

Aus der Hals-Nasen-Ohren-Klinik  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. h.c. J. Schipper

Die Freisetzung von IL-4, IL-13, IL-33, sST2 und  
Eotaxin 3 nach nasaler Allergenprovokation bei  
Probanden mit allergischer Rhinitis

Dissertation

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

vorgelegt von  
Igor Stenin

**2014**

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

gez.:

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

Erstgutachterin/Erstgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Martin Wagenmann

Zweitgutachterin/Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Julia Reifenberger

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Baumann, R; Rabaszowski, M; Stenin, I; u. a. **(2013)**: „Nasal levels of soluble IL-33R ST2 and IL-16 in allergic rhinitis: inverse correlation trends with disease severity.“. In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 43 (10), S. 1134–1143, DOI: 10.1111/cea.12148.

Baumann, Ralf; Rabaszowski, Matthaeus; Stenin, Igor; u. a. **(2013)**: „Comparison of the nasal release of IL-4, IL-10, IL-17, CCL13/MCP-4, and CCL26/eotaxin-3 in allergic rhinitis during season and after allergen challenge.“. In: *American journal of rhinology & allergy*. 27 (4), S. 266–272, DOI: 10.2500/ajra.2013.27.3913.

Baumann, Ralf; Rabaszowski, Matthaeus; Stenin, Igor; u. a. **(2012)**: „The release of IL-31 and IL-13 after nasal allergen challenge and their relation to nasal symptoms.“. In: *Clinical and translational allergy*. 2 (1), S. 13, DOI: 10.1186/2045-7022-2-13.

# Zusammenfassung

Das zeitliche Freisetzungsmuster von Zytokinen nach Allergenexposition ist wesentlich für das Verständnis der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis. Die pro-inflammatorischen Interleukine (IL) IL-4 und IL-13 nehmen eine zentrale Rolle in der allergischen Entzündungsreaktion ein. Erste Studien über IL-33 und dessen löslichen Rezeptor *soluble* ST2 (sST2) zeigen im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte Blutserumwerte und vermehrte Expression dieser Zytokine in der Nasenschleimhaut bei Patienten mit allergischer Rhinitis. Das Chemokin Eotaxin-3 ist im Zusammenhang mit allergischer Rhinitis kaum untersucht. Das Ziel dieser Studie war es das Freisetzungsmuster dieser Zytokine in das Nasensekret nach nasaler Allergenprovokation zu charakterisieren.

Initial konnten elf Probanden mit einer allergischen Rhinitis in die Studie eingeschlossen werden. Die Diagnose wurde anhand der Anamnese und einer Sensibilisierung gegen Frühblüher oder Gräser im *Prick*-Hauttest gestellt. Mit der Filterpapier-*Disc*-Methode wurden nasale Allergenprovokationen durchgeführt und das Nasensekret vor der Provokation sowie 10 Minuten, zwei, fünf und 24 Stunden nach der Provokation gesammelt. Dabei wurde zu jedem Zeitpunkt die klinische Reaktion mittels eines *Symptom-Scores* und der aktiven, anterioren Rhinomanometrie dokumentiert. Um mögliche systemische Effekte der Allergenprovokationen festzustellen, wurden Blutentnahmen vor der Provokation sowie fünf und 24 Stunden nach Provokation durchgeführt. Mittels *ELISAs* und *electrochemiluminescent-multiplex-immunoassays* wurden IL-4, IL-13, IL-33, Eotaxin-3 sowie sST2 im Nasensekret und Blutserum bei sechs Probanden gemessen.

Die Allergenprovokation löste die typischen klinischen Symptome Sekretion, Nasenatmungsbehinderung, Juckreiz und Niesen aus. IL-4 und IL-13 zeigten fünf Stunden nach Allergenprovokation signifikante Anstiege im Nasensekret. Für Eotaxin-3 konnte ein kontinuierlicher, signifikanter Anstieg von zwei über vier Stunden bis zu einem Maximum bei 24 Stunden im Nasensekret festgestellt werden. Der Anstieg der sST2 Menge im Nasensekret war zu jedem Messzeitpunkt signifikant und zeigte einen zweigipfeligen Verlauf. Insbesondere zehn Minuten und 24 Stunden nach Allergenprovokation kam es zu einer ausgeprägten Freisetzung von sST2. Die IL-33 Menge im Nasensekret zeigte keine signifikanten Änderungen. Im Blutserum konnten keine signifikanten Konzentrationsänderung bei allen Zytokinen gemessen werden.

Mit der *Disc*-Methode konnte erfolgreich die nasale Allergenprovokation durchgeführt und Nasensekret gesammelt werden. Es konnte die Freisetzung von IL-4 und IL-13 in der Spätphase bestätigt werden. Erstmals wurde eine Freisetzung von Eotaxin-3 und sST2 in der Früh- und Spätphase nach nasaler Allergenprovokation in das Nasensekret bei Probanden mit allergischer Rhinitis beschrieben. Es ist naheliegend, dass Eotaxin-3 und sST2 an der Modulation der allergischen Entzündungsreaktion der Nase beteiligt sind. Weitere Studien mit mehr Probanden, sensitiveren *assays* und funktionellen Untersuchungen könnten weitere Informationen über die Rolle dieser Zytokine bei der allergischen Rhinitis liefern.

# Abkürzungen

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>Abb</b>	Abbildung
<b>APC</b>	antigenpräsentierende Zelle
<b>BU</b>	Biologische <i>Units</i>
<b>BL</b>	<i>Baseline</i>
<b>Dil</b>	<i>Diluent</i>
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>
<b>DGAKI</b>	Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie
<b>ELISA</b>	<i>enzyme-linked immunosorbent assays</i>
<b>Fc</b>	<i>fragment crystallisable</i>
<b>FcER1</b>	<i>fragment crystallisable</i> Epsilon Rezeptor I
<b>h</b>	Stunde
<b>IgE</b>	Immunglobulin E
<b>IL</b>	Interleukin
<b>MHC-II</b>	<i>major histocompatibility complex</i> Klasse II
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>m</b>	Minute
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>NaCl</b>	Natrium Chlorid
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>pg</b>	Picogramm
<b>rho</b>	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient
<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i>
<b>SEM</b>	Standardabweichung des Mittelwertes
<b>slgE</b>	spezifisches Immunglobulin E
<b>tau</b>	Kendalls Tau
<b>Th-Zellen</b>	T-Helferzellen
<b>VCAM-1</b>	<i>vascular cellular adhesion molecule 1</i>
<b>VLA-4</b>	<i>very late antigen 4</i>

# Inhalt

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Definition und Epidemiologie der allergischen Rhinitis</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Diagnose der allergischen Rhinitis</b>	<b>3</b>
1.2.1 Anamnese und klinische Untersuchung	3
1.2.2 Hauttest	3
1.2.3 <i>In-vitro</i> -Diagnostik	4
1.2.4 Nasaler Provokationstest mit Allergenen	4
<b>1.3 Therapie der allergischen Rhinitis</b>	<b>7</b>
1.3.1 Allergenkarenz	7
1.3.2 Pharmakotherapie	7
1.3.3 Spezifische Immuntherapie	9
<b>1.4 Immunologische Grundlagen der allergischen Rhinitis</b>	<b>10</b>
1.4.1 Sensibilisierungsphase	10
1.4.2 Frühphase	11
1.4.3 Spätphase	12
<b>2 Ziele der Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>3 Materialien und Methoden</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Probandenauswahl</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Nasale Provokation</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Studienprotokoll</b>	<b>18</b>
3.3.1 Provokationstermin	18
3.3.2 Kontrolltermin	19
<b>3.4 Probenverarbeitung</b>	<b>19</b>
<b>3.5 Zytokinmessung</b>	<b>20</b>
3.5.1 ELISA	20
3.5.2 <i>Electrochemiluminescent-multiplex-immunoassay</i>	22
<b>3.6 Mengenermittlung und Statistik</b>	<b>24</b>

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>25</b>
<b>4.1 Kontrollprovokation</b>	<b>25</b>
<b>4.2 Allergenprovokation</b>	<b>25</b>
4.2.1 Klinische Symptome	25
4.2.2 Interleukin-4	28
4.2.3 Interleukin-13	29
4.2.4 Eotaxin-3	31
4.2.5 Interleukin-33	33
4.2.6 sST2	34
<b>4.3 Korrelationen</b>	<b>36</b>
<b>5 Diskussion</b>	<b>37</b>
<b>5.1 Studiendesign</b>	<b>37</b>
<b>5.2 Interleukin-4</b>	<b>39</b>
<b>5.3 Interleukin-13</b>	<b>41</b>
<b>5.4 Eotaxin-3</b>	<b>43</b>
<b>5.5 Interleukin-33 und sST2</b>	<b>44</b>
<b>6 Schlussfolgerungen</b>	<b>48</b>
<b>7 Literatur- und Quellenverzeichnis</b>	<b>50</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>57</b>
<b>8.1 Allergie Fragebogen</b>	<b>57</b>
<b>8.2 Prick-Testbogen</b>	<b>60</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Definition und Epidemiologie der allergischen Rhinitis

Die allergische Rhinitis ist eine durch Exposition von Allergenen induzierte, Immunglobulin E (IgE) vermittelte Entzündungsreaktion der Nase, die häufig mit Augensymptomen einhergeht und daher auch als allergische Rhinokonjunktivitis bezeichnet wird. Sie wird zusammen mit Asthma und der atopischen Dermatitis zu den Erkrankungen des atopischen Formenkreises gezählt. Die allergische Rhinitis wird durch die *World Health Organization* anhand der Dauer und der Schwere der Symptomatik eingeteilt (Tabelle 1). Weiterhin ist eine ältere, klinische Klassifikation in saisonale, perenniale und berufliche allergische Rhinitis gebräuchlich (Bousquet, 2008).

**Tabelle 1: Klassifikation der allergischen Rhinitis**

<b>Dauer der Symptomatik</b>	
<b>intermittierend</b>	<b>persistierend</b>
weniger als 4 Tage pro Woche oder weniger als 4 Wochen pro Jahr	mehr als 4 Tage pro Woche und mehr als 4 Tage pro Jahr
<b>Schwere der Symptomatik</b>	
<b>gering</b>	<b>mäßig bis schwer</b>
Lebensqualität ist nicht beeinträchtigt	Lebensqualität ist beeinträchtigt

Die *World Health Organization*-Klassifikation der allergischen Rhinitis erfolgt anhand der Dauer und der Schwere der Symptomatik (Bousquet, 2008).

Die allergische Rhinitis beginnt häufig schon im jungen Lebensalter und weist in Deutschland eine Lebenszeitprävalenz von über 20% auf (Bauchau, 2004). Hinzu kommt, dass die Prävalenz bei Erwachsenen und Kindern immer weiter ansteigt (Skoner, 2001). Als Risikofaktoren werden u.a. genetische Prädisposition, hoher sozioökonomischer Status, Exposition gegenüber Schadstoffen der Luft oder erhöhte IgE-Werte im Blutserum betrachtet (Greiner, 2011a). Weiterhin wird mit der „Hygiene-Hypothese“ die Ansicht vertreten, dass durch hygienische und

medizinische Fortschritte die natürliche Entwicklung des Immunsystems gestört und eine allergische Sensibilisierung begünstigt wird. Epidemiologische Studien zeigen, dass Kinder, die auf Bauernhöfen aufwachsen, ein deutlich vermindertes Risiko aufweisen an allergischer Rhinitis und Asthma zu erkranken. Insbesondere unbehandelte Kuhmilch und der Kontakt mit Nutztieren und dessen Futter scheinen protektiv zu sein. Auch die frühe Exposition gegenüber infektiösen Erregern, z.B. Hepatitis A Virus, Mykobakterien, *Toxoplasma gondii*, verringert das Risiko einer Sensibilisierung (Mutius, 2010; Mutius, Vercelli, 2010).

Die typische Symptomatik der allergischen Rhinitis umfasst Juckreiz, Niesen, Rhinorrhoe und nasale Obstruktion. Im Rahmen der *atopic march*- und der *united airway disease* - Hypothese sind mit Fortschreiten der Erkrankung auch die tieferen Atemwege zunehmend betroffen. In diesem Zusammenhang wird auch häufig von einem "Etagenwechsel" gesprochen (Bousquet, 2008). So tritt ein Asthma bronchiale bei 32% der Kinder und 16% der Erwachsenen mit allergischer Rhinitis auf (Lack, 2001; Wright, 1994). Umgekehrt leiden aber auch 80% der Asthmatiker an einer allergischen Rhinitis. Weitere häufig auftretende Komorbiditäten sind atopische Dermatitis, Pharyngitis, Konjunktivitis, Nahrungsmittelallergien und chronische Rhinosinusitis (Klimek, Pfaar, 2011).

Die allergische Rhinitis führt zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität mit Minderung der Schlafqualität, schulischer und beruflicher Leistungen sowie alltäglicher und sportlicher Aktivität. Alleine in den USA verursacht die Erkrankung einen Verlust von über 2 Millionen Schultagen und 3,5 Millionen Arbeitstagen jährlich (Nathan, 2007). Auch die Belastung des deutschen Gesundheitswesens und der Wirtschaft durch direkte und indirekte Kosten der allergische Rhinitis ist enorm: Die durchschnittlichen jährlichen Kosten betragen in Deutschland 1089€ pro Kind und 1543€ pro Erwachsenen (Bousquet, 2008).

## 1.2 Diagnose der allergischen Rhinitis

### 1.2.1 Anamnese und klinische Untersuchung

Die Anamnese nimmt eine zentrale Rolle in der Diagnostik der allergischen Rhinitis ein. Bei der Anamnese werden Allergenexposition, die spezifischen Symptome und Komorbiditäten gezielt abgefragt, sowie deren Dauer, Stärke und Auswirkungen auf die Lebensqualität des Patienten bestimmt. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf möglichen räumlichen oder zeitlichen Assoziationen der Beschwerden, da dies wichtige Hinweise auf die in Frage kommenden Allergene liefern kann. Diese Angaben dienen als unverzichtbarer Ausgangspunkt für die weitere Diagnostik und Therapie (Bousquet, 2008). Im Rahmen der klinischen Untersuchung kann bereits das äußere Erscheinungsbild mit Veränderungen von z.B. Haut und Augenschleimhäuten auf eine allergische Erkrankung hinweisen. Durch die *anteriore* Rhinoskopie sowie die flexible oder starre Nasenendoskopie können alle Nasenabschnitte adäquat eingesehen werden. Hier zeigen sich häufig eine ödematöse und livide Schwellung der Nasenmuscheln sowie klare, wässrige Rhinorrhoe. Diese Veränderungen sind allerdings nicht pathognomonisch. Zusätzlich lassen sich so wesentliche Differentialdiagnosen, wie z.B. Nasenpolypen oder anatomische Anomalien ausschließen (Bachert, 2006).

### 1.2.2 Hauttest

Der *Prick* (= *Einstich*) -Hauttest ist der diagnostische Standard für den Nachweis einer IgE-vermittelten Sensibilisierung. Dabei werden Allergene in die Dermis eingebracht, welche an spezifische IgE-Antikörper (sIgE) auf Mastzellen binden. Die Aktivierung der Mastzellen führt zu einer Freisetzung von präformierten und neu synthetisierten Mediatoren. Diese lösen die sogenannte Lewis Trias aus: Es kommt zunächst zu einer durch Vasodilatation vermittelten Rötung. Durch Steigerung der Kapillarpermeabilität bildet sich eine Quaddel aus. Der folgende Axonreflex führt zu einer Erweiterung der Rötung. Die Reaktion erreicht nach 15-20 Minuten ihr Maximum und bildet sich innerhalb von 1-2 Stunden wieder zurück. Bei der praktischen Durchführung wird mit einer Pipette jeweils ein Tropfen jeder Allergenlösung mit ausreichendem Abstand auf die Volarseite der Unterarme aufgetragen. Anschließend wird die Haut mit einer *Prick*-Testnadel mit

1 Millimeter (mm) Spitzenlänge durch den Tropfen angestoßen. Das Lösungsmittel ohne Allergene dient als Negativkontrolle und Histamin als Positivkontrolle. Nach 15 bis 20 Minuten wird der Durchmesser der Rötung und der Quaddel abgemessen. Ein Quaddeldurchmesser von > 3 mm gilt dabei als positive Reaktion (Ruëff, 2010).

### **1.2.3 *In-vitro*-Diagnostik**

Im Mittelpunkt der *In-vitro*-Allergiediagnostik steht die Bestimmung von IgE im Blutserum. Dabei kann sowohl das Gesamt-IgE als auch das sIgE, welches sich gegen ein bestimmtes Allergen richtet, gemessen werden. Der Nachweis des Gesamt-IgE gibt einen Hinweis auf eine allergische Prädisposition und dient als Vergleichswert zur Evaluierung des sIgE. Die Bestimmung von sIgE kann durchgeführt werden, wenn ein Hauttest aufgrund Nebenerkrankungen oder erhöhter Risiken kontraindiziert ist. Auch bei Diskrepanz zwischen Anamnese und den Ergebnissen des Hauttests kann die Bestimmung von sIgE indiziert sein. Erhöhte sIgE-Werte zeigen, ebenso wie der *Prick*-Hauttest, eine Sensibilisierung gegen ein spezifisches Allergen. Sie alleine sind aber noch nicht ausreichend, um eine allergische Erkrankung und deren klinische Relevanz zu diagnostizieren (Renz, 2010).

### **1.2.4 Nasaler Provokationstest mit Allergenen**

Eine mittels *Prick*-Hauttest oder *In-vitro*-Diagnostik nachgewiesene Sensibilisierung geht nicht immer mit klinischer Symptomatik einher. Bereits 1975 wurden IgE-Antikörper bei Patienten mit Symptomen der allergischