecke“ vornehmlich die IL-2 Synthese und damit das aktivierende Signal für zytotoxische T-Zellen inhibieren. Der in der ersten Evaluation optimistisch bewertete Einsatz der Calcineurininhibitoren in der topischen Therapie

der atopischen Dermatitis (Meurer, Fartasch et al. 2004) demonstriert die Relevanz des Hebels einer Therapie, die die redundante Kommunikation -im angelsächsischen Schrifttum indes auch als *cross-talk* bezeichnet- im *microenvironment* hemmt. Der Einsatz von Zytokinen in der Tumorthherapie, z.B. topisch-inhalative IL-2-Therapie bei Lungenfiliae (Merimsky 2004) und von Antizytokinen in der Rheumatologie als z.B. systemische Gabe von Anti-TNF- α bei therapieresistenter chronischer Polyarthritis, eröffnet interessante Perspektiven.

Die Kenntnis der Sekretionsmuster der immunmodulierenden und proinflammatorischen Zytokine und Chemokine, das Verständnis, wie die Akteure kommunizieren, ist der Schlüssel, um die Tür für selektive Therapien zu eröffnen.

Zytokine und Polyposis nasi

Wie bereits im ersten Abschnitt dieses Kapitels erwähnt, geht die Polyposis histologisch mit einer charakteristischen Eosinophilie und dem Vorhandensein weiterer Entzündungszellen, Basophilen, Mastzellen, Makrophagen, dendritischer Zellen und T-Zellen einher. Es findet sich eine deutlich erhöhte Produktion und Sekretion proinflammatorischer und regulatorischer Zytokine. So konnten Bachert und Wagenmann 1997 zeigen, dass die Produktion von Interleukin 5 bei Patienten mit Polyposis nasi deutlich erhöht ist (Bachert, Wagenmann et al. 1997). In weiteren Studien konnten ferner IL-4, IL-8, IL-12, IFN- γ , GM-CSF, IL-13 und andere Zyto- und Chemokine bei Patienten mit Polyposis nachgewiesen werden. Ob diese Zytokine hierbei eine wirklich relevante pathogenetische Rolle spielen, wird sich erst durch den klinischen Einsatz von Antizytokinen zeigen lassen, vor allem durch die Therapie mit dem Anti-IL-5-Antikörper. Da eine Vielzahl von Zytokinen bereits identifiziert wurde, stellt sich folgend die Frage, welche Zellen die pathogenetisch relevanten Zytokine produzieren. Vor allem Makrophagen als antigenpräsentierende *Hubs* und T-Zellen als Effektoren sind zwei Hauptakteure, deren Rolle in der Produktion proinflammatorischer Zytokine zu beleuchten ist.

Fragestellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Produktion von Zytokinen durch CD14 positive Zellen (Makrophagen) und CD3 positive Zellen (T-Zellen) bei Patienten mit Polyposis nasi. Folgende Fragen sollen hierbei geklärt werden:

- Welche Zytokine können wir bei Patienten mit Polyposis nasi finden?
- Wie stellen sich die Unterschiede der Zytokinproduktion zwischen Patienten mit Polyposis nasi und Patienten ohne Sinusitis dar?
- Ist Polyposis nasi mit einer Th1/Th2-Polarisierung der Zytokinproduktion vergesellschaftet?
- Gibt es Unterschiede zwischen Patienten mit Polyposis nasi, die Allergiker sind oder bei denen eine Samters-Triade vorliegt?
- Welche Zytokine produzieren Makrophagen und T-Zellen?
- Gibt es Unterschiede in der Zytokinproduktion von Makrophagen und T-Zellen zwischen Patienten mit einer Polyposis nasi und Patienten ohne Sinusitis?
- Gibt es eine Polarität der T-Zellantwort bei Polyposis nasi?
- Wie verändern sich die Zytokinmuster, wenn diese Zellen aus dem „Orchester“, dem Zusammenspiel mit anderen Zellen entfernt werden?

2. Material und Methoden

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde die Produktion von Zytokinen der Nasenschleimhaut mit dem ELISPOT-Assay gemessen. Um die Zytokinproduktion einzelner Zellpopulationen, in diesem Falle durch Makrophagen und T-Zellen zu untersuchen, wurde der ELISPOT mit einer vorgeschalteten immunomagnetischen Zellseparation kombiniert.

Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasste 18 Männer und 9 Frauen (mittleres Lebensalter in Jahren: $47,14 \pm 18,55$). Hiervon waren 21 Nichtallergiker und 6 Allergiker.

Probenmaterial

Analysiert wurden Proben der Nasenhaut- und Nebenhöhlenschleimhaut. Die Proben wurden während routinemäßig durchgeführter, funktioneller endoskopischer Sinusoperationen und endonasaler Muscheleingriffe gewonnen. Es wurden lediglich Gewebeproben zur Untersuchung verwendet, die sonst verworfen worden wären. Ausgeschlossen wurden an Malignomen erkrankte Patienten, Patienten mit tumorösen Läsionen der Nasennebenhöhlen, schweren systemischen Infektionserkrankungen (z.B. Hepatitis oder Aids), immunologischen Systemerkrankungen und akuten Sinusitiden.

Patienten mit einer chronisch-polypösen Sinusitis (n=17) wurden Schleimhautproben aus Polypengewebe entnommen, als Kontrolle diente Muschelgewebe von Patienten ohne Sinusitis und ohne bekannte allergische Sensibilisierung (n=10). Bei 16 Proben wurde eine Depletion von CD14-positiven Zellen vorgenommen, bei 11 Proben eine Depletion von CD3-positiven Zellen. ELISPOTs von positiv selektierten Zellen wurden in jeweils 9 Proben realisiert.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Heinrich Heine Universität Düsseldorf genehmigt.

Generieren einer Einzelzellsuspension

In einem kombiniert mechanisch-enzymatischen Verfahren wird eine Einzelzellsuspension hergestellt. Das Vorhandensein einer Einzelzellsuspension ist eine Grundvoraussetzung, um die Zytokinproduktion auf dem Niveau der einzelnen Zelle untersuchen zu können.

Die operativ gewonnene Gewebeprobe wird nach mechanischer Zerkleinerung mit dem Skalpell in zwei Schritten enzymatisch behandelt. Im ersten Schritt werden die zerkleinerten Proben mit 6 ml Collagenase/Dispase-Lösung und 20µl Desoxyribonuklease versetzt und eine Stunde unter Vitalbedingungen im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgt eine Feinsiebfiltration. Die so gewonnenen Zellen werden nach Zentrifugation (5 min., $R=1000 \text{ min}^{-1}$ bei 20°C) und nach Entfernung eventueller Erythrozyten durch *Red-Cell-Lysing*-Puffer in Medium resuspendiert. Die abgetropften Gewebereste aus der Feinsiebfiltration werden in einem zweiten Schritt mit jeweils 3ml Trypsin- und Hyaluronidase-Lösung versetzt und erneut eine Stunde unter Vitalbedingungen im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erneute Durchführung einer Feinsiebfiltration und oben aufgeführter Zentrifugations- und Resuspensionsschritte. Die so gewonnenen Zellsuspensionen werden zusammengeführt.

| | |
|--|-----------------------------|
| Collagenase (0,7 U/ml) –Dispase (5,6 U/ml) | Roche # 1097 113, Basel |
| Desoxyribonuklease (35 kU/ml) | Sigma # D-4513, Deisenhofen |
| <i>Red-Cell-Lysing</i> -Puffer | Sigma # R7757 |
| Trypsin EDTA (5 U/ml) | Roche # 210 242 |
| Hyaluronidase (6028 U/ml) | Sigma # H-6254 |

Tabelle 1: Eingesetzte Reagenzien für die Generierung einer Zellsuspension

Immunomagnetische Zellseparation

Die immunomagnetische Zellseparation erlaubt die Selektion und Sortierung einzelner Zellpopulationen anhand spezifisch exprimierter Oberflächenmoleküle. Gegen ausgesuchte Oberflächenantigene gerichtete, antikörpergebundene paramagnetische Körper folgend *beads* genannt (aus dem Englischen: *beads* – Perlen, Kügelchen) werden mit der Einzelzellsuspension versetzt.

Je nach gesuchter Zellpopulation bedient man sich entweder Anti-CD14 (Makrophagen) oder Anti-CD3 (T-Zellen) antikörperbeschichteter, magnetischer *beads*.

| | |
|----------------------|----------------------------------|
| Dynabeads M-450 CD14 | Dynal, Norwegen (Oslo), # 111.11 |
| Dynabeads M-450 CD3 | Dynal, Norwegen (Oslo), # 111.13 |

Tabelle 2: Eingesetzte Reagenzien für die immunomagnetische Zellseparation

62,5 µl (entsprechend einer Anzahl von ca. $25 \cdot 10^6$ *beads*) anti-CD14 oder anti-CD3 beschichtete, paramagnetische *beads* werden in 10 ml PBS und unter Vortexdurchmischung suspendiert. Reinigung in einem magnetischen Partikelkonzentrator und Resuspension. Wiederholung des Vorganges, bis sich die Suspension nach Zugabe von PBS nicht mehr verfärbt. Dann Resuspension in 500 µl PBS-1%BSA.

Nach Vorversuchen und analog den Herstellerangaben wurde folgende optimierte Vorgehensweise angewandt:

Die immunomagnetische Zellseparation wird zur Vermeidung unspezifischer Bindungsreaktionen und Reduktion unerwünschter Inkorporierung der *beads*, z.B. durch Makrophagen, sequentiell (zweimalig) durchgeführt. Hierdurch wird pro Vorgang die Inkubationszeit auf 15 Minuten reduziert, gleichzeitig durch die wiederholte Durchführung die Ausbeute erhöht. Die Depletion erfolgt zur Vermeidung unspezifischer Bindungsreaktionen bei 4°C und unter permanenter horizontaler und vertikaler Durchmischung.

Die wie oben beschrieben generierte Einzelzellsuspension einer Probe (3ml) wird halbiert (je 1,5ml): so entstehen zwei Zellpopulationen: eine Selektionsgruppe und eine Population unselektierter Zellen (entsprechend einer *baseline*). Durchführung der sequentiellen Depletion in zwei identischen Phasen. Die unselektierten Zellen (*baseline*) werden, ohne Zufügen magnetisierter *beads*, identisch behandelt.

Versetzen der unselektierten Zellen (*baseline*) mit 250 µl PBS-1%BSA. Die *beads* in PBS-BSA werden halbiert (2*250 µl). Versetzen der Selektionsgruppe mit 250 µl *Beadlösung*. Inkubation der unselektierten Zellen (*baseline*) und der Selektionsgruppe bei 4° C unter permanenter Durchmischung für 15 Minuten.

Einsetzen der Proben in den magnetischen Partikelkonzentrator für 3 Minuten, Abpipettieren der Überstände.

Erneutes Versetzen der unselektierten Zellen (*baseline*) mit 250µl PBS-1%BSA und der Selektionsgruppe mit 250µl *Beadlösung*. Resuspension der wandständigen, magnetischen Selektate mit 250 µl Medium. Diese Gruppe entspricht den positiv selektierten Zellen. Wiederholung des Depletionsvorganges mit den Überständen wie beschrieben. Die durch das Magnetfeld wandständig adhärierenden, positiv selektierten Zellen (siehe Abb. 2) werden zusammengeführt, ebenfalls werden die depletierten Zellsuspensionen und die unselektierten Zellen (*baseline*) weiterverwendet.

Zellzählung und Viabilitätskontrolle

Es folgt eine Zählung der sich aus dieser Zellseparation ergebenden drei Zellsuspensionen: der positiv selektierten Zellen, der depletierten Zellsuspension und der unselektierten Zellen (*baseline*).

Die Zellzählungen erfolgen in einer Zählkammer nach Neubauer mit einer Vitalfärbung mit Trypanblau (Gibco BRL, Paisley, GB). Schliesslich werden die Zellsuspensionen auf eine Normzellzahl (500.000 lebende Zellen pro ml, bei positiv selektierten Zellen 100.000 lebenden Zellen pro ml) geeicht. Da die positiv selektierten Zellen mit *beads* markiert sind, ergibt sich hieraus eine Markierung der Zielzellen und eine direkte Kontrolle des Selektionserfolges.

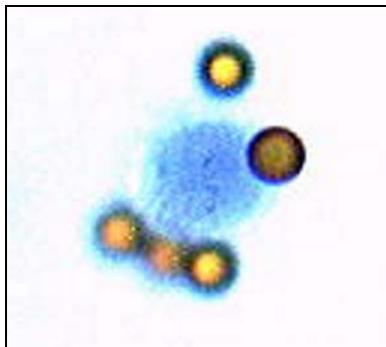


Abbildung 3: Mononukleäre Zelle mit *beads*

Messung von Zytokinen mit dem ELISPOT

Messprinzip

Der ELISPOT misst die Zytokinproduktion auf dem Niveau der einzelnen Zelle. Festphasegebundene Primärantikörper binden das zu messende Zytokin, welches die aufliegenden Zellen während der Inkubationzeit sezernieren. Übertragen in die Fotografie handelt es sich bei dem Primärantikörper um den photographischen Film, die Koinkubation mit der zytokinproduzierenden Einzelzellsuspension entspricht der Belichtung.

Nach einem Waschvorgang, mit dem die Zellen entfernt werden (Belichtungsende), wird ein Sekundärantikörper zur Detektion gegen das gebundene, zu messende Zytokin aufgetragen. Nach einem weiteren Waschschrift wird ein Drittantikörper mit gebundenem Enzym (Peroxidase) aufgetragen. Auch hier werden die nicht gebundenen überschüssigen Antikörper durch Waschen entfernt. Zuletzt wird ein kombiniertes Farb-Substrat-Gel aufgetragen. Dort wo Enzymaktivität über Antikörper an detektiertes Zytokin gebunden ist, wird eine Farbstoffreaktion katalysiert, es entsteht ein Spot. Die so katalysierte Farbreaktion - quasi Entwicklung - wird in dem Gel wie auf einem Foto fixiert. Unter Lupenvergrößerung stellen sich dort, wo zuvor Zellen das gesuchte Zytokin produziert haben, Spots dar (siehe Abbildung 4).

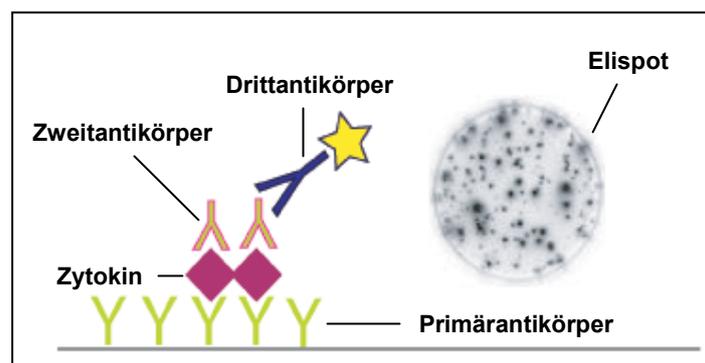


Abbildung 4: Der Elispot misst die Sekretion von Zytokinen auf dem Niveau der einzelnen Zelle.

Durchführung des ELISPOT-Assay

Gemessen wird die Anzahl der zytokinproduzierenden Zellen (IL-4, IL-5, IL-8, IL-12 und IFN- γ) in den durch die immunomagnetische Zellseparation gewonnenen Einzelzellpopulationen.

Mitgeführt werden Positivkontrollen mit rekombinanten Zytokinen und Negativkontrollen mit dem Zellnährmedium.

- Beschichtung von 96-well Kunststoffplatten mit dem Primärantikörper (diese beschichteten Platten werden bei -20°C gekühlt aufbewahrt)
- Auftragen der Einzelzellsuspensionen auf aufgetaute, beschichtete Platten
- Inkubation unter Vitalbedingungen für 2h
- Waschen der Platten und Auftragen der Sekundärantikörper
- Inkubation unter Vitalbedingungen für 2h
- Waschen der Platten und Auftragen der Tertiärantikörper
- Inkubation unter Vitalbedingungen für 2h
- Waschen der Platten und Auftragen eines Substrat-Agarose-Gels
- Farbreaktion und Gelieren unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur für 4h
- Auswertung unter Lupenvergrößerung durch Zählen der Spots (siehe auch Auswertung und Statistik)

Detaillierter Aufbau des ELISPOT-Assay

Vorbeschichtung mit Primärantikörper:

Im ersten Schritt werden 96 well-Platten (Nunc Maxisorp®, Roskilde, Denmark) mit Waschphosphatpuffer beschichtet. Ausschlagen der Platten. Auftragen der Antikörper mit je 100 μ l sterilfiltrierter Antikörperlösung in Carbonatpuffer.

Inkubation der 96-well Platten über Nacht bei 4 °C. 5-maliges Waschen der Platten mit Waschphosphatlösung. Die Platten werden mit Waschphosphatlösung beschichtet und bei -20°C eingefroren. Bei Bedarf Auftauen der benötigten Platten.

| Zytokin | Antikörper | Verdünnung | Bezugsquelle |
|---------------|---|------------|-------------------------------|
| IL-4 | Rabbit-anti-human IL-4, polyclonal | 1:1000 | AB 1409, Chemicon, Hofheim |
| IL-8 | Rabbit-anti-human IL-8, polyclonal | 1:500 | AB 1427, Chemicon, Hofheim |
| IL-5 | Mouse-anti-human IL-5, monoclonal IgG1 | 1:200 | 2374-01, R&D, Wiesbaden |
| IL-12 | Mouse-anti-human IL-12p40, monoclonal Clone C8.6 | 1:100 | 80-3888-01, R&D, Wiesbaden |
| IFN- γ | Mouse-anti-human, monoclonal | 1:100 | 1598-00, R&D, Wiesbaden |

Tabelle 3: Primärantikörper für ELISPOT

Alle Messungen werden als Doppelbestimmungen und jeweils bei kleinen und grossen Zellzahlen durchgeführt. Die je nach Materialart eingesetzten Zellzahlen reflektieren die unterschiedliche Materialausbeute und wurden im Hinblick auf die Zählbarkeit bei der quantitativen Auswertung der Spots optimiert: 50.000 und 100.000 Zellen pro *well* bei IL-4, IL-5, IL-12 und IFN- γ bei Muschelpräparaten, 10.000 und 100.000 pro *well* bei Polypenpräparaten und 10.000 und 50.000 pro *well* Zellen in der Gruppe der positiv selektierten Zellen (bei Muscheln und Polyposispräparaten). IL-8 wurde bei allen Probenotypen mit jeweils 1000 und 2000 Zellen pro *well* gemessen. Negativkontrollen erfolgen mit dem eingesetzten Medium, Positivkontrollen mit rekombinanten, aliquotierten Zytokinen.

Auftragen der Zellen:

Auftragen der in der Zellzahl auf 500.000 Zellen pro ml bzw. 100.000 Zellen pro ml bei positiv selektierten Zellen geeichten Einzelzellsuspensionen. Zudem Mitführung der Positiv- und Negativkontrollen (siehe auch Tabelle 4).

2h Inkubationszeit unter Vitalbedingungen (37°C, 5% CO₂) im Brutschrank. Ausschlagen und Waschen der Platten mit Waschphosphatpufferlösung mit Tween.

Auftragen der aliquotierten, sterilfiltrierten Lösungen (in 1%iger PBS-BSA-Lösung) der Zweitantikörper mit jeweils 200 µl (IL-4, IL-5, IL-8) bzw. 100 µl (IL-12, IFN-γ) pro well (siehe auch Tabelle 5).

Erneut 2h Inkubationszeit im Brutschrank (37°C) oder über Nacht bei 4°C. Ausschlagen und Waschen der Platten mit Waschphosphatpufferlösung mit Tween. Auftragen der aliquotierten, sterilfiltrierten Lösungen (in 1%iger PBS-BSA-Lösung) der Drittantikörper mit Peroxidaseaktivität (siehe auch Tabelle 6).

| Rekombinantes Zytokin | Verdünnung | Bezugsquelle |
|---|-------------------|--|
| IL-4/IL-8 Lyophilisat Quantikine Kit Control | 1:1 | R&D, Wiesbaden |
| human recombinant IL-5 | 1:50 | #15273, Sigma, Deisenhofen |
| recombinant human IL-12 | 1:50 | #219-IL, R&D, Wiesbaden |
| recombinant human IFN-γ | 1:100 | #80-3348-01, Genzyme, Neu- Isenburg |

Tabelle 4: Positivkontrollen: eingesetzte rekombinante Zytokine

| Zytokin | Antikörper | Verdünnung | Bezugsquelle |
|----------------|--|-------------------|------------------------------|
| IL-4 | Goat-anti-human-IL-4 neutralising Antibody | 1:1000 | AB-204-NA, R&D, Wiesbaden |
| IL-8 | Goat-anti-human IL-8 neutralising Antibody | 1:1000 | AB-208-NA, R&D, Wiesbaden |
| IL-5 | Rabbit-anti-human IL-5 polyclonal | 1:200 | 1722-01, R&D, Wiesbaden |
| IL-12 | Polyclonal rabbit-anti-human IL-12 | 1:100 | 80-4314-0, R&D, Wiesbaden |
| IFN-γ | Goat-anti-human neutralising Antibody IFN-γ | 1:200 | AF-285-NA, R&D, Wiesbaden |

Tabelle 5: Sekundärantikörper für den ELISPOT

| Zytokin | Antikörper | Verdünnung | Bezugsquelle |
|------------------------------|--|------------|------------------------------|
| IL-4, IL-8, IFN- γ | rabbit-anti-goat-Immunglobulin-POX / Monoclonal anti goat / sheep IgG peroxidase conjugate, Clone GT-34 | 1:5000 | A9452, Sigma, Deisenhofen |
| IL-5, IL-12 | mouse-anti-rabbit-immunglobulins- POX / Monoclonal anti rabbit IgG (γ - chain specific) peroxidase conjugate, Clone RG-96 | 1:5000 | A1949, Sigma, Deisenhofen |

Tabelle 6. Drittantikörper für den ELISPOT

| | |
|---------------------------------|---|
| PBS (Phosphate buffered saline) | Dulbecco's, Gibco BRL, Paisley (GB) |
| BSA (bovines Serumalbumin) | Behring Dade, Liederbach # ORHD 194C30 |
| Medium | 500 ml RPMI steril, serumfrei ICN #1640 10 ml Glutamin, 200mM ICN Biomedicals, Meckenheim 5 ml Penicillin/Streptomycin 5000 U/ml, 5000 μ g/ml GibcoBRL, Paisley (GB) |
| Waschphosphatpuffer | 0,1 molarer Phosphatpuffer mit NaCl (0,05 M), pH=7,4 |
| Waschphosphatpuffer+Tween | 0,1 molarer Phosphatpuffer mit NaCl (0,05 M), pH=7,4 + Zusatz von 0,05 % Tween |
| Tween 80 | ICN Biomedicals, Meckenheim |
| Carbonatpuffer | 0,1%iger Carbonatpuffer, pH=9,6 |
| Citratpuffer | 3,09g Citronensäuremonohydrat + 5,58g Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O in 500 ml Aqua dest., pH=4,2 |
| Agarose | Sigma, Deisenhofen |
| BM-Blue POD Substrate | # 1442066, Roche, Basel |
| Trypanblau | # 15250-061, Gibco BRL, Paisley (GB) |

Tabelle 7: Sonstige Lösungen und Reagenzien für diese Studie

Erneut 2h Inkubationszeit im Brutschrank (37°C) oder über Nacht bei 4°C. Ausschlagen und Waschen der Platten mit Waschphosphatpufferlösung mit Tween. Auftragen von jeweils 100 µl Agarose-Substrat-Gemisch (Citratpuffer mit 0,6 % Agarose und äquivalent BM Blue POD Substrate). 30 Minuten bei 37°C inkubieren, dann zum Gelieren bei Raumtemperatur unter Lichtschutz für mindestens 4h bewegungsfrei lagern.

Auswertung und Statistik

Auswertung

Proben von 2 Patienten mussten aufgrund uneindeutiger Negativkontrollen aus der Studie ausgeschlossen werden.

Ein Spot entspricht einer zytokinproduzierenden Zelle. Die Auswertung erfolgt durch Zählen der Spots unter Lupenvergrößerung mittels eines Zähllokulars. ELISPOTs mit positiver Mediumkontrolle (positive Negativkontrolle) oder negativer Positivkontrolle werden von der Auswertung ausgeschlossen.

Die für die jeweils kleinen und großen Zellzahlen bestimmten Spotzahlen werden auf 100.000 zytokinproduzierende Zellen hochgerechnet. Alle Zahlenangaben erfolgen sofern nicht anders angegeben als Mittelwert plus Standardfehler (SEM).

Statistik

Zur Erstellung der deskriptiven Statistiken und der nichtparametrischen Tests (Frank Wilcoxon Vorzeichentest und Mann-Whitney U-Test) wurde das Statistikprogramm StatView 5.0.1 (SAS 1998) verwendet. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5% bei zweiseitiger Durchführung der statistischen Tests zu Grunde gelegt.

3. Ergebnisse

Proinflammatorische Th1- und Th2- Zytokine bei Polyposis nasi

Welche Zytokine lassen sich im ELISPOT bei Patienten mit chronisch-polypöser Rhinosinusitis im Vergleich zu Patienten ohne Sinusitis messen?

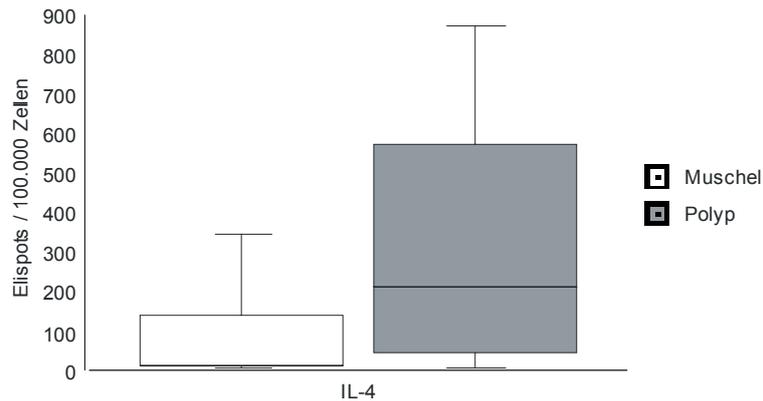


Abbildung 5: IL-4 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis im Vergleich zu Muschelkontrollen. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=25.

| IL-4 | MW | SEM | p-Wert |
|---------|--------|--------|--------|
| Muschel | 99,85 | 44,12 | 0,052 |
| Polyp | 384,13 | 119,99 | |
| MWU | | | |

Tabelle 8: IL-4 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis im Vergleich zu Muschelkontrollen. Mann-Whitney-Test. n=25.

Bei Patienten mit Polyposis nasi zeigen sich im Vergleich zu Patienten ohne Sinusitis um nahezu 4-fach erhöhte Mittelwerte in der Anzahl der IL-4 produzierenden Zellen. Dieser Effekt verfehlt im Mann-Whitney-Test (MWU-Test) nur sehr knapp die statistische Signifikanz. In der Anzahl IL-5 produzierender Zellen zeigen sich nahezu 10-fach erhöhte Mittelwerte in der Polyposisgruppe. Dieser Effekt ist im MWU-Test statistisch signifikant.

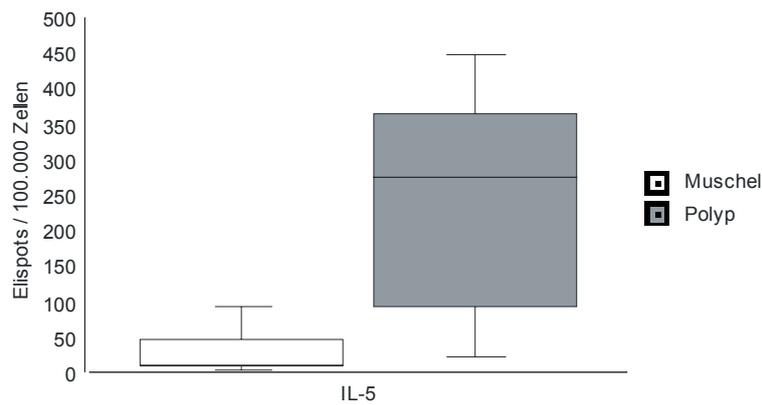


Abbildung 6: IL-5 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis im Vergleich zu Muschelkontrollen. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=25.

| IL-5 | MW | SEM | p-Wert |
|---------|--------|-------|--------|
| Muschel | 30,80 | 12,85 | 0,0005 |
| Polyp | 294,07 | 69,30 | |
| MWU | | | |

Tabelle 9: IL-5 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis im Vergleich zu Muschelkontrollen. Mann-Whitney-Test. n=25.

Das Chemokin IL-8 wird in beiden Gruppen von wesentlich mehr Zellen produziert als die übrigen gemessenen Zytokine. Im Mittelwert ergeben sich Unterschiede in der Größenordnung von Faktor 2, die allerdings keine statistische Signifikanz erreichen.

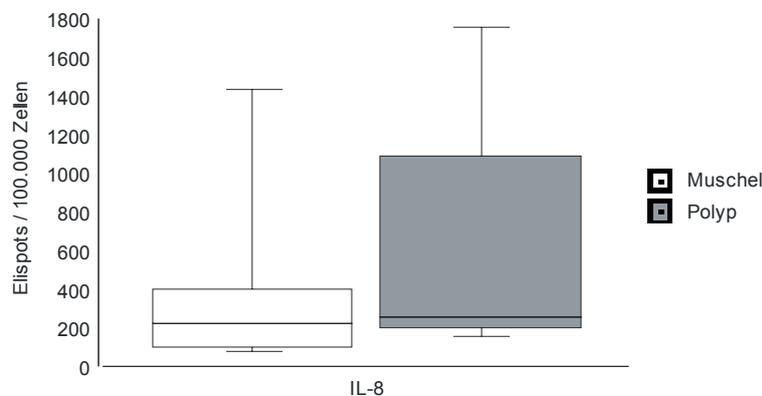


Abbildung 7: IL-8 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis im Vergleich zu Muschelkontrollen. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=25.

| IL-8 | MW | SEM | p-Wert |
|-------------|--------|--------|--------|
| Muschel | 435,00 | 196,29 | 0,21 |
| Polyp | 970,00 | 414,34 | |
| MWU | | | |

Tabelle 10: IL-8 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis im Vergleich zu Muschelkontrollen. Mann-Whitney-Test. n=25.

Die Anzahl IL-12 produzierender Zellen ist bei Patienten mit Polyposis nasi im Vergleich zu Patienten der Muschelgruppe im Mittelwert 4-fach erhöht.

IFN- γ produzierende Zellen sind in der Polyposisgruppe sogar um den Faktor 14 erhöht. Beide Effekte sind statistisch signifikant.

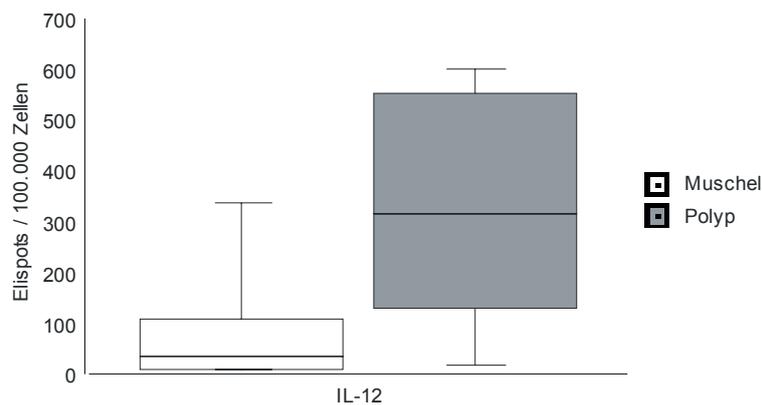


Abbildung 8: IL-12 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis im Vergleich zu Muschelkontrollen. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=25.

| IL-12 | MW | SEM | p-Wert |
|--------------|--------|-------|--------|
| Muschel | 95,35 | 49,20 | 0,006 |
| Polyp | 371,27 | 81,45 | |
| MWU | | | |

Tabelle 11: IL-12 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis im Vergleich zu Muschelkontrollen. Mann-Whitney-Test. n=25.

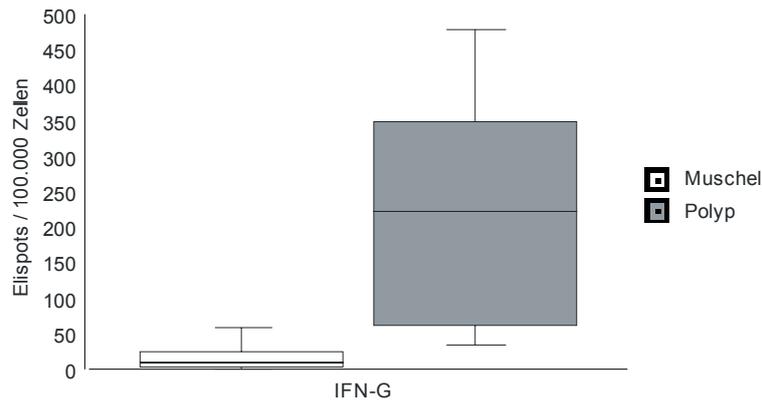


Abbildung 9: IFN- γ produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis im Vergleich zu Muschelkontrollen. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=25.

| IFN- γ | MW | SEM | p-Wert |
|---------------|--------|-------|--------|
| Muschel | 17,65 | 7,93 | 0,0002 |
| Polyp | 242,33 | 51,68 | |
| MWU | | | |

Tabelle 12: IFN- γ produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis im Vergleich zu Muschelkontrollen. Mann-Whitney-Test. n=25.

Th1- / Th2-Zytokine bei allergischen und nichtallergischen Polyposispatienten

Zeigen sich Unterschiede in der Produktion von Th1- und Th2-Zytokinen bei Polyposispatienten mit oder ohne allergische Sensibilisierung? Untersucht wurden 6 allergische und 9 nichtallergische Patienten mit einer chronisch-polypösen Rhinosinuitis.

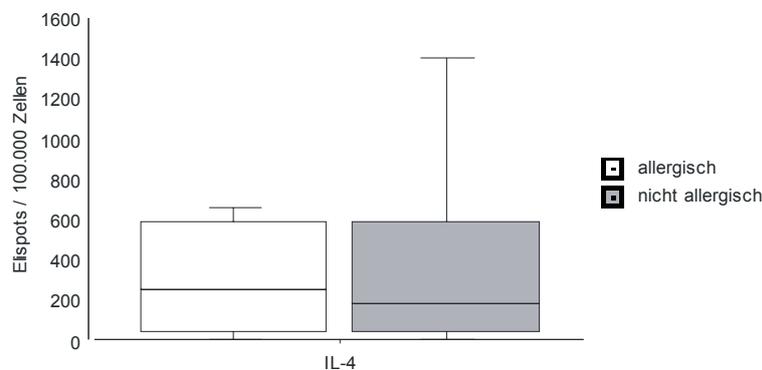


Abbildung 10: IL-4 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich Allergiker und Nichtallergiker. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IL-4 | MW | SEM | p-Wert |
|------------------|--------|--------|--------|
| allergisch | 300,67 | 112,53 | 0,91 |
| nicht allergisch | 439,78 | 189,08 | |
| MWU | | | |

Tabelle 13: IL-4 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich Allergiker und Nichtallergiker. Mann-Whitney-Test. n=15.

Für IL-4 und IL-5 produzierende Zellen zeigen sich keine bedeutenden Unterschiede in den Mittelwerten zwischen allergisch sensibilisierten und nichtsensibilisierten Patienten mit chronisch-polypöser Rhinosinusitis.

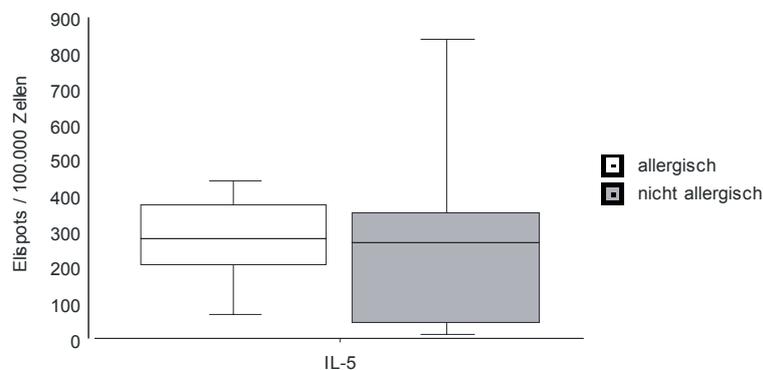


Abbildung 11: IL-5 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich Allergiker und Nichtallergiker. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median), 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IL-5 | MW | SEM | p-Wert |
|------------------|--------|--------|--------|
| allergisch | 275,42 | 56,48 | 0,72 |
| nicht allergisch | 306,50 | 112,40 | |
| MWU | | | |

Tabelle 14: IL-5 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich Allergiker und Nichtallergiker. Mann-Whitney-Test. n=15.

IL-8 produzierende Zellen sind bei Polyposispatienten ohne allergische Sensibilisierung im Mittelwert über 2,5-fach erhöht, eine statistische Signifikanz wird im MWU-Test jedoch nicht erreicht.

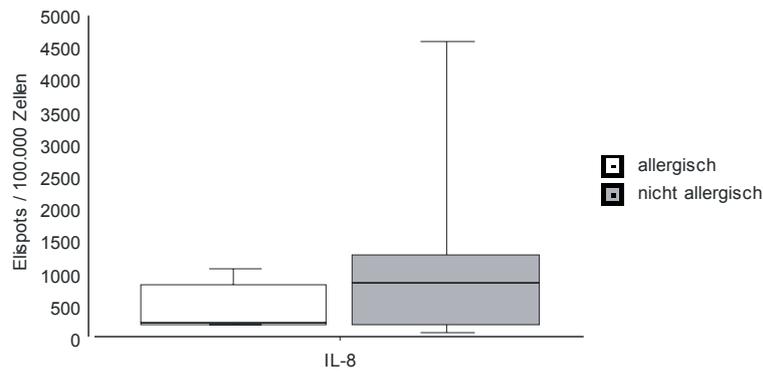


Abbildung 12: IL-8 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich Allergiker und Nichtallergiker. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IL-8 | MW | SEM | p-Wert |
|------------------|---------|--------|--------|
| allergisch | 454,17 | 161,82 | 0,55 |
| nicht allergisch | 1313,89 | 672,94 | |
| MWU | | | |

Tabelle 15: IL-8 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich Allergiker und Nichtallergiker. Mann-Whitney-Test. n=15.

Die IL-12 und IFN- γ produzierenden Zellen sind im Vergleich von Patienten mit Polyposis nasi mit oder ohne allergische Sensibilisierung ebenfalls nur unwesentlich verändert.

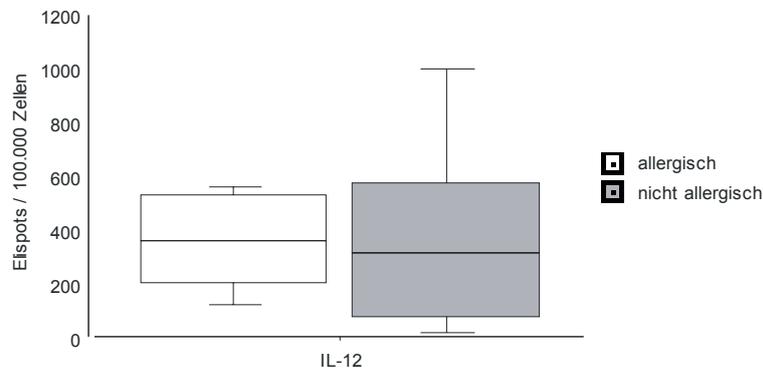


Abbildung 13: IL-12 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich Allergiker und Nichtallergiker. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IL-12 | MW | SEM | p-Wert |
|------------------|--------|--------|--------|
| allergisch | 354,16 | 73,47 | 0,72 |
| nicht allergisch | 382,67 | 130,61 | |
| MWU | | | |

Tabelle 16: IL-12 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich Allergiker und Nichtallergiker. Perzentile. Mann-Whitney-Test. n=15.

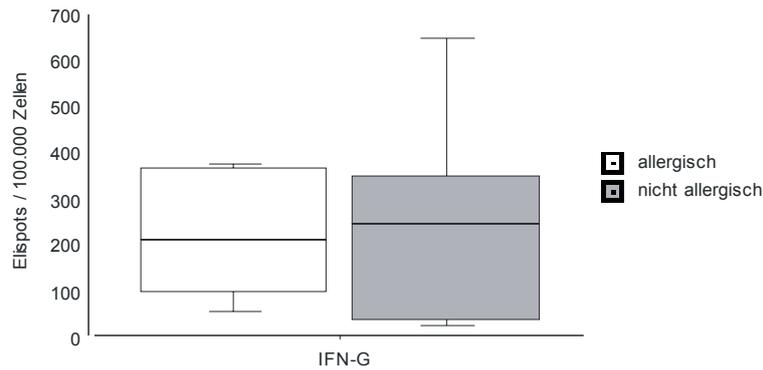


Abbildung 14: IFN- γ produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich Allergiker und Nichtallergiker. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IFN- γ | MW | SEM | p-Wert |
|------------------|--------|-------|--------|
| allergisch | 217,85 | 55,05 | >0,99 |
| nicht allergisch | 259,06 | 80,24 | |
| MWU | | | |

Tabelle 17: IFN- γ produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich Allergiker und Nichtallergiker. Mann-Whitney-Test. n=15.

Die Produktion von Th1- und Th2-Zytokinen bei Patienten mit einer Samters-Triade

Zeigen sich Unterschiede in der Produktion von Th1- und Th2-Zytokinen bei Polyposispatienten mit oder ohne Aspirinsensitivität? Untersucht wurden 3 Patienten des Samterschen Symptomkomplexes und 9 Patienten mit chronisch-polypöser Rhinosinusitis ohne Aspirinsensitivität.

Die Mittelwerte der Anzahl zytokinproduzierender Zellen für die Zytokine IL-4 und IL-5 in den beiden untersuchten Gruppen weisen nur geringgradige Unterschiede auf. Für IL-8 zeigen sich in der Gruppe der ASS-sensitiven Polyposispatienten ca. 40% weniger zytokinproduzierende Zellen als bei Patienten ohne Samters-Triade. Eine statistische Signifikanz wird aber nicht erreicht.

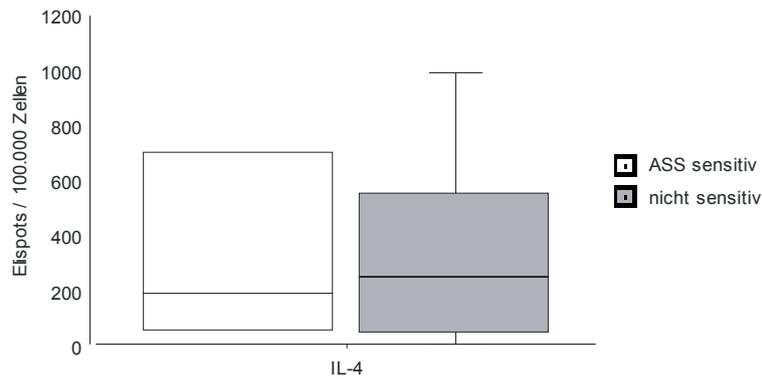


Abbildung 15: IL-4 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich aspirin- und nicht-sensitive Patienten. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IL-4 | MW | SEM | p-Wert |
|---------------|--------|--------|--------|
| ASS-Sensitiv | 356,83 | 262,95 | >0,99 |
| Nichtsensitiv | 390,96 | 140,51 | |
| MWU | | | |

Tabelle 18: IL-4 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich aspirin- und nicht-sensitive Patienten. Mann-Whitney-Test. n=15.

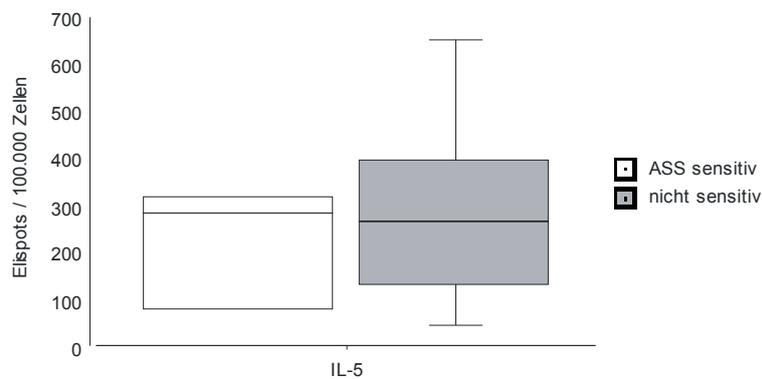


Abbildung 16: IL-5 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich aspirin- und nicht-sensitive Patienten. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IL-5 | MW | SEM | p-Wert |
|---------------|--------|-------|--------|
| ASS-Sensitiv | 207,50 | 99,58 | 0,67 |
| Nichtsensitiv | 315,71 | 83,54 | |
| MWU | | | |

Tabelle 19: IL-5 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich aspirin- und nicht-sensitive Patienten. Mann-Whitney-Test. n=15.

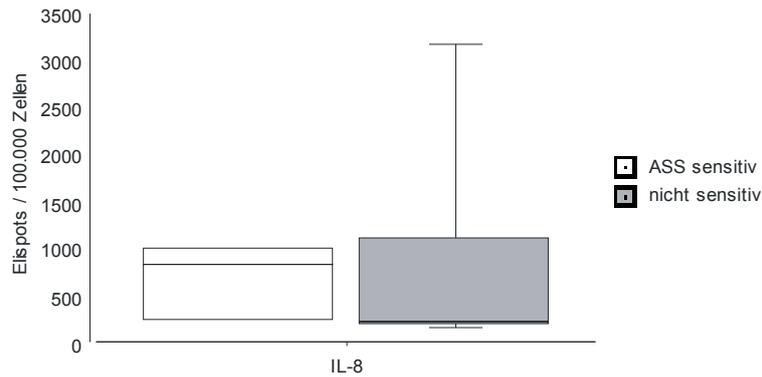


Abbildung 17: IL-8 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich aspirin- und nicht-sensitive Patienten. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IL-8 | MW | SEM | p-Wert |
|---------------|---------|--------|--------|
| ASS-Sensitiv | 641,67 | 302,88 | 0,77 |
| Nichtsensitiv | 1052,08 | 515,64 | |
| MWU | | | |

Tabelle 20: IL-8 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich aspirin- und nicht-sensitive Patienten. Mann-Whitney-Test. n=15.

Für IL-12 und IFN- γ zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Patientenkollektiven im Hinblick auf eine ASS-Sensitivität.

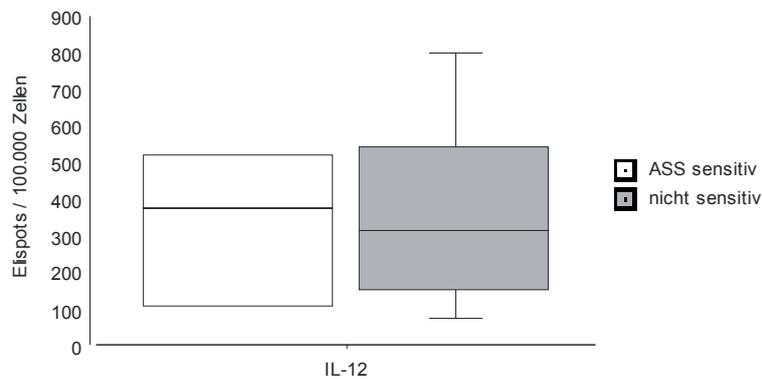


Abbildung 18: IL-12 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich aspirin- und nicht-sensitive Patienten. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IL-12 | MW | SEM | p-Wert |
|---------------|--------------|--------|--------|
| | ASS-Sensitiv | 319,83 | 161,58 |
| nichtsensitiv | 384,13 | 96,40 | |
| MWU | | | |

Tabelle 21: IL-12 produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich aspirin- und nicht-sensitive Patienten. Mann-Whitney-Test. n=15.

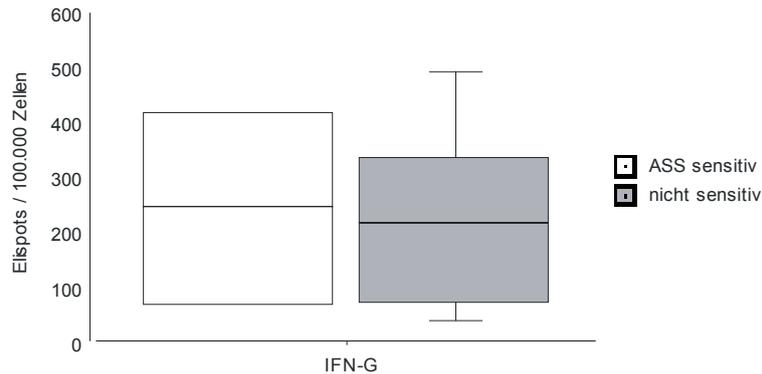


Abbildung 19: IFN-γ produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich aspirin- und nicht-sensitive Patienten. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IFN-γ | MW | SEM | p-Wert |
|---------------|--------------|--------|--------|
| | ASS-Sensitiv | 245,00 | 134,24 |
| Nichtsensitiv | 241,67 | 58,56 | |
| MWU | | | |

Tabelle 22: IFN-γ produzierende Zellen bei Patienten mit Polyposis. Vergleich aspirin- und nicht-sensitive Patienten. Mann-Whitney-Test. n=15.

Die Zytokinproduktion durch T-Zellen (CD3) – Depletion und positive Selektion

Untersucht wurde die Veränderung der Zytokinproduktion einzelner Zellen vor und nach Depletion CD3-positiver Zellen. Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Wilcoxon Vorzeichen Test. Zugleich wurde die Zytokinproduktion der positiv selektierten T-Zellen, sowohl bei Patienten mit Polyposis nasi als auch bei Patienten ohne Sinusitis untersucht. Die statistische Analyse erfolgt bei dieser Fragestellung mit dem Mann-Whitney U-Test.

Die Depletion CD3-positiver Zellen führt im Vergleich zu den unselektierten Zellen zu keiner relevanten Veränderung der IL-4 produzierenden Zellen, weder bei Patienten mit Polyposis nasi noch in der Kontrollgruppe. IL-4 produzierende T-Zellen lassen sich in 5 von 10 Fällen zeigen ($7,12 \pm 2,95$), bei Polyposispatienten in 3 von 5 Fällen ($11,76 \pm 5,26$) und in 2 von 5 Fällen in der Muschelkontrolle ($4,67 \pm 2,90$), eine statistische Signifikanz wird jedoch nicht erreicht.

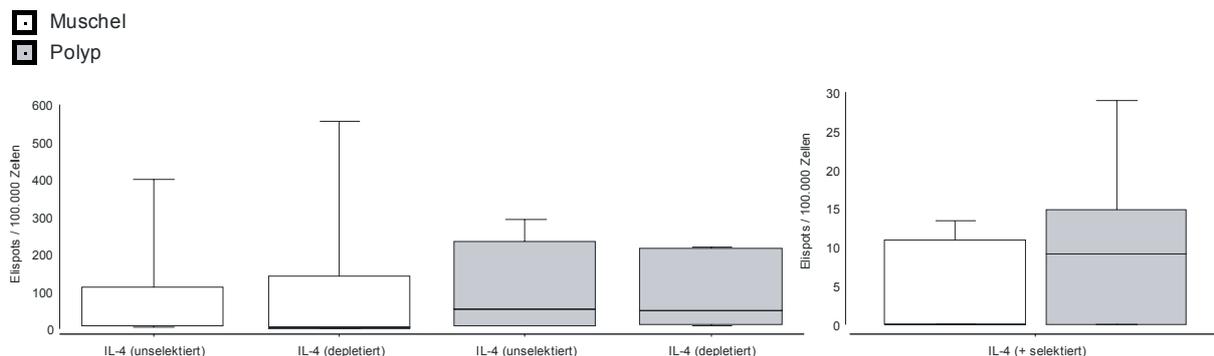


Abbildung 20: IL-4 produzierende Zellen. Darstellung unselektierter, CD3-depletierter und CD3-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median), 75. und 90. Perzentile. n=10.

| IL-4 | | MW | SEM | p-Wert |
|----------------------|---------------|--------|--------|--------|
| Muschel | | | | |
| | Unselektiert | 86,50 | 78,64 | 0,72 |
| | Depletiert | 112,70 | 109,83 | |
| | Wilcoxon Rank | | | |
| Polyp | | | | |
| | Unselektiert | 114,80 | 57,64 | 0,69 |
| | Depletiert | 100,70 | 47,65 | |
| | Wilcoxon Rank | | | |
| + Selektierte | | | | |
| | Muschel | 4,67 | 2,90 | 0,66 |
| | Polyp | 9,58 | 5,26 | |
| | MWU | | | |

Tabelle 23: IL-4 Produktion unselektierter, CD3-depletierter und CD3-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Wilcoxon-Rank Test und Mann-Whitney-Test. n=10.

In der Polyposisgruppe wird nach Depletion von T-Zellen signifikant weniger (-25%) IL-5 sezerniert. In der Kontrollgruppe lässt sich ein solcher Effekt nicht beobachten. Es zeigt sich in der Gegenprobe eine 9-fach höhere Anzahl IL-5 produzierender positiv selektierter T-Zellen in der Polyposisgruppe als in der Kontrollgruppe. Insgesamt lassen sich in 6 von 10 Proben IL-5 produzierende CD3-positive Zellen zeigen, davon 4 von 5 in der Polyposisgruppe und 2 von 5 in der Kontrollgruppe.

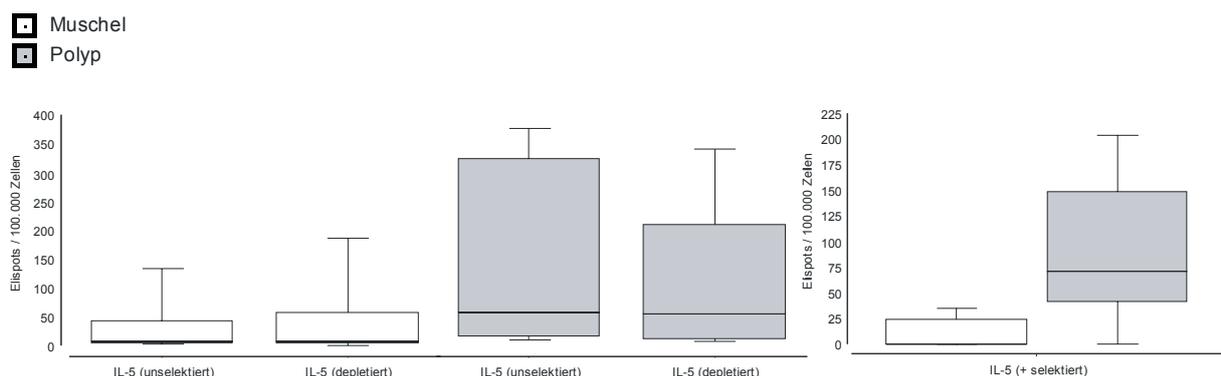


Abbildung 21: IL-5 produzierende Zellen. Darstellung unselektierter, CD3-depletierter und CD3-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median), 75. und 90. Perzentile. n=10.

| IL-5 | | MW | SEM | p-Wert |
|----------------------|---------------|--------|-------|--------|
| Muschel | | | | |
| | Unselektiert | 32,50 | 25,18 | 0,69 |
| | Depletiert | 42,60 | 35,92 | |
| | Wilcoxon Rank | | | |
| Polyp | | | | |
| | Unselektiert | 153,80 | 77,64 | 0,04 |
| | Depletiert | 116,20 | 62,85 | |
| | Wilcoxon Rank | | | |
| + Selektierte | | | | |
| | Muschel | 10,86 | 7,02 | 0,05 |
| | Polyp | 91,44 | 34,71 | |
| | MWU | | | |

Tabelle 24: IL-5 Produktion unselektierter, CD3-depletierter und CD3-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Wilcoxon-Rank Test und Mann-Whitney-Test. n=10.

Im Mittel führt die Depletion CD-3 positiver Zellen zu einem Rückgang der IL-8 produzierenden Zellen, diese Effekte sind jedoch nicht statistisch signifikant.

Die Anzahl der IL-8 produzierenden Zellen CD3-positiven Zellen ist in beiden Gruppen im Mittel nahezu gleich, in insgesamt 5 von 10 Fällen ($10,36 \pm 4,36$) können IL-8 produzierende Zellen nachgewiesen werden: in 3 von 5 Fällen in der Polyposisgruppe und in 2 von 5 Fällen in der Kontrollgruppe.

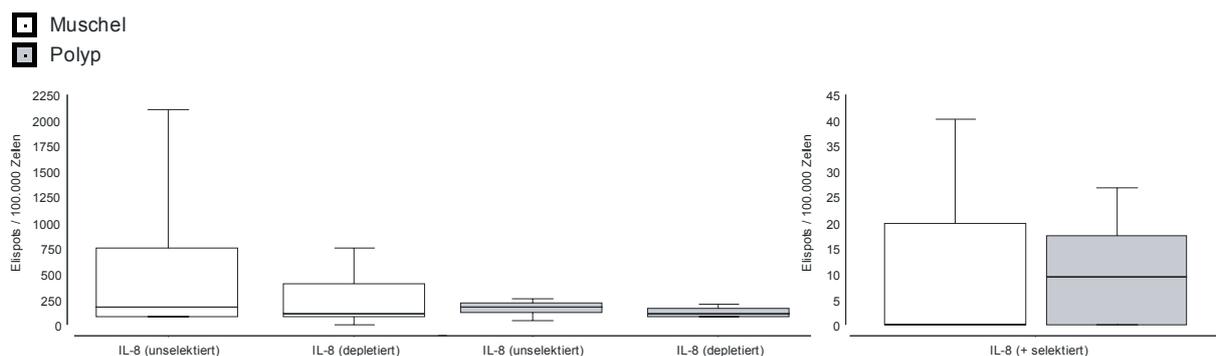


Abbildung 22: IL-8 produzierende Zellen. Darstellung unselektierter, CD3-depletierter und CD3-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median), 75. und 90. Perzentile. n=10.

| IL-8 | | MW | SEM | p-Wert |
|----------------------|---------------|--------|--------|--------|
| Muschel | | | | |
| | Unselektiert | 545,00 | 390,95 | 0,50 |
| | Depletiert | 250,00 | 134,16 | |
| | Wilcoxon Rank | | | |
| Polyp | | | | |
| | Unselektiert | 165,00 | 33,17 | 0,28 |
| | Depletiert | 120,00 | 24,24 | |
| | Wilcoxon Rank | | | |
| + Selektierte | | | | |
| | Muschel | 10,67 | 7,76 | 0,74 |
| | Polyp | 10,06 | 4,99 | |
| | MWU | | | |

Tabelle 25: IL-8 Produktion unselektierter, CD3-depletierter und CD3-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Wilcoxon-Rank Test und Mann-Whitney-Test. n=10.

In der Polyposisgruppe stellt sich keine signifikante Änderung der IL-12 produzierenden Zellen im Elispot nach Depletion der T-Zellen dar. Bei Betrachtung der Kontrollgruppe zeigt sich nach Depletion der T-Zellen ein signifikanter Rückgang der IL-12 produzierenden Zellen im Mittel um ca. 30%. Es lassen sich bei den CD3-positiven Zellen in 5 von 10 Fällen IL-12 produzierende Zellen nachweisen ($27,41 \pm 12,73$), davon in 4 von 5 Fällen in der Polyposisgruppe und in 1 von 5 Fällen in der Kontrollgruppe.

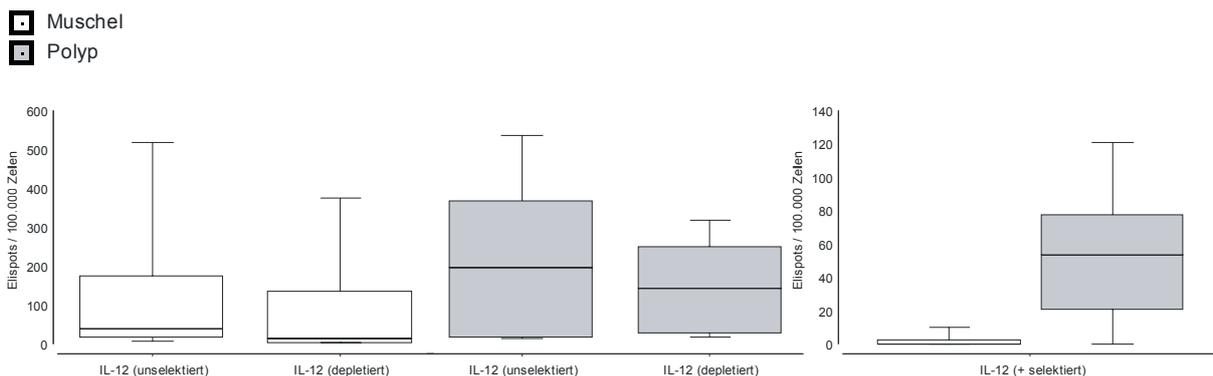


Abbildung 23: IL-12 produzierende Zellen. Darstellung unselektierter, CD3-depletierter und CD3-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median), 75. und 90. Perzentile. n=10.

| IL-12 | | MW | SEM | p-Wert |
|----------------------|---------------|--------|-------|--------|
| Muschel | | | | |
| | Unselektiert | 129,00 | 97,20 | |
| | Depletiert | 90,00 | 71,45 | |
| | Wilcoxon Rank | | | 0,04 |
| Polyp | | | | |
| | Unselektiert | 216,20 | 97,24 | |
| | Depletiert | 146,80 | 57,24 | |
| | Wilcoxon Rank | | | 0,69 |
| + Selektierte | | | | |
| | Muschel | 2,00 | 2,00 | |
| | Polyp | 52,83 | 20,06 | |
| | MWU | | | 0,03 |

Tabelle 26: IL-12 Produktion unselektierter, CD3-depletierter und CD3-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Wilcoxon-Rank Test und Mann-Whitney-Test. n=10.

Die Depletion CD3-positiver Zellen führt in der Polyposisgruppe im Mittelwert zu einem Rückgang der IFN- γ produzierenden Zellen um ca. 40%. In der Muschelkontrolle stellen sich nach Depletion nahezu doppelt so viele IFN- γ produzierende Zellen dar, beide Effekte erreichen aber keine statistische Signifikanz. In 5 von 10 Fällen lässt sich eine Produktion von IFN- γ durch positiv selektierte T-Zellen nachweisen ($40,55 \pm 18,96$), dabei in 4 von 5 Fällen in der Polyposisgruppe und 1 von 5 Fällen der Kontrollgruppe. Es finden sich 10-fach mehr IFN- γ produzierende T-Zellen in der Polyposisgruppe als in der Kontrollgruppe, dieser Effekt ist statistisch signifikant.

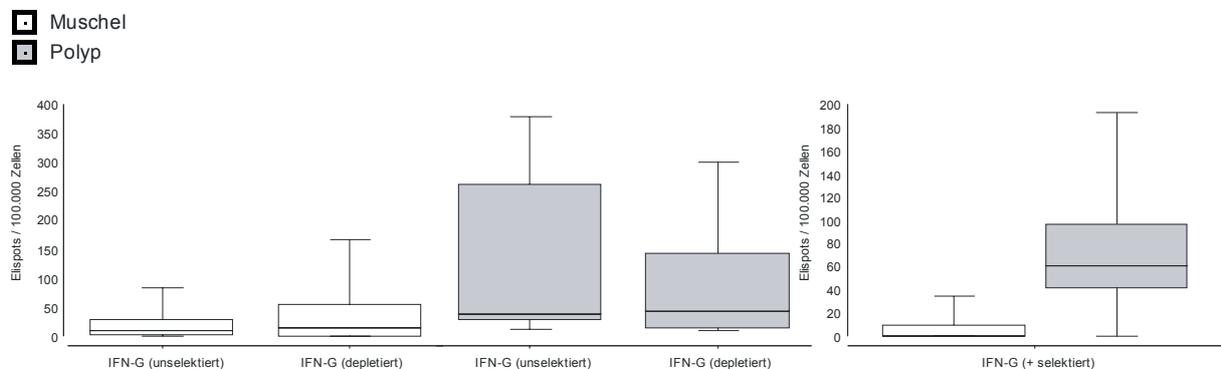


Abbildung 24: IFN- γ produzierende Zellen. Darstellung unselektierter, CD3-depletierter und CD3-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median), 75. und 90. Perzentile. n=10.

| IFN- γ | | MW | SEM | p-Wert |
|----------------------|---------------|--------|-------|--------|
| Muschel | | | | |
| | Unselektiert | 20,40 | 15,51 | |
| | Depletiert | 39,80 | 32,01 | |
| | Wilcoxon Rank | | | 0,14 |
| Polyp | | | | |
| | Unselektiert | 136,50 | 71,07 | |
| | Depletiert | 90,90 | 54,08 | |
| | Wilcoxon Rank | | | 0,14 |
| + Selektierte | | | | |
| | Muschel | 6,86 | 6,86 | |
| | Polyp | 74,23 | 31,67 | |
| | MWU | | | 0,03 |

Tabelle 27: IFN- γ Produktion unselektierter, CD3-depletierter und CD3-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Wilcoxon-Rank Test und Mann-Whitney-Test. n=10.

Die Zytokinproduktion durch Makrophagen (CD14)

– Depletion und positive Selektion

Untersucht wurde die Veränderung der Zytokinproduktion einzelner Zellen vor und nach Depletion CD14-positiver Zellen. Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Wilcoxon Vorzeichen Test. Zugleich wurde die Zytokinproduktion der positiv selektierten Makrophagen und anderer CD14-positiver Zellen, sowohl bei Patienten mit Polyposis nasi als auch bei Patienten ohne Sinusitis untersucht. Die statistische Analyse erfolgt bei dieser Fragestellung mit dem Mann-Whitney U-Test.

Die Depletion CD14-positiver Zellen führt im Vergleich zu den unselektierten Zellen zu keiner relevanten Veränderung der IL-4 produzierenden Zellen, weder bei Patienten mit Polyposis nasi noch in der Kontrollgruppe. Ein IL-4 Signal CD14 positiver Zellen lässt sich in 3 von 15 Fällen zeigen ($2,04 \pm 1,06$), bei Polyposispatienten in 2 Fällen ($1,86 \pm 1,26$) und in 1 Fall in der Muschelkontrolle ($2,67 \pm 2,67$), ein statistisch signifikanter Unterschied wird jedoch nicht erreicht.

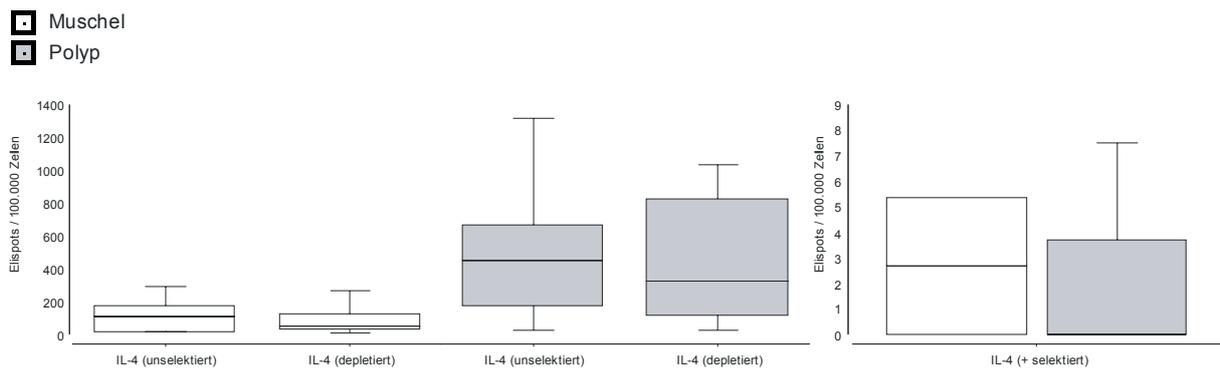


Abbildung 25: IL-4 produzierende Zellen. Darstellung unselektierter, CD14-depletierter und CD14-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median), 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IL-4 | | MW | SEM | p-Wert |
|----------------------|---------------|--------|--------|--------|
| Muschel | | | | |
| | Unselektiert | 113,20 | 49,84 | |
| | Depletiert | 86,60 | 46,07 | |
| | Wilcoxon Rank | | | 0,14 |
| Polyp | | | | |
| | Unselektiert | 518,80 | 163,75 | |
| | Depletiert | 458,70 | 127,41 | |
| | Wilcoxon Rank | | | 0,31 |
| + Selektierte | | | | |
| | Muschel | 2,67 | 2,67 | |
| | Polyp | 1,86 | 1,26 | |
| | MWU | | | 0,60 |

Tabelle 28: IL-4 Produktion unselektierter, CD14-depletierter und CD14-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Wilcoxon-Rank Test und Mann-Whitney-Test. n=15.

Ähnlich verhält es sich für IL-5. Auch hier zeigt sich nach Depletion CD14-positiver Zellen keine relevante Veränderung der zytokinproduzierenden Zellen, weder bei Patienten mit Polyposis nasi noch in der Kontrollgruppe. Ein IL-5 Signal CD14 positiver Zellen lässt sich in 3 von 15 Fällen zeigen, jedoch nur bei Polyposispatienten ($1,73 \pm 1,11$).

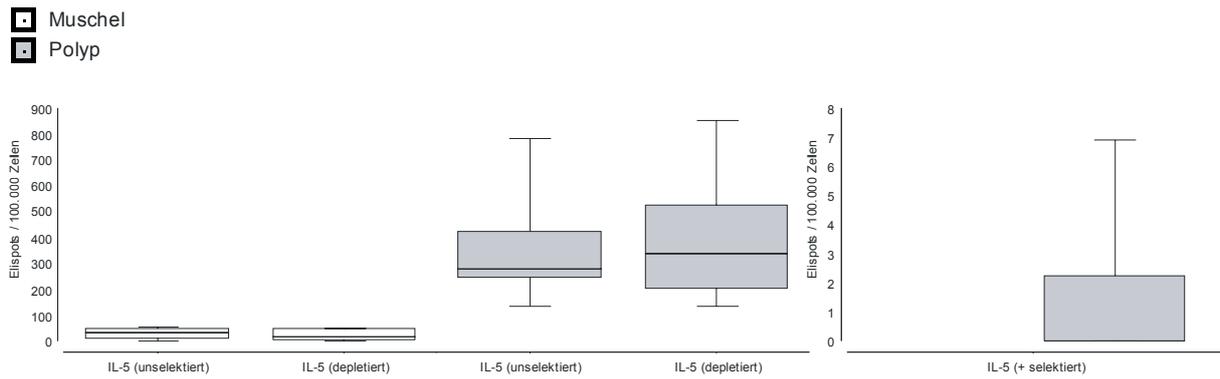


Abbildung 26: IL-5 produzierende Zellen. Darstellung unselektierter, CD14-depletierter und CD14-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IL-5 | | MW | SEM | p-Wert |
|----------------------|---------------|--------|-------|--------|
| Muschel | | | | |
| | Unselektiert | 29,10 | 10,37 | 0,50 |
| | Depletiert | 24,60 | 10,35 | |
| | Wilcoxon Rank | | | |
| Polyp | | | | |
| | Unselektiert | 364,20 | 90,72 | 0,72 |
| | Depletiert | 399,45 | 87,34 | |
| | Wilcoxon Rank | | | |
| + Selektierte | | | | |
| | Muschel | 0,00 | 0,00 | 0,30 |
| | Polyp | 1,73 | 1,11 | |
| | MWU | | | |

Tabelle 29: IL-5 Produktion unselektierter, CD14-depletierter und CD14-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Wilcoxon-Rank Test und Mann-Whitney-Test. n=15.

Die Depletion von Makrophagen und anderen CD14-positiven Zellen führt in der Polypengruppe zu keiner relevanten Änderung der IL-8 produzierenden Zellen. In der Kontrollgruppe zeigt sich ein signifikanter Rückgang der IL-8 produzierenden Zellen um ca. 75 %. Die CD14-positiven Zellen produzieren IL-8 in insgesamt 4 von 15 Fällen ($7,95 \pm 4,64$), in 2 Fällen der Polyposisgruppe ($1,93 \pm 1,25$) und 2 Fällen der Kontrollgruppe ($29,00 \pm 13,00$), dieser Unterschied ist statistisch signifikant.

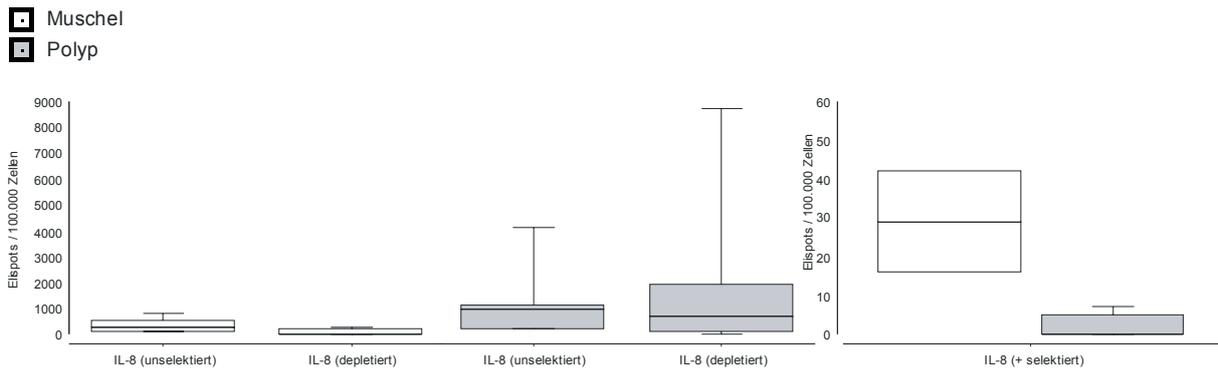


Abbildung 27: IL-8 produzierende Zellen. Darstellung unselektierter, CD14-depletierter und CD14-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median), 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IL-8 | | MW | SEM | p-Wert |
|----------------------|---------------|---------|---------|--------|
| Muschel | | | | |
| | Unselektiert | 325,00 | 120,42 | |
| | Depletiert | 75,00 | 47,43 | |
| | Wilcoxon Rank | | | 0,04 |
| Polyp | | | | |
| | Unselektiert | 1372,50 | 588,49 | |
| | Depletiert | 2235,00 | 1104,86 | |
| | Wilcoxon Rank | | | 0,92 |
| + Selektierte | | | | |
| | Muschel | 29,00 | 13,00 | |
| | Polyp | 1,93 | 1,25 | |
| | MWU | | | 0,03 |

Tabelle 30: IL-8 Produktion unselektierter, CD14-depletierter und CD14-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Wilcoxon-Rank Test und Mann-Whitney-Test. n=15.

Die Depletion CD14-positiver Zellen führt weder in der Polypengruppe noch in der Muschelkontrolle zu einer relevanten Veränderung der IL-12 produzierenden Zellen. IL-12 produzierende CD14-positive Zellen lassen sich in 4 von 15 Fällen nachweisen ($12,64 \pm 6,86$), davon in 3 der Polyposisgruppe ($15,48 \pm 8,62$) und 1 Fall der Kontrollgruppe ($2,67 \pm 2,67$).

Muschel
 Polyp

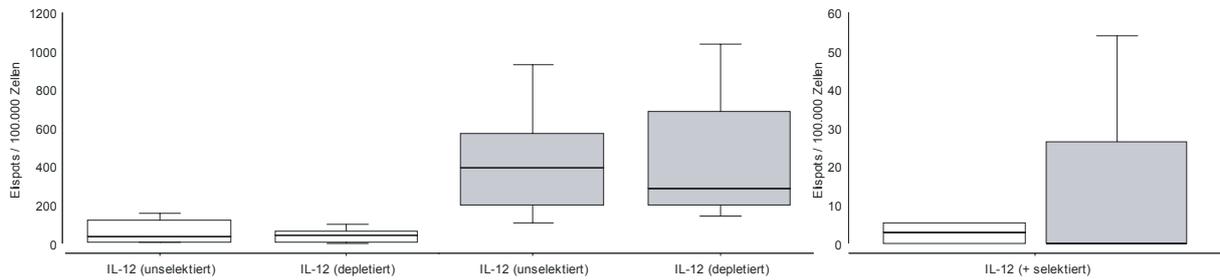


Abbildung 28: IL-12 produzierende Zellen. Darstellung unselektierter, CD14-depletierter und CD14-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median) , 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IL-12 | | MW | SEM | p-Wert |
|----------------------|---------------|--------|--------|--------|
| Muschel | | | | |
| | Unselektiert | 61,70 | 29,67 | |
| | Depletiert | 38,80 | 16,61 | |
| | Wilcoxon Rank | | | 0,27 |
| Polyp | | | | |
| | Unselektiert | 448,80 | 106,66 | |
| | Depletiert | 437,35 | 109,94 | |
| | Wilcoxon Rank | | | 0,72 |
| + Selektierte | | | | |
| | Muschel | 2,67 | 2,67 | |
| | Polyp | 15,48 | 8,62 | |
| | MWU | | | 0,75 |

Tabelle 31: IL-12 Produktion unselektierter, CD14-depletierter und CD14-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Wilcoxon-Rank Test und Mann-Whitney-Test. n=15.

Auch bei IFN- γ stellt sich keine relevante Änderung nach Depletion der CD14-positiven Zellen dar, IFN- γ produzierende CD14-positive Zellen lassen sich in 2 von 9 Fällen, jedoch nur in Polyposisproben ($1,05 \pm 0,73$) nachweisen.

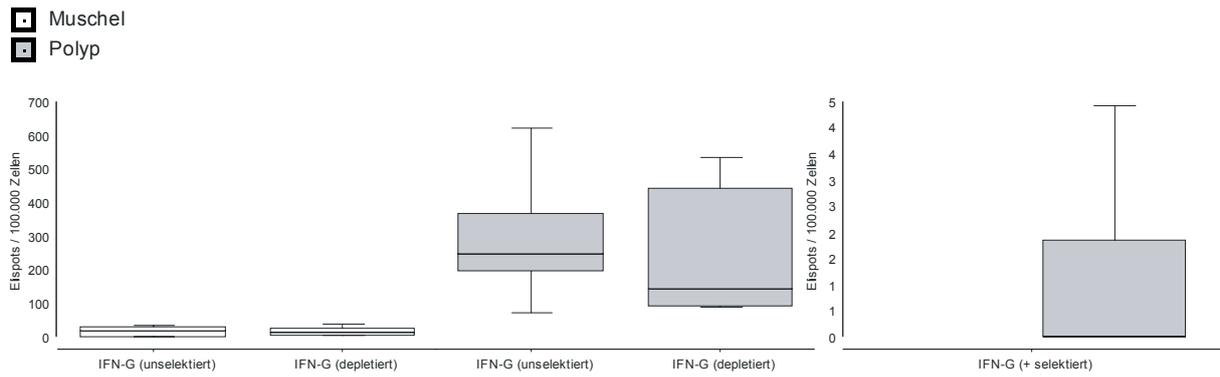


Abbildung 29: IFN- γ produzierende Zellen. Darstellung unselektierter, CD14-depletierter und CD14-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Box-Plots mit 10., 25., 50. (=Median), 75. und 90. Perzentile. n=15.

| IFN- γ | | MW | SEM | p-Wert |
|----------------------|---------------|--------|-------|--------|
| Muschel | | | | |
| | Unselektiert | 14,90 | 6,19 | 0,89 |
| | Depletiert | 14,80 | 5,52 | |
| | Wilcoxon Rank | | | |
| Polyp | | | | |
| | Unselektiert | 295,25 | 64,61 | 0,29 |
| | Depletiert | 252,65 | 60,51 | |
| | Wilcoxon Rank | | | |
| + Selektierte | | | | |
| | Muschel | 0,00 | 0,00 | 0,42 |
| | Polyp | 1,05 | 0,73 | |
| | MWU | | | |

Tabelle 32: IFN- γ Produktion unselektierter, CD14-depletierter und CD14-positiv selektierter Zellen bei Patienten mit Polyposis und der Muschelkontrolle. Wilcoxon-Rank Test und Mann-Whitney-Test. n=15.

4. Diskussion

Die Messung von Zytokinen mit dem ELISPOT-Assay

Drei Methoden der Zytokinmessung

Zytokine lassen sich mit sehr verschiedenen Methoden messen: auf der mRNA-Ebene beispielsweise mittels quantitativer PCR, auf Proteinebene mit dem ELISA oder dem ELISPOT.

Der ELISPOT ist ein kombinierter Festphasenassay, der ähnlich einem ELISA mit einem festphasengebundenen spezifischen Antikörper die zu detektierende Substanz bindet, und mittels eines Brückenantikörpers und einer antikörperligierten Enzymaktivität, genau dort wo die gesuchte Substanz gebunden wurde, eine Farbstoffreaktion katalysiert. Der Unterschied zum ELISA besteht darin, dass genau an dem Ort, wo sich Zellen befunden und das gesuchte Zytokin produziert haben, ein Signal (=Spot) entsteht. Dadurch erhält man die Information, ob in der untersuchten Zellsuspension Zellen sind, die die Targets substanz produzieren und wie viele es sind.

Der ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) misst mittels detektierender Antikörper die gesuchte Substanz. Proportional der Konzentration der gesuchten Substanz und damit gebundenem Antikörper wird eine Farbstoffreaktion katalysiert, die photometrisch durch Bestimmung der Extinktion quantifiziert wird. Mit diesem quantitativen Verfahren lassen sich bereits geringe Zytokinkonzentrationen nachweisen.

Die quantitative PCR (Polymerase Chain-Reaction) von Zytokin-mRNA hat den Vorteil, dass nur sehr geringe Probenmengen benötigt werden und eine hohe Sensitivität der Methode besteht. Kennt man die Sequenz der genomischen DNA eines Zytokins lässt sich beinahe beliebig ein passender *Primer* für die notwendige Amplifikation synthetisieren. So kann man Zytokine messen, deren genaue Proteinstruktur unbekannt ist und für die es noch keine detektierenden Antikörper gibt. Der Nachteil der Verfahren auf Nukleinsäurebasis ist, dass zwar die Transkripte gemessen werden, jedoch translationale Prozesse oder posttranslationale Modifikationen völlig unberücksichtigt bleiben. Folglich ist es schwierig zu beurteilen, ob, wie und in welcher Menge das Zytokin produziert wurde und somit auch, ob es in vivo funktionell relevant ist (Abbildung 30).

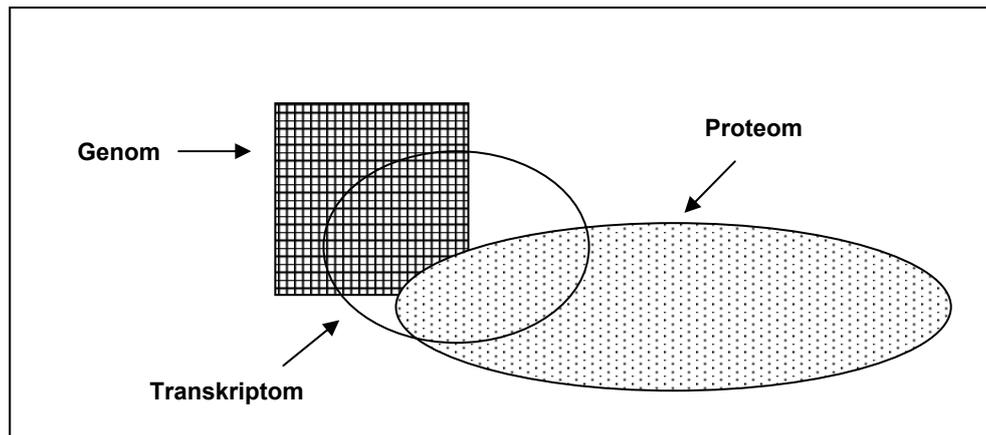


Abbildung 30: Genom, Transkriptom und Proteom bilden nur teilweise Schnittmengen.

Von den hier vorgestellten Methoden bietet der von Czerkinsky (Czerkinsky, Nilsson et al. 1983) entwickelte ELISPOT die höchste Sensitivität (Stott David I. 2000). Zudem liegt in dieser Methode die Möglichkeit de facto biologisch aktive Zytokine auf dem Niveau der einzelnen, vitalen Zelle zu messen.

Einschränkungen ergeben sich vor allem wegen der vergleichsweise grossen Probenmengen, die benötigt werden. Ferner sind die schwierige Entwicklung und komplexe Proteinchemie der Tertiär- und Quartärstruktur von Antikörpern und Zytokinen sowie das Risiko unspezifischer Bindungsreaktionen zu berücksichtigen. Dem wurde hier durch ausführliche Positiv- und Negativkontrollen Rechnung getragen.

Die Verwendung von Operationspräparaten und die nur kurze Inkubationszeit der Zellen von 2h führt zu einer unmittelbaren Nähe zu *in vivo* Prozessen, ein Vorteil im Vergleich zu möglicherweise milieuverfälschenden Zellkulturen.

Welche Zytokine wurden gemessen?

Gemessen wurden IL-8, IL-4 und IL-5, IL-12 und IFN- γ .

IL-8 als chemoattraktives Zytokin (=Chemokin) wurde gemessen, um eine generelle Übersicht über die chemotaktische Aktivität in den Proben zu erhalten. IL-8 ist ein 8kDa (72 Aminosäuren) Chemokin der auf Chromosom 4 codierten CXC-Familie und rekrutiert vornehmlich Neutrophile, unter bestimmten Bedingungen auch Basophile und T-Zellen. Als Quelle für IL-8 kommen neben Makrophagen und Monozyten auch Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen in Frage. Die biologische Aktivität von IL-8 wird überwiegend von Rezeptoren des Typs CXCR1/2 vermittelt.

IL-4 und IL-5 wurden als proinflammatorische Zytokine des Th2-Typs gemessen. IL-4 ist ein monomeres 129 Aminosäuren umfassendes Protein, welches als proinflammatorisches Zytokin über die Rezeptoren CD124 (IL4R) und CD132 (sog. *common β -chain* oder *common cytokine receptor unit*) eine biologische Wirkung vermittelt, die vor allem eine generalisierte B-Zellaktivierung sowie (mit IL-13 zusammen) einen Isotypen-Switch der durch B-Zellen produzierten Immunglobuline in Richtung IgE bedingt. Des Weiteren hat IL-4 eine Bedeutung für die Expression von Adhäsionsmolekülen. Quellen für IL-4 sind vor allem T-Zellen und Mastzellen. IL-5 ist ein homodimeres 115 Aminosäuren umfassendes Protein mit proinflammatorischen und antiapoptotischen Eigenschaften und scheint eine überaus wichtige Rolle im *Microenvironment* für die Eosinophilen zu spielen, aber auch eine Fernwirkung auf die Eosinophilenproduktion im Knochenmark zu haben (Giembycz and Lindsay 1999). Es spielt offenbar ebenfalls eine Rolle im IgE-Switch. Die biologische Wirkung wird überwiegend über CD125 (IL-5-Rezeptor) vermittelt.

Auf der Seite der Th1-Zytokine wurden IL-12 und Interferon γ (IFN- γ) gemessen. IL-12 kommt als 197 und 306 Aminosäuren umfassendes heterodimeres Protein (p70) vor und besteht aus einer p35 und einer p40 Untereinheit. Seine Wirkungen werden überwiegend der angeborenen Immunität zugeordnet. Zum Teil wird IL-12p40 der angeborenen Immunität zugerechnet und von IL-12p70 unterschieden, welches von der adaptiven T-Zellantwort abhängig sei (Abdi 2002). IL-12 verbindet mittels verschiedener Regelkreisläufe die angeborene mit der spezifischen Immunität (Trinchieri 2003). Ursprünglich in B-Zellen gemessen, gilt IL-12 inzwischen als Makrophageninterleukin.

Seine Wirkung betrifft hauptsächlich eine Aktivierung von NK-Zellen sowie eine Induktion eines Th1 Milieus, vermittelt durch die Rezeptoren IL-12R β 1 und IL-12R β 2.

Interferon γ (IFN- γ), ein homodimeres 143 Aminosäuren umfassendes Protein ist weniger als die anderen Interferone für seine antivirale Aktivität, sondern viel mehr für die Aktivierung von Makrophagen relevant. Es spielt eine Hauptrolle in der Regulation der MHCII Moleküle (Farrar and Schreiber 1993; Ramanathan, Lantz et al. 1994) und damit auch für die Unterscheidung von körperfremd und körpereigen. Es ist zudem Effektormolekül und führt zu Apoptoseinduktion. Zusammen mit IL-12 stellt IFN- γ einen Hauptregulationsweg für eine Th1-medierte Entzündungsreaktion

aber auch für die Antigenpräsentation und die Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar.

Immunomagnetische Zellseparation

Das Problem der Depletion und der Zytoselektion

Welche Zellen welche Zytokine produzieren lässt sich auf verschiedenen Wegen mit Hilfe des ELISPOTs darstellen. Neben den inzwischen etablierten, jedoch fehleranfälligeren *Bicolour*-und *Tricolour*- ELISPOTs, die mehrere Targets simultan detektieren können, bieten sich vor allem Zellsortierungen und Selektionsvorgänge vor dem eigentlichen Assay an. Hierbei sind physikalische, z.B. zentrifugations- oder adhäsionsunterstützte Verfahren, Zellsortierung mittels der Flowzytometrie und die Zellassortierung mit antikörperbeschichteten magnetisierten *beads* zu erwähnen. Die physikalischen Verfahren bieten bei z.B. Dichtegradientenzentrifugation und Adhäsions-Dilutionsverfahren einen vergleichsweise niedrigen materiellen wie zeitlichen Aufwand. Sie sind jedoch wenig selektiv und häufig fehlerbehaftet, da die Hauptdeterminanten für die Selektion Dichte (Masse und Auftrieb) oder unspezifische Adhäsion zu physikalischen Oberflächen sind.

Die FACS (Flowzytometrie) gilt als sehr genau, ist apparativ und finanziell recht aufwendig. Nicht jede Flowzytometrie erlaubt auch eine Sortierung der Zellen, hierfür benötigt man einen FACS-Sorter. Durch Kombination mit den beiden anderen genannten Methoden lassen sich sehr gute Ergebnisse erzielen. Kritisch allerdings ist die Viabilität der Zellen nach einer solchen Zytometrie. Alternativ zum ELISPOT kann man die Flowzytometrie dazu nutzen, intrazellulär Zytokine zu messen. Der Vorteil ist eine schnelle funktionale und typisierende Messung, allerdings stellt sich auch hier die Frage nach der externen Validität dieser Messung, da die gemessenen intrazellulär gefärbten Zytokine noch nicht sezerniert wurden.

Antikörperbeschichtete magnetisierte *Beads*

Die Zellseparation mittels antikörperbeschichteter und magnetisierter *beads* ermöglicht eine hohe Selektionsspezifität bei moderatem apparativen Aufwand und

verhältnismäßig geringer Belastung für die Zellen. Deshalb wurde diese Methode für die zu Grunde liegende Studie ausgewählt. Voraussetzung ist die Kenntnis vorhandener und „verankerter“ Oberflächenmoleküle z.B. GPI-Moleküle (= Glycosylphosphatidylinositolanker), an denen sich die Zellen im wahrsten Sinne des Wortes „abschleppen“ lassen. Gerade durch die enzymatische Verarbeitung der für Selektion und Assay notwendigen Einzelzellsuspensionen - wenn man nicht mit aus dem Blut gewonnenen mononukleären Zellen arbeitet - können jedoch auch die Glykokalices in Mitleidenschaft gezogen werden. Eine weitere Einschränkung resultiert aus der unspezifischen Phagozytose der magnetisierten *beads* durch Makrophagen, so dass der Reinheitsgrad positiv selektierter Zellen vermindert sein kann. Dieser Effekt lässt sich durch eine protrahierte, sequentielle (z.B. zwei hintereinandergeschaltete) Zellseparationen mit verkürzter Inkubationszeit vermindern, so auch im hier zu Grunde liegenden Versuchsprotokoll.

Es gibt drei denkbare Vorgehensweisen, um mittels antikörperbeschichteter magnetisierter *beads* gesuchte Zelltypen zu isolieren.

1. Positive Selektion von Zellen mit bekanntem Oberflächenantigen: man wählt für die Selektion einen passenden Antikörper für die zu selektierende Zielzelle, inkubiert die Zellsuspension mit den passenden antikörperligierten paramagnetischen *beads* und selektiert in einem Magnetfeld die gewünschten Zellen aus der Suspension.
2. Bei der negativen Selektion werden Zellen mit bekannten Oberflächenantigenen aus der Zellsuspension selektiert, die verbleibenden Zellen mit unbekanntem oder weniger spezifischen Oberflächenmarkern werden untersucht.
3. Die Zelldepletion ist die Entfernung eines bestimmten Zelltyps aus der Zellsuspension. Die depletierten Zellen entsprechen positiv selektierten Zellen.

Welche Zellen sind für eine Depletion und positive Selektion interessant?

Bereits in der Einleitung wurde die außerordentliche Bedeutung der antigenpräsentierenden Zellen, v.a. der Makrophagen, und auf der Effektoreseite der T-Lymphozyten beschrieben. Daher wurde in dieser Studie eine genauere Untersuchung der modifizierten Sekretionsmuster nach Depletion dieser Zellen aus der Zellsuspension, sowie der Durchführung eines ELISPOT mit positiv selektierten Zellen (bei jedoch vergleichsweise niedrigen Zellzahlen) vorgenommen. Dabei wurden für die antigenpräsentierenden Zellen (APC), in diesem Falle Makrophagen und Monozyten, das Oberflächenmolekül CD14, der Rezeptor für LPS (=Lipopolysaccharid), ausgewählt. Dieser Rezeptor ist in der Entstehung einer endotoxinvermittelten Sepsis zusammen mit anderen LPS-Rezeptoren vom TLR-Typ (=toll like receptor) von entscheidender Bedeutung. Für die T-Zellen wurde der Pan-T-Marker CD3 (der T-Zellrezeptor; TCR), als Selektionszielantigen ausgewählt. Der TCR ist essentiell für die antigenvermittelte Aktivierung der T-Lymphozyten, aber auch für das Erlernen der Immuntoleranz. Die für die Selektion verwendeten Antikörper sind dadurch, dass sie auf diesen Rezeptor partiell agonistisch wirken, auch im Hinblick auf einen mit positiv selektierten Zellen durchgeführten ELISPOT von zusätzlichem Interesse.

Grenzen der Methode

Der ELISPOT ist ein hochsensitiver, zuverlässiger Sandwichassay. Positiv- und Negativkontrollen wurden in dieser Studie immer mitgeführt. Proben deren Auswertung uneindeutig war oder in denen unklare Positiv- oder Negativkontrollen vorlagen, wurden aus der Studie ausgeschlossen (n=2).

Bei Depletion mittels magnetischer *beads* und daran kovalent gebundener Antikörper kann keine hundertprozentige Depletion der gesuchten Zellen erwartet werden. Zudem wurde eine aus einem Gewebeblock gewonnene Einzelzellsuspension eingesetzt. Im Vergleich zur Depletion oder positiven Selektion und Anreicherung aus gewaschenen peripheren mononukleären Blutzellen werden die zu untersuchenden Zellen potentiell bedrohlichen Enzymen ausgesetzt, „störende“ Epithelzellen sind ebenfalls vorhanden. Die im Anschluss an die immunomagnetische Zellseparation durchgeführte Zellzählung mit

Trypanblauvitalfärbung ermöglicht dennoch eine direkte Erfolgskontrolle und Quantifizierung der selektierten Zellen. Die positiv selektierten Zellen sind direkt durch die antikörpergebundenen *beads* markiert, ferner erfolgt eine Überprüfung der Viabilität der Zellen. Die dann durchgeführten ELISPOTs wurden mit standardisierten Zellzahlen viabler Zellen durchgeführt. Daraus ergibt sich eine bessere direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Unterschiedlich hohe Zellzahlen können zu Summationseffekten durch positive „*feedback-loops*“ bei höheren respektive niedrigeren Zellzahlen führen und sind daher zu vermeiden. Es gibt eine Mindestzellzahl, eine „kritischer Masse“, um Zytokine mit der hier beschriebenen ELISPOT-Methode zu messen: die dieser Studie zugrunde liegende Untergrenze von ca. 5000 Zellen pro *well* bei den Zytokinen IL-4, IL-5, IL-12 und IFN- γ bereitete bei der Durchführung der ELISPOTs mit den positiv selektierten Zellen gelegentlich Schwierigkeiten, da die Anzahl der positiv selektierten Zellen nicht immer zur Durchführung eines ELISPOT-Assay ausreichte.

Die Untersuchung der interindividuell einer großen Schwankungsbreite unterliegenden Sekretion von Zytokinen birgt Schwierigkeiten vor allem hinsichtlich der Maßstäblichkeit. Eine Normalverteilung, erst recht bei geringen Stichprobenumfängen, ist nicht anzunehmen. Deshalb wurden nicht-parametrische Tests zur statistischen Analyse eingesetzt.

Ätiologische Überlegungen

Die Superantigenhypothese

Superantigene können ohne Antigenpezifität direkt MHC-Moleküle und die V β -Einheit des T-Zell-Rezeptor binden und stimulatorisch auf T-Zellen wirken. Durch diese polyklonale T-Zellaktivierung werden grosse Mengen proinflammatorischer Mediatoren und Zytokine produziert. Bekannt sind Superantigene u.a. aus dem *Toxic-Shock-Syndrom*, bei welchem der Körper mit proinflammatorischen Zytokinen überschwemmt wird. Superantigene konnten mit Exazerbationen bei Patienten mit atopischer Dermatitis in Zusammenhang gebracht werden. Eine äquivalente Hypothese wird unter anderem von Bernstein (Bernstein, Ballow et al. 2003) und modifiziert auch von Bachert (Bachert, Gevaert et al. 2002) vertreten. Diese Hypothese geht von einer pathogenetischen Rolle von z.B. *Staphylococcus aureus*

Enterotoxin A und anderen bakteriellen Superantigenen aus. Denkbar seien deshalb Antibiotika (Makrolide und Tetracykline) als mögliche Kausaltherapeutika, deren antimikrobiellen und antiinflammatorischen Effekte sich summieren könnten.

Wird Polyposis nasi durch Pilze verursacht?

Angestoßen durch Beiträge von Jens Ponikau (Ponikau, Sherris et al. 1999) wird zunehmend die Rolle von Pilzen in der Ätiologie von Polyposis nasi diskutiert. Hierbei wird auf die klinisch bekannte allergische Pilzsinusitis (Safirstein) als Modellerkrankung verwiesen. Die allergische Pilzsinusitis ist klar von der invasiven Nasennebenhöhlenmykose bei immunsupprimierten Patienten abzugrenzen. Die topische Verabreichung von Amphotericin B zur Behandlung der Polyposis nasi befindet sich in der klinischen Erprobung. In ersten klinischen Studien konnte bei 47% der Patienten ein völliges Verschwinden der Polypen gezeigt werden (Ricchetti, Landis et al. 2002), allerdings hatten die Patienten vorher eine endonasale Nebenhöhlenchirurgie erhalten und waren zudem mit topischen Steroiden eingestellt. Eine offene prospektive Studie aus Ponikaus Arbeitsgruppe berichtete gar bei 75% der Patienten einen Rückgang der sinusitischen Symptome (Ponikau, Sherris et al. 2002). Die erste randomisiert-doppelblind konzeptionalisierte Pilotstudie aus derselben Arbeitsgruppe konnte einen Rückgang um ca. 9% der Schleimhautschwellung bei einem Drittel der Patienten zeigen (Ponikau, Sherris et al. 2005). Weiterhin ist der Tatsache Rechnung zu tragen, dass Amphotericin B nicht nur im Cholesterinstoffwechsel der Pilze interferiert, sondern auch als Membrandetergenz bei Säugetierzellen zur Messung zellulärer Potentiale in der Elektrophysiologie verwendet wird. Die Arbeitsgruppe von Lacroix (Jornot, Rochat et al. 2003) publizierte 2003 eine Studie mit Zellkulturen aus Muschel- und Polyposispräparaten, die die zytotoxische Wirkung von Amphotericin B direkt auf nasale Mukosa belegen konnte, wenngleich polypöse Schleimhaut wesentlich sensibler als Muschelgewebe reagierte. Andere membrandetergierende Substanzen, beispielsweise Capsaicin führen ebenfalls zu einem Rückgang von Polypen (Zheng, Wang et al. 2000). Zur Zeit sprechen demnach erst wenige Fakten für diese Hypothese und die Ergebnisse der grossen Therapiestudien stehen noch aus.

Eine instrumentelle Hypothese

Die Polyposis nasi ist eine entzündliche Erkrankung der Nasenschleimhaut im fortgeschrittenen Stadium, der verschiedene, zur Zeit nicht identifizierte Ursachen zu Grunde liegen und die mit einer Reaktion immunkompetenter Zellen sowie der Sekretion proinflammatorischer Zytokine einhergeht. Deswegen kommt es auch häufig zu einem Rückgang von nasalen Polypen unter der immunmodulierenden topischen Steroidtherapie. Die gemessenen Th1- und Th2-Zytokine müssen aber nicht zwingend Ausdruck einer allergischen (Spät-)reaktion sein. Die vorhandene Eosinophilie der Gewebe ist a priori ein Resultat einer erhöhten Produktion von IL-5. IL-5 ist für Eosinophile zum einen Differenzierungssignal im Knochenmark, Wegbereiter mittels Expression von Adhäsionsmolekülen (es macht Eosinophile *klebrig*) und zugleich antiapoptotisches Signal im Gewebe (Giembycz and Lindsay 1999). Entfällt IL-5, oder wird es gar antagonisiert (Leckie, ten Brinke et al. 2000), so reduziert sich die Zahl der Eosinophilen (die Produktion im Knochenmark wird reduziert, es sind weniger Eosinophile im Blut und auch im Gewebe nachweisbar) beträchtlich. Die bei Allergien auftretende Eosinophilie und die hierfür zugrundeliegende Sekretion von Th2-Zytokinen hat den gleichen Hintergrund wie bei anderen Erkrankungen, die mit einer Eosinophilie einhergehen, also beispielsweise einer Polyposis nasi. Die Th2-Zytokine, allen voran IL-5 sind maßgeblich für das Vorhandensein der Eosinophilen notwendig. Ferner werden weitere proinflammatorische Zytokine wie IL-12 und IFN- γ in vergleichbaren Mengen produziert und sezerniert und haben infolgedessen eine ebenfalls hohe pathogenetische Bedeutung. Daher ist es zunächst maßgeblich relevant, welche Zellen diese Zytokine sezernieren. Auf dieser Basis lassen sich zielgenauere und wirksamere Strategien zur Unterbrechung des zytokinabhängigen Entzündungsnetzwerks entwickeln.

Die Produktion von Zytokinen bei Polyposis nasi

Der ELISPOT zeigt bei Polyposis nasi eine erhöhte Produktion von Th1 und Th2- Zytokinen.

In Proben von Patienten mit Polyposis nasi finden sich signifikant mehr IL-4 (ca. 4-fach), IL-5 (ca. 10-fach), IL-12 (ca. 4-fach) und IFN- γ (ca. 4-fach) produzierende Zellen (Kapitel 3, Abbildungen 5-9). Für IL-8 konnte kein signifikanter Anstieg der

produzierenden Zellen gezeigt werden. Das entspricht in gleicher Weise einem Anstieg von Th1- und Th2-zytokinproduzierenden Zellen. Eine Polarisierung zugunsten des Th1- oder Th2- Typs liegt nicht vor.

Es stellen sich keine Unterschiede in der Zytokinproduktion bei Polyposispatienten mit allergischer Sensibilisierung oder Patienten mit Samters-Trias dar.

Der Befund erhöhter Th1- und Th2-zytokinproduzierender Zellen ist unabhängig von einer allergischen Sensibilisierung oder dem Vorliegen einer Aspirinintoleranz (Samters-Trias). Es lassen sich im Kollektiv der Polyposispatienten keine signifikanten Änderungen der zytokinproduzierenden Zellen im Vergleich von Allergikern und Nichtallergikern (Kapitel 3, Abbildungen 10-14) feststellen. Der phänomenologisch interessante, quasi syndromale Komplex der sog. Samters-Trias (resp. Syndrome de Vidal), der mit nasaler Polyposis, Asthma und einer Aspirinsensitivität einhergeht, zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den Zytokinmustern (Kapitel 3, Abbildungen 15-19). Allerdings ist die vorliegende Untergruppe zu klein, um eine abschließende Beurteilung zu erlauben.

Eine allergische Genese der Polyposis ist unwahrscheinlich.

Die lange Zeit diskutierte Hypothese einer allergischen Genese der Polyposis nasi (siehe auch Kapitel 1, Allergische Rhinosinusitis) erscheint epidemiologisch wenig plausibel, da für Polyposispatienten eine Allergieprävalenz von ca. 5 % im Vergleich zu ca. 15 % in der Normalbevölkerung angegeben wird (Settipane 1996). Ausgenommen wäre hier lediglich ein Konzept einer „lokal begrenzten“ Allergie.

Der Analogieschluss vom histologischen Befund der Eosinophilie zur Allergiehypothese in der Pathophysiologie der Polyposis nasi wird hier zudem durch die fehlende Polarität der Th1- und Th2-Zytokinproduktion weiter relativiert. Vor diesem Hintergrund ist die T-Zellspezifische Zytokinproduktion (s.u.) nochmals gesondert zu betrachten.

Das Th1/Th2-Modell wird beim Menschen nicht mehr strikt dichotomisch als vielmehr dual- wenn nicht gar pluralistisch gesehen. In erster Linie ist es ein didaktisch wertvolles Modell zur Erklärung vieler immunologisch vermittelter Entitäten (Mosmann T.R. 1996; Umetsu, Akbari et al. 2003). In der Spätphase allergischer Reaktionen lassen sich ebenfalls Th1-Zytokine messen.

Es gibt keinen Anhalt für einen protektiven Effekt durch Th1-Zytokine

Die in gleicher Weise erhöhten Th1-zytokinproduzierenden Zellen bei Polyposis nasi tragen zu einem entzündlichen Status quo bei, eine möglicher Weise gestörte Balance zwischen Th1- und Th2-Zytokinen oder ein protektiver Effekt der Th1-Zytokine wird in der neueren Literatur nicht mehr postuliert.

Das Th1/Th2-Konzept diente in der Allergologie in den 1990er Jahren u.a. der mechanistischen Erklärung der spezifischen Immuntherapie. Auf mRNA-Ebene wurden in der Haut von Atopikern, die sich einer spezifischen Immuntherapie unterzogen hatten, nach Allergenprovokation vermehrt IL-12 positive und IFN- γ positive Zellen gefunden (Hamid, Schotman et al. 1997). Hieraus schloss man im Zusammenhang mit einer Verminderung der Spätphasereaktion auf einen protektiven Effekt der Th1-Zytokine. Dieser Befund konnte im Hinblick auf die Spätphasereaktion – in diesem Falle in den Atemwegen- durch experimentelle Therapie mit rekombinantem IL-12 nicht bestätigt werden: die Gabe von IL-12 führte weder zu einer Symptombesserung noch zu einer Verkürzung der Spätphasereaktion, sondern zu deutlichen, systemischen Nebenwirkungen (Bryan, O'Connor et al. 2000). Im Hautmodell lassen sich die Befunde von Hamid, Schotman et. al. nur schwer in Einklang mit der Rolle von IFN- γ in der atopischen Dermatitis bringen (Akdis and Akdis 2003). Dort führt IFN- γ letztlich zur Apoptose der Keratinozyten und somit zum weiteren Fortschreiten der Erkrankung. Im Mausmodell führt das Zufügen von Th1-zytokinproduzierenden Zellen bei Mäusen mit Asthma zur Verstärkung der Entzündung (Hansen, Berry et al. 1999). Asthmatiker, die einen höheren Anteil an Th1-Zytokinen aufweisen, haben schlechtere klinische Scores als allergische Asthmatiker mit geringerem Th1-Anteil, auch ein protektiver Späteeffekt durch die Th1-Zytokine ist nicht nachweisbar (Umetsu 2004).

Die Zytokinproduktion durch T-Zellen bei Polyposis nasi

Das CD3-Antigen

CD3 ist ein Pan-T-Marker, der von allen T-Zellen, also CD4 und CD8 positiven T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen, T-Helfer, T-Gedächtniszellen, regulatorischen und zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird. Eine Depletion dieser sehr heterogenen, spezialisierten Zellpopulation betrifft daher die ganze Palette der zellulär vermittelten, spezifischen Abwehr. CD3 ist ein für die Signaltransduktion essentieller Anteil des T-Zell-

Rezeptors (=TCR). Der TCR ist ein aus α und β Untereinheiten bestehendes Heterodimer zur spezifischen Antigenerkennung. Der variable Anteil alleine ist jedoch nicht zur weiteren transmembranalen Signaltransduktion in der Lage, es sind insgesamt 4 Signal- (CD3)-Untereinheiten notwendig (bestehend aus γ, δ und ϵ Untereinheiten).

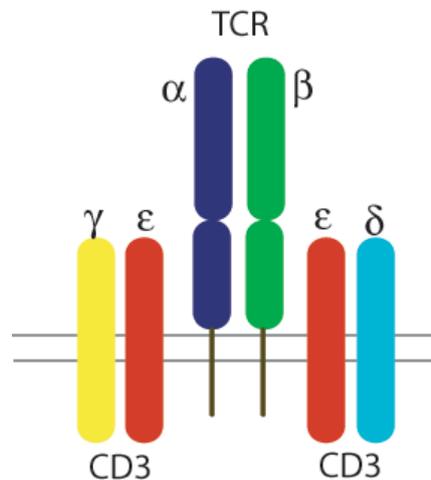


Abbildung 31: Der T-Zellrezeptor

CD3 ist nicht nur als Pan-T-Marker ein attraktives Zielantigen für eine Zellselektion. Die meisten Antikörper gegen CD3 wirken agonistisch gegen CD3, dieses ist vor allem im Hinblick auf die positive Zellselektion interessant, da ein antigenunabhängiger Stimulus auf die selektierten Zellen einwirkt. Aufgrund der Kürze der Inkubationszeit von 2h in diesem Versuchsprotokoll kann man zwar mit stimulierenden im Sinne von verstärkenden, jedoch von insgesamt wenig verfälschenden und nicht mitogenen Einflüssen ausgehen.

T-Zellen sind die Hauptakteure in der Moderation und Durchführung von Entzündungen.

T- Zellen sind eine wichtige Quelle von IL-5 und IFN- γ bei Polyposis nasi - aber nicht die Alleinige.

T-Zellen produzieren nach den hier vorliegenden Daten IL-5 bei Patienten mit Polyposis nasi. In der Polyposisgruppe zeigt sich ein signifikanter Rückgang der IL-5 produzierenden Zellen um ca. 25 % (im Mittel) nach Depletion der T-Zellen. In der Kontrollgruppe zeigte sich kein signifikanter Rückgang nach Depletion der T-Zellen. Die Betrachtung der positiv selektierten T-Zellen selbst, also die „Gegenprobe“ hingegen zeigt eine sehr deutliche und im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant

erhöhte, 9-fache Anzahl IL-5 produzierender T-Zellen (Abb.21 und Tab.24). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass T-Zellen eine wichtige Quelle für IL-5 bei Polyposis sind.

Auch wenn diese Ergebnisse eine weitere Quelle für IL-5 vermuten lassen, wird die pathophysiologisch wichtige Rolle der T-Lymphozyten bei der untersuchten Entität der Polyposis deutlich: funktionell ist die T-Zellaktivierung und damit verbundene IL-5 Sekretion mitverantwortlich für die Gewebeseosinophilie der Polyposis nasi.

Es wird auch in der Kontrollgruppe IL-5 produziert, aber praktisch kaum von T-Zellen und dazu wesentlich weniger. Anhand dieser Daten ist auch zu diskutieren, ob es eine „basale“ IL-5 Sekretion gibt, in geringem Maße auch bedingt durch T-Zellen. Dabei ist zu bedenken, dass die Nase zu jedem Zeitpunkt in ständiger immunologischer Interaktion mit der Außenwelt ist.

Diese Ergebnisse implizieren die Frage nach anderen zellulären Quellen für IL-5. Ein Blick in die Literatur zeigt unterschiedliche Zellpopulationen als mögliche IL-5 Quellen an: Bradding (Bradding, Feather et al. 1993) identifizierte bei allergischer Rhinitis mittels immunhistochemischer Untersuchungen überwiegend Mastzellen als Quelle von IL-4 und IL-5, während auf mRNA-Ebene mittels in-situ Hybridisation CD3-positive Zellen als Hauptquelle von IL-5 identifiziert wurden (Ying, Durham et al. 1993). Ähnliche Ergebnisse konnten Ying et al. auch in der Lunge erzielen (Ying, Durham et al. 1995). Die Arbeitsgruppe von Durham zeigte in den gleichen Studien aber auch Mastzellen und Eosinophile als Quelle von IL-5 an.

Der Vorteil der hier gewählten Methodik liegt darin, dass es sich beim ELISPOT um einen Vitalassay handelt, der zudem sehr nahe an in vivo Prozessen ist und de facto produziertes Zytokin auf Proteinebene detektiert.

Für IFN- γ läßt sich nach Depletion der CD3 positiven Zellen kein signifikanter Rückgang in dieser Stichprobe zeigen. Es zeigt sich jedoch in der Polyposisgruppe ein deutliches und im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhtes Signal für IFN- γ produzierende T-Zellen, in nur einem von fünf Fällen der Kontrollgruppe zeigt sich ein IFN- γ Signal CD3 positiver Zellen. Vorsichtig interpretiert kann formuliert werden, dass bei Polyposis nasi T-Zellen IFN- γ produzieren und zwar fast 10-fach mehr als in der Kontrollgruppe. Ein entsprechender Rückgang der IFN- γ Produktion

im Depletionsversuch ließ sich jedoch nicht zeigen (Abb.24 und Tab.27). Die Betrachtung der IFN- γ Produktion ist aber nicht nur quantitativ interessant: es konnte gezeigt werden, dass T-Zellen bei Polyposis nasi IFN- γ produzieren, aber praktisch nicht bei Patienten ohne polypöse Sinusitis. Inwiefern dieses IFN- γ nur zur Aufrechterhaltung der Entzündung dient und hierbei Faktor in einem Entzündungsnetzwerk mit IL-12 ist oder selbst - ähnlich wie in der Haut bei z.B. atopischer Dermatitis durch Apoptoseinduktion - maßgeblich zur Krankheitsentstehung beiträgt, ist noch unklar. Weitere zelluläre Quellen von IFN- γ können z.B. NK-Zellen sein.

In dieser Studie führte die Depletion von T-Zellen zu keiner signifikanten Reduktion der IL-4 produzierenden Zellen. Es zeigen sich aber sowohl bei Polyposispatienten als auch in der Kontrollgruppe IL-4 produzierende T-Zellen, dabei bestehen aber keine signifikanten Unterschiede in den beiden Untergruppen (Abb.20 und Tab.23)

Es ist bekannt, dass IL-4 in B-Zellen zum Isotypen-*Switch* und damit zur Produktion von IgE-Antikörpern führt. In Nasenpolypen lassen sich große Mengen IgE-Antikörper nachweisen. Da zwar die Gesamtzahl der IL-4 produzierenden Zellen in Nasenpolypen erhöht ist, nicht jedoch die Zahl der spezifisch IL-4 produzierenden T-Zellen, kann man dieses als Indiz für eine antigenunabhängige Stimulation der IgE-Synthese in Nasenpolypen werten. Die Ursachen für die erhöhte IgE-Produktion in der Polyposis nasi sind bisher nicht verstanden, möglicher Weise handelt es sich um ein Th2-induziertes Epiphänomen. Eine weitestgehend von T-Zellen und Antigenstimulation unabhängige IgE-Produktion hätte folglich auch Konsequenzen für ätiologische Überlegungen. Mögliche weitere Quellen für IL-4 sind u.a. Mastzellen und Basophile.

T-Zellen produzieren kein IL-8. Die Anzahl IL-8 produzierender Zellen in den Elispots ist nach Depletion CD3-positiver Zellen weder in der Polyposis- noch in der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Die raren IL-8 Spots in der Gruppe der CD3 positiven Zellen sind eher als Kontaminationen zu werten, zumal die zelluläre Schwelle zur IL-8 Produktion außerordentlich niedrig ist.

Die Depletion von T-Zellen führt zu einem signifikanten Rückgang der IL-12 produzierenden Zellen in der Kontrollgruppe um ca. 20 %. In der Polyposisgruppe zeigt sich ein Rückgang im Mittel von ca. 30 %, der jedoch keine statistische Signifikanz erreicht. In der Gegenprobe stellt sich aber eine IL-12 Produktion durch

T-Zellen in 4 von 5 Fällen dar. Diese ist signifikant höher als in der Muschelgruppe (nur 1 von 5 Fällen). Diese Ergebnisse sind nicht in sich konsistent. Es wird zwar signifikant weniger IL-12 nach Depletion von T-Zellen der Nasenschleimhaut in der Kontrollgruppe produziert, nicht aber in Polypengewebe. Dafür zeigt der ELISPOT, dass T-Zellen aus Polypengewebe IL-12 produzieren. Die hier erzielten Spotzahlen für IL-12 produzierende, positiv selektierte T-Zellen sind für Kontaminationen zu hoch. Eine IL-12 Produktion durch T-Zellen lässt sich anhand der hier vorliegenden Daten und vor dem Hintergrund der Literatur (Shu, Kiniwa et al. 1995; Ohkawara, Lim et al. 1996) nicht schlüssig konstatieren, ist aber weiter zu untersuchen. Hierbei sollte auch ein Augenmerk auf eine CD40-Ligand Koaktivierung erfolgen.

Die Zytokinproduktion durch Makrophagen bei Polyposis nasi

Depletion CD14 positiver Zellen

In dieser Studie wurden Monozyten und Makrophagen durch Bindung an das Oberflächenmolekül CD14 identifiziert. CD14 wird in wesentlich geringerem Maße auch von Neutrophilen, z.T. von dendritischen Zellen und auch von B-Zellen exprimiert. CD14 ist ein 55kDa schweres, membrangebundenes, verankertes Glykoprotein, welches der Rezeptor für den Komplex aus LPS (Lipopolysaccharid / Endotoxin) und LPB (LPS-binding Protein) ist (Kielian and Blecha 1995). CD14 ist, neben einigen Toll-like Rezeptoren (TLR4), der wesentliche Rezeptor für inkorporiertes oder durch gramnegative Bakterien freigesetztes LPS und spielt eine entscheidende Rolle in der unspezifischen Abwehr. Eine mögliche Rolle von CD14 und LPS in der Entstehung von Allergien ist zumindest in Augenschein zu nehmen, denn eine hohe LPS-Exposition scheint einen protektiven Effekt im Hinblick auf das Risiko einer allergischen Sensibilisierung haben (Yazdanbakhsh, Kreamsner et al. 2002). CD14 wird von den einzelnen Gewebemakrophagen in unterschiedlicher Höhe exprimiert, beispielsweise exprimieren Peritonealmakrophagen wesentlich mehr CD14 als Alveolarmakrophagen. IL-4 und IFN- γ führen zu einer Herabregulation von CD14 (Quentmeier, Kolsdorf et al. 1994).

Makrophagen sind als APC in mehrfacher Hinsicht interessant: Allergene/Antigene werden von Makrophagen phagozytiert, prozessiert und dann Gedächtnis- und Helfer sowie Effektorzellen (T-, und z.T. B-Zellen) präsentiert. Dabei produzieren sie

Zytokine und gehen direkte Zell-Zell-Kontakte ein (MHC, CD40, B7 und ICOS). Dieses ist eigentlich die Schlüsselstelle, ob beispielsweise ein aufgenommenes Antigen überhaupt zu einer Immunantwort führt und ob diese Th1- oder Th2 gewichtet sein wird. Eine antigenspezifische T-Zelle geht Zell-Zellkontakte mit Makrophagen oder dendritischen Zellen zunächst als Th0 Zelle ein und erhält dann ein Antigen präsentiert. Bekannter Weise führt die dann von Makrophagen durchgeführte synchrone Stimulation von Th0 Zellen mit IL-12 zu einer Th1-Polarisierung. Vor diesem Hintergrund ist natürlich interessant, welche Zytokine diese APC produzieren und ob es hierbei Unterschiede zwischen Makrophagen in gesunder Nasenschleimhaut oder bei Patienten mit nasaler Polyposis gibt, zumal man aufgrund oben beschriebener histologischer und funktioneller Befunde von einem immunologischen Geschehen ausgeht.

Die erhöhte Produktion von IL-12 bei Polyposis nasi ist nicht auf Makrophagen zurückzuführen.

IL-12 nimmt als Th1-Zytokin eine Sonderstellung ein, sowohl hinsichtlich seiner Proteinstruktur, als auch von seinen Aufgaben her. Es ist in gleicher Weise bedeutsam für die angeborene wie auch die adaptive Immunität und ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin antigenpräsentierender Zellen. Nach Depletion CD14-positiver Zellen zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl IL-12 produzierenden Zellen, weder in der Polyposis- noch in der Kontrollgruppe. Insgesamt ließen sich in dieser Studie nur in 4 von 9 Fällen IL-12 produzierende CD14-positive Zellen zeigen (Abb.28 und Tab.31). Dieses kann zweierlei bedeuten: die Selektion CD14-positiven Zellen funktioniert nicht oder CD14-positive Zellen sind nicht die Hauptquelle von IL-12, weder in der Kontrollgruppe noch bei Patienten mit Polyposis nasi. Die einzelnen Zellpopulationen wurden in dieser Studie immer einer Zellzählung zugeführt. Dadurch erfolgte eine Kontrolle, dass viabile CD14-positive Zellen selektiert wurden.

Die funktionelle Relevanz des IFN- γ - IL-12 Regelkreises

Vor dem Hintergrund der Literatur (Gately, Renzetti et al. 1998; Trinchieri 2003) ist das ein – zunächst - unerwartetes Ergebnis. Das durch Makrophagen und andere APC bei der Antigenpräsentation abgegebene IL-12 Signal an der Schnittstelle des

„Th1-shifts“, der Prägung einer Th0 Zelle ist ein fester Bestandteil unseres immunologischen Modells.

Die hier erhobenen Daten sind dazu aber kein Widerspruch. Die Verhältnisse einer floriden Entzündung sind ein völlig anderer Schauplatz: die Prägung der T-Zellen hat hier bereits stattgefunden, an dieser Stelle geht es vielmehr um die Unter- und Aufrechterhaltung eines chronisch-entzündlichen status quo. Zusammen mit dem histologischen Befund der charakteristischen Eosinophilie der Polyposis fügt sich dieses Ergebnis gut in die Literatur ein: so konnte die Arbeitsgruppe von Grewe et al. die Produktion von biologisch aktivem IL-12 durch Eosinophile nachweisen (Grewe, Czech et al. 1998). Ob nun Eosinophile oder antigenpräsentierende Zellen, v.a. dendritische Zellen letztlich die Quelle von IL-12 bei Patienten mit Polyposis nasi sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die Depletion CD14 positiver Zellen führt zu keinem signifikanten Rückgang der IFN- γ produzierenden Zellen. Eine IFN- γ Produktion CD14-positiver Zellen konnte erwartungsgemäß ebenfalls nicht dargestellt werden. Lediglich in 2 von 9 Fällen mit sehr geringen Spotzahlen kam es zu einer Signaldetektion, dieses ist am ehesten bedingt durch Kontaminationen.

Da IFN- γ und IL-12 durch positive Rückkopplung eine chronische Entzündung „hochschaukeln“ können, kommt diesen beiden Zytokinen und ihrer wechselseitigen Regulation eine besondere Bedeutung zu. IL-12 wirkt direkt verstärkend auf die IFN- γ Produktion ein. Die Quelle von IL-12 zu kennen, könnte bei zielgenauer Inhibition den gesamten Th1-Schenkel der Zytokinproduktion sehr wirksam unterbinden. Die Interdependenzen in diesem Mikromilieu zwischen Th1- und Th2-Zytokinen werden umso deutlicher, wenn man bedenkt, dass Eosinophile als mögliche Majorquelle für IL-12 durch ein Th2-Zytokin (IL-5) maßgeblich erhalten werden und damit möglicher Weise ein Bindeglied in einem Circulus vitiosus darstellen.

Die Depletion CD14-positiver Zellen führt zu keinem signifikanten Rückgang der IL-4 und IL-5 produzierenden Zellen, ein solcher Rückgang wurde vor dem Hintergrund der bekannten Literatur auch nicht erwartet. Umgekehrt ließen sich nur minimale, am ehesten durch Kontaminationen verursacht, Spotzahlen dieser Zytokine in den mit den CD14-positiven Zellen durchgeführten ELISPOT-Assays zeigen. Wie ebenfalls

erwartet wurde, gab es keine signifikanten Unterschiede von CD14- positiven Zellen aus Polypen oder Muscheln was die Produktion von Th2-Zytokinen betrifft.

Eine CD14 abhängige IL-8 Produktion

Die Produktion von IL-8 als einem Chemokin, von dem bekannt ist, dass es von Neutrophilen und z.T. auch von Makrophagen produziert wird, erscheint als zusätzlicher Marker für die Depletion interessant, da wie o.a. auch Neutrophile das CD14-Antigen exprimieren. Tatsächlich lässt sich ein signifikanter Rückgang von IL-8, jedoch nur in der Kontrollgruppe, und zwar um ca. 75 % nachweisen (Abb.27 und Tab.30), jedoch nicht in der Polypengruppe. Im Gegenzug zeigen die CD14-positiven Zellen ebenfalls ein eindeutig positives Signal in der Muschelgruppe, dass ca. 15-fach höher ist als in der Polyposisgruppe ($p=0.03$). Für IL-8 konnten in der Gesamtpopulation dieser Studie jedoch keine signifikant erhöhten Zellzahlen im ELISPOT bei Patienten mit Polyposis nasi im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass in der Kontrollgruppe CD14-positive Zellen IL-8 produzieren, bei Polyposispatienten nicht.

Es ist denkbar, dass in der Muschelgruppe ein Neutrophilensignal detektiert wurde und in der Polyposisgruppe, in der Eosinophile dominieren, nicht. Im Übrigen ist bekannt, dass viele andere Zellen, unter anderem auch Epithelien, IL-8 synthetisieren.

Polyposis nasi- kein Nachweis einer Th1- oder Th2-Polarität

T-Zellen produzieren Th1- und Th2-Zytokine bei Polyposis nasi

Wie bereits oben dargestellt, lässt sich eine gleichzeitige Produktion von Th1- und Th2-Zytokinen bei Polyposis nasi darstellen. Durch diese Studie konnte aber auch gezeigt werden, dass derselbe Zelltyp – die T-Zellen - für die Produktion scheinbar antagonistischer Zytokine verantwortlich ist, und zwar in denselben Proben. Es konnte gezeigt werden, dass nicht Makrophagen die Quelle für die Sekretion von Th1-Zytokinen sind, wenngleich dieses im Kontext der Literatur zunächst zu erwarten gewesen wäre. Auch dieser Befund widerspricht letztlich der Th1- / Th2- Hypothese

und negiert damit eine Dysbalance von Zytokinen in der Pathophysiologie der chronisch-polypöser Sinusitis.

Andere zytokinproduzierende Zellen bei Polyposis nasi

Wie bereits oben ausgeführt, ist es von Bedeutung, die Quellen der erhöhten IL-12 Produktion zu identifizieren. Weiterhin ist die Antigenpräsentation, vornehmlich die dendritische Zelle zu fokussieren. Die verschiedenen T-Zellsubtypen sind näher zu beleuchten, vor allem regulatorische T-Zellen, die IL-10 und TGF- β produzieren. Bereits zwei Arbeitsgruppen (Eisma, Allen et al. 1997; Hirschberg, Jokuti et al. 2003) haben auf eine mögliche pathogenetische Rolle von TGF- β hingewiesen. TGF- β vermittelt eine Abschwächung -im Englischen als *Silencing* bezeichnet- von immunologischen Prozessen und trägt somit zu immunologischer Toleranz bei. Weiterhin bewirkt es proliferative Effekte im Sinne von Wundheilung, es führt zu einem *Remodelling*. Es wird der Frage nachzugehen sein, welche Rolle hier regulatorische T-Zellen und Zellen der angeborenen Immunität, vor allem die histologisch vordergründigen Eosinophilen einnehmen.

5. Literaturverzeichnis

- Abdi, K. (2002). "IL-12: the role of p40 versus p75." Scand J Immunol **56**(1): 1-11.
- Akdis, C. A. and M. Akdis (2003). "Immunological differences between intrinsic and extrinsic types of atopic dermatitis." Clin Exp Allergy **33**(12): 1618-21.
- Bachert, C., P. Gevaert, et al. (2002). "Staphylococcus aureus enterotoxins: a key in airway disease?" Allergy **57**(6): 480-487.
- Bachert, C., K. Houmelmann, et al. (2003). "An update on the diagnosis and treatment of sinusitis and nasal polyposis." Allergy **58**(3): 176-191.
- Bachert, C., M. Wagenmann, et al. (1997). "IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue." J Allergy Clin Immunol **99**(6 Pt 1): 837-42.
- Badia, L. and V. Lund (2001). "Topical corticosteroids in nasal polyposis." Drugs **61**(5): 573-8.
- Bateman, N. D., C. Fahy, et al. (2003). "Nasal polyps: Still more questions than answers." Journal of Laryngology and Otology **117**(1): 1-9.
- Bernstein, J. M., M. Ballou, et al. (2003). "A superantigen hypothesis for the pathogenesis of chronic hyperplastic sinusitis with massive nasal polyposis." Am J Rhinol **17**(6): 321-6.
- Bousquet, J. v. C., P.; Bachert C. (2003). "Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA)." Allergy **58**(3): 192-7.
- Bradding, P., I. H. Feather, et al. (1993). "Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation." J Immunol **151**(7): 3853-65.
- Bryan, S. A., B. J. O'Connor, et al. (2000). "Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response." Lancet **356**(9248): 2149-53.
- Cervin, A. (2001). "The anti-inflammatory effect of erythromycin and its derivatives, with special reference to nasal polyposis and chronic sinusitis." Acta Oto-Laryngologica **121**(1): 83-92.
- Chen, Y., R. Dales, et al. (2003). "The epidemiology of chronic rhinosinusitis in Canadians." Laryngoscope **113**(7): 1199-205.
- Czerkinsky, C. C., L. A. Nilsson, et al. (1983). "A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells." J Immunol Methods **65**(1-2): 109-21.
- Eisma, R. J., J. S. Allen, et al. (1997). "Eosinophil expression of transforming growth factor-beta and its receptors in nasal polyposis: role of the cytokines in this disease process." Am J Otolaryngol **18**(6): 405-11.
- Farrar, M. A. and R. D. Schreiber (1993). "The Molecular Cell Biology of Interferon-Gamma and Its Receptor." Annual Review of Immunology **11**: 571-611.
- Flynn, M. D., P. Beasley, et al. (1992). "Adrenal suppression with intranasal betamethasone drops." J Laryngol Otol **106**(9): 827-8.
- Fokkens, W. J., A. F. Holm, et al. (1990). "Characterization and quantification of cellular infiltrates in nasal mucosa of patients with grass pollen allergy, non-allergic patients with nasal polyps and controls." Int Arch Allergy Appl Immunol **93**(1): 66-72.
- Fowler, P. D., A. G. Gazis, et al. (2002). "A randomized double-blind study to compare the effects of nasal fluticasone and betamethasone on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and bone turnover in patients with nasal polyposis." Clinical Otolaryngology **27**(6): 489-493.

- Gately, M. K., L. M. Renzetti, et al. (1998). "The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 495-521.
- Giembycz, M. A. and M. A. Lindsay (1999). "Pharmacology of the Eosinophil." Pharmacol Rev **51**(2): 213-340.
- Gosepath, J., D. Schafer, et al. (2002). "Aspirin sensitivity: Long term follow-up after up to 3 years of adaptive desensitization using a maintenance dose of 100 mg of aspirin a day." Laryngo-Rhino-Otologie **81**(10): 732-738.
- Grewe, M., W. Czech, et al. (1998). "Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses." J Immunol **161**(1): 415-20.
- Hadfield, P. J., J. M. Rowe-Jones, et al. (2000). "The prevalence of nasal polyps in adults with cystic fibrosis." Clin Otolaryngol **25**(1): 19-22.
- Hamid, Q. A., E. Schotman, et al. (1997). "Increases in IL-12 messenger RNA+ cells accompany inhibition of allergen-induced late skin responses after successful grass pollen immunotherapy." J Allergy Clin Immunol **99**(2): 254-60.
- Hansen, G., G. Berry, et al. (1999). "Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation." J Clin Invest **103**(2): 175-83.
- Hirschberg, A., A. Jokuti, et al. (2003). "The pathogenesis of nasal polyposis by immunoglobulin E and interleukin-5 is completed by transforming growth factor-beta 1." Laryngoscope **113**(1): 120-124.
- Holmberg, K. and G. Karlsson (1996). "Nasal polyps: medical or surgical management?" Clin Exp Allergy **26 Suppl 3**: 23-30.
- Ichimura, K., Y. Shimazaki, et al. (1996). "Effect of new macrolide roxithromycin upon nasal polyps associated with chronic sinusitis." Auris Nasus Larynx **23**: 48-56.
- Janeway, C. A. T., P.; Walport, M. (1999). "Immunobiology- The Immune System in Health and Disease." (4.th Edition).
- Johansson, L., A. Akerlund, et al. (2000). "Evaluation of methods for endoscopic staging of nasal polyposis." Acta Otolaryngol **120**(1): 72-6.
- Jornot, L., T. Rochat, et al. (2003). "Nasal polyps and middle turbinates epithelial cells sensitivity to amphotericin B." Rhinology **41**(4): 201-5.
- Kaliner, M. A., J. D. Osguthorpe, et al. (1997). "Sinusitis: bench to bedside. Current findings, future directions." J Allergy Clin Immunol **99**(6 Pt 3): S829-48.
- Kielian, T. L. and F. Blecha (1995). "CD14 and other recognition molecules for lipopolysaccharide: a review." Immunopharmacology **29**(3): 187-205.
- Kikuchi, T., K. Hagiwara, et al. (2002). "Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF-kappa B transcription factors." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **49**(5): 745-755.
- Lacroix, J. S., C. G. Zheng, et al. (2002). "Histological comparison of nasal polyposis in black African, Chinese and Caucasian patients." Rhinology **40**(3): 118-121.
- Landis, B. N., R. Giger, et al. (2003). "Retronasal olfactory function in nasal polyposis." Laryngoscope **113**(11): 1993-7.
- Larsen, K. (1996). "The clinical relationship of nasal polyps to asthma." Allergy Asthma Proc **17**(5): 243-9.
- Larsen, P. L. and M. Tos (2004). "Origin of nasal polyps: an endoscopic autopsy study." Laryngoscope **114**(4): 710-9.
- Leckie, M. J., A. ten Brinke, et al. (2000). "Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response." Lancet **356**(9248): 2144-8.

- Lildholdt, T., J. Fogstrup, et al. (1988). "Surgical versus medical treatment of nasal polyps." Acta Otolaryngol **105**(1-2): 140-3.
- Lildholdt, T., H. Rundcrantz, et al. (1997). "Glucocorticoid treatment for nasal polyps. The use of topical budesonide powder, intramuscular betamethasone, and surgical treatment." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **123**(6): 595-600.
- Linder, A., A. Karlsson-Parra, et al. (1993). "Immunocompetent cells in human nasal polyps and normal mucosa." Rhinology **31**(3): 125-9.
- Lund, V. J. and D. W. Kennedy (1997). "Staging for rhinosinusitis." Otolaryngol Head Neck Surg **117**(3 Pt 2): S35-40.
- Malm, L. (1997). "Assessment and staging of nasal polyposis." Acta Otolaryngologica **117**(4): 465-467.
- Merimsky, O. G., E.; Weitzen, R.; Inbar, M. (2004). "Targeting pulmonary metastases of renal cell carcinoma by inhalation of Interleukin-2." Annals of Oncology **15**: 610-12.
- Meurer, M., M. Fartasch, et al. (2004). "Long-term efficacy and safety of pimecrolimus cream 1% in adults with moderate atopic dermatitis." Dermatology **208**(4): 365-72.
- Mosmann T.R., S. S. (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." Immunology Today **17**(3): 138-146.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.
- Mygind, N. (1999). "Advances in the medical treatment of nasal polyps." Allergy **54 Suppl 53**: 12-6.
- Nishioka, G. J., P. R. Cook, et al. (1994). "Immunotherapy in patients undergoing functional endoscopic sinus surgery." Otolaryngol Head Neck Surg **110**(4): 406-12.
- Ohkawara, Y., K. G. Lim, et al. (1996). "CD40 expression by human peripheral blood eosinophils." J Clin Invest **97**(7): 1761-6.
- Ponikau, J. U., D. A. Sherris, et al. (1999). "The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis." Mayo Clin Proc **74**(9): 877-84.
- Ponikau, J. U., D. A. Sherris, et al. (2002). "Intranasal antifungal treatment in 51 patients with chronic rhinosinusitis." J Allergy Clin Immunol **110**(6): 862-6.
- Ponikau, J. U., D. A. Sherris, et al. (2005). "Treatment of chronic rhinosinusitis with intranasal amphotericin B: a randomized, placebo-controlled, double-blind pilot trial." J Allergy Clin Immunol **115**(1): 125-31.
- Quentmeier, H., K. Kolsdorf, et al. (1994). "IL-4 inhibits the LPS-induced expression of CD14 and monocyte-specific esterase mRNA in MONO-MAC-6 cells." Leukemia **8**(9): 1551-6.
- Ragab, S. M., V. J. Lund, et al. (2004). "Evaluation of the medical and surgical treatment of chronic rhinosinusitis: a prospective, randomised, controlled trial." Laryngoscope **114**(5): 923-30.
- Ramanathan, M., M. Lantz, et al. (1994). "Characterization of the Oligodeoxynucleotide-Mediated Inhibition of Interferon-Gamma-Induced Major Histocompatibility Complex Class-I and Intercellular-Adhesion Molecule-1." Journal of Biological Chemistry **269**(40): 24564-24574.
- Ricchetti, A., B. N. Landis, et al. (2002). "Effect of anti-fungal nasal lavage with amphotericin B on nasal polyposis." Journal of Laryngology and Otology **116**(4): 261-263.
- Rowe-Jones, J. M., M. Shembekar, et al. (1997). "Polypoidal rhinosinusitis in cystic fibrosis: a clinical and histopathological study." Clin Otolaryngol **22**(2): 167-71.

- Rugina, M., E. Serrano, et al. (2002). "Epidemiological and clinical aspects of nasal polyposis in France; the ORLI group experience." Rhinology **40**(2): 75-79.
- Samter, M. and R. F. Beers, Jr. (1967). "Concerning the nature of intolerance to aspirin." J Allergy **40**(5): 281-93.
- Scadding, G. K. (2002). "Comparison of medical and surgical treatment of nasal polyposis." Curr Allergy Asthma Rep **2**(6): 494-9.
- Senior, B. A., D. W. Kennedy, et al. (1998). "Long-term results of functional endoscopic sinus surgery." Laryngoscope **108**(2): 151-7.
- Settipane, G. A. (1996). "Epidemiology of nasal polyps." Allergy Asthma Proc **17**(5): 231-6.
- Shu, U., M. Kiniwa, et al. (1995). "Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction." Eur J Immunol **25**(4): 1125-8.
- Stanley, P., L. MacWilliam, et al. (1984). "Efficacy of a saccharin test for screening to detect abnormal mucociliary clearance." Br J Dis Chest **78**(1): 62-5.
- Stevens, D. J. (1988). "Cushing's syndrome due to the abuse of betamethasone nasal drops." J Laryngol Otol **102**(3): 219-21.
- Stott David I. (2000). "Immunoblotting, Dot-Blotting and Elispot Assays: Methods and Applications." Journal of Immunoassay **21**(2 & 3): 273-296.
- Suzuki, H., A. Shimomura, et al. (1997). "Inhibitory effect of macrolides on interleukin-8 secretion from cultured human nasal epithelial cells." Laryngoscope **107**(12 Pt 1): 1661-6.
- Trinchieri, G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **3**(2): 133-46.
- Umetsu, D. T. (2004). "Flu strikes the hygiene hypothesis." Nat Med **10**(3): 232-4.
- Umetsu, D. T., O. Akbari, et al. (2003). "Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma." J Allergy Clin Immunol **112**(3): 480-7; quiz 488.
- von Mutius, E. (1996). "Epidemiology of asthma: ISAAC-International Study of Asthma and Allergies in Childhood." Pediatr Allergy Immunol **7**: 54-6.
- Wallwork, B., W. Coman, et al. (2002). "Clarithromycin and prednisolone inhibit cytokine production in chronic rhinosinusitis." Laryngoscope **112**(10): 1827-1830.
- Widal, F., P. Abrami, et al. (1987 / 1922). "First complete description of the aspirin idiosyncrasy-asthma-nasal polyposis syndrome (plus urticaria)--1922 (with a note on aspirin desensitization). By F. Widal, P. Abrami, J. Lermoyez." J Asthma **24**(5): 297-300.
- Yazdanbakhsh, M., P. G. Kremsner, et al. (2002). "Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis." Science **296**(5567): 490-4.
- Ying, S., S. R. Durham, et al. (1993). "T cells are the principal source of interleukin-5 mRNA in allergen-induced rhinitis." Am J Respir Cell Mol Biol **9**(4): 356-60.
- Ying, S., S. R. Durham, et al. (1995). "Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects." Am J Respir Cell Mol Biol **12**(5): 477-87.
- Zheng, C. Q., Z. M. Wang, et al. (2000). "Effect of intranasal treatment with capsaicin on the recurrence of polyps after polypectomy and ethmoidectomy." Acta Oto-Laryngologica **120**(1): 62-66.

6. Zusammenfassung

Polyposis nasi ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Nasennebenhöhlen- und Nasenschleimhaut mit einer Prävalenz von ca. 4%. Hauptsymptome sind nasale Obstruktion, Rhinorrhoe und Hyposmie. Bis zu 40% dieser Patienten haben ein intrinsisches Asthma, bei 10% besteht zudem eine Analgetikaintoleranz (Samters-Triade). Der Anteil der Allergiker ist im Vergleich zur Normalbevölkerung nicht erhöht, eine Allergie ist aber ein Risikofaktor für Rezidive. Diagnostisch sind ein HNO-Status inklusive Endoskopie, eine Computertomographie und eine Allergiediagnostik durchzuführen. Die Therapie der Wahl ist die funktionelle endoskopische Nasennebenhöhlenoperation. Medikamentös sind v. a. in der Nachsorge topische Steroide etabliert. Die Rezidivrate der Polyposis ist mit 20-40% weiterhin hoch. Typisches histologisches Merkmal ist die Infiltration durch Eosinophile, Mastzellen, T- und B-Lymphozyten und Makrophagen. Ein zytokininduziertes Mikromilieu ist für die Aufrechterhaltung des entzündlichen Status quo relevant. Mittels des ELISPOT-Assays lässt sich die Zytokinproduktion auf dem Niveau der einzelnen Zelle messen. In dieser Studie wurde während Routineoperationen gewonnenes Polypengewebe mit Nasenschleimhaut von Patienten ohne Sinusitis verglichen. Die Untersuchung der Zytokinproduktion in Polypengewebe konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Erhöhung der Th1- (IL-12 und IFN- γ) und der Th2- (IL-4 und IL-5) zytokinproduzierenden Zellen zeigen. Unterschiede im Zytokinprofil bei Patienten mit Polyposis nasi und gleichzeitig bestehender Allergie oder einer Samters-Triade stellten sich nicht dar. Durch Kombination des ELISPOT-Assays mit einer immunomagnetischen Zellselektion konnte gezeigt werden, dass die Produktion von IL-5 und IFN- γ durch T-Zellen in Polypengewebe im Vergleich zu Kontrollen um nahezu das 10-fache erhöht ist. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass T-Zellen nicht die einzige Quelle dieser Zytokine sind. Die Untersuchung der Zytokinproduktion durch Makrophagen zeigte, dass die deutlich erhöhte Anzahl IL-12 produzierender Zellen bei Polyposis allerdings nicht auf Makrophagen zurückzuführen ist. Die bisherigen Untersuchungen der Pathophysiologie erlauben keine Aussage über die Ätiologie der Polyposis: diskutiert werden vor allem die Superantigenhypothese und die Pilzhypothese. In dieser Arbeit wird ein instrumenteller Ansatz gewählt: das bisherige Fehlen eines pathogenetischen Hauptagens erfordert die Identifikation der zellulären Akteure für die wirksame Unterbrechung eines sich selbst verstärkenden zytokinabhängigen Entzündungsnetzwerks.

7. Anhang

Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich, Adam Chaker, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Ich habe die vorliegende Dissertation weder in der vorliegenden noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf im August 2005.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'A' followed by a horizontal line extending to the right.

Adam Chaker

Curriculum Vitae

Adam Chaker

geboren am 08.11.1976 in Bad Wildungen

Staatsangehörigkeit: deutsch



- **Wissenschaftlicher Mitarbeiter seit 10/2004** und zuvor Arzt im Praktikum in der Hals-Nasen-Ohrenklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf (Univ.-Prof. Dr. med. U. Ganzer).

[Berufserfahrungen]
seit August 2003

- **Abiturient** des Friedrich Spee Gymnasiums Geldern im Jahre 1996 und Preisträger des *Abitur-Buchpreises* des Fonds der chemischen Industrie

[Schullaufbahn]

- Studium der Humanmedizin an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

[Studium Medizin]
1997 – 2003

- **Ärztliche Vorprüfung**

1999

- **Praktisches Jahr:**

2002-2003

- Innere Medizin in der Abteilung für Herz- und Kreislauf-erkrankungen am Hôpital Cochin der Faculté Cochin-Port-Royal (Université René Descartes) in Paris.
- Chirurgie in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie an der Universitätsklinik (FNKV) der dritten medizinischen Fakultät der Karls Universität Prag, mit Rotationen in den Abteilungen für Traumatologie und Kardiochirurgie.
- HNO und Kopf-Hals-Chirurgie in der HNO-Klinik des Hôpital Universitaire et Cantonal Genève

- **Graduierung mit der Ärztlichen Prüfung**

2003

- Studentisches Mitglied des Senates der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
- Studentisches Mitglied des Fakultätsrates der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
- Stipendiat der Friedrich Naumann Stiftung

2000-2002

2000-2003

2001-2003

- Chaker, Gärtner-Akerboom, Helmig, Wagenmann: "The role of T-lymphocytes in the production of IL-5 and IFN- γ in nasal polyps" (75. Jahresversammlung der deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen und Ohrenheilkunde und Kopf- und Halschirurgie, Bad Reichenhall)
- Chaker, Gärtner-Akerboom, Helmig, Wagenmann: "Are CD14 positive macrophages the major source of IL-12 in nasal polyps?" (EAACI, Amsterdam)
- Chaker, Gärtner-Akerboom, Helmig, Wagenmann: "Th1-Zytokine bei Polyposis nasi" (14. Jahrestreffen der AGAI der deutschen HNO-Gesellschaft, Köln)
- Chaker, Gärtner-Akerboom, Helmig, Wagenmann: "Nasal-Polyps: T-Cell derived Cytokines out of balance?" (EAACI-Immunology Meeting, Davos)
- Chaker, Scheckenbach, Wagenmann, Bier: "Diagnostical and therapeutical Management of Cervicofacial Paraganglioma" (76. Jahresversammlung der deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen und Ohrenheilkunde und Kopf- und Halschirurgie, Erfurt)

[Kongressbeiträge]
2004

2005

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen der Hals-Nasen-Ohrenklinik für die kollegiale und kameradschaftliche Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt Frau Maria Gärtner-Akerboom und Frau Petra Helmig aus dem Forschungslabor.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. U. Ganzer danke ich für Forderung und Förderung sowie die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Frau Prof. Dr. med. A. Schuster aus der Pädiatrie danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. Martin Wagenmann danke ich für sein ausgeglichenes Maß an Freiheit und Richtung in der Betreuung und seine lehrreiche, konstruktive, motivierende, engagierte und fortwährende freundschaftliche Unterstützung.

A.C.

Die Zytokinproduktion von T-Lymphozyten und Makrophagen bei Polyposis nasi

Abstract

Polyposis nasi ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Nasennebenhöhlen- und Nasenschleimhaut mit einer Prävalenz von ca. 4%. Hauptsymptome sind nasale Obstruktion, Rhinorrhoe und Hyposmie. Bis zu 40% dieser Patienten haben ein intrinsisches Asthma, bei 10% besteht zudem eine Analgetikaintoleranz (Samters-Triade). Der Anteil der Allergiker ist im Vergleich zur Normalbevölkerung nicht erhöht, eine Allergie ist aber ein Risikofaktor für Rezidive. Diagnostisch sind ein HNO-Status inklusive Endoskopie, eine Computertomographie und eine Allergiediagnostik durchzuführen. Die Therapie der Wahl ist die funktionelle endoskopische Nasennebenhöhlenoperation. Medikamentös sind v. a. in der Nachsorge topische Steroide etabliert. Die Rezidivrate der Polyposis ist mit 20-40% weiterhin hoch. Typisches histologisches Merkmal ist die Infiltration durch Eosinophile, Mastzellen, T- und B-Lymphozyten und Makrophagen. Ein zytokininduziertes Mikromilieu ist für die Aufrechterhaltung des entzündlichen Status quo relevant. Mittels des ELISPOT-Assays lässt sich die Zytokinproduktion auf dem Niveau der einzelnen Zelle messen. In dieser Studie wurde während Routineoperationen gewonnenes Polypengewebe mit Nasenschleimhaut von Patienten ohne Sinusitis verglichen. Die Untersuchung der Zytokinproduktion in Polypengewebe konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Erhöhung der Th1- (IL-12 und IFN- γ) und der Th2- (IL-4 und IL-5) zytokinproduzierenden Zellen zeigen. Unterschiede im Zytokinprofil bei Patienten mit Polyposis nasi und gleichzeitig bestehender Allergie oder einer Samters-Triade stellten sich nicht dar. Durch Kombination des ELISPOT-Assays mit einer immunomagnetischen Zellselektion konnte gezeigt werden, dass die Produktion von IL-5 und IFN- γ durch T-Zellen in Polypengewebe im Vergleich zu Kontrollen um nahezu das 10-fache erhöht ist. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass T-Zellen nicht die einzige Quelle dieser Zytokine sind. Die Untersuchung der Zytokinproduktion durch Makrophagen zeigte, dass die deutlich erhöhte Anzahl IL-12 produzierender Zellen bei Polyposis allerdings nicht auf Makrophagen zurückzuführen ist. Die bisherigen Untersuchungen der Pathophysiologie erlauben keine Aussage über die Ätiologie der Polyposis: diskutiert werden vor allem die Superantigenhypothese und die Pilzhypothese. In dieser Arbeit wird ein instrumenteller Ansatz gewählt: das bisherige Fehlen eines pathogenetischen Hauptagens erfordert die Identifikation der zellulären Akteure für die wirksame Unterbrechung eines sich selbst verstärkenden zytokinabhängigen Entzündungsnetzwerks.



Priv.-Doz. Dr. med. Martin Wagenmann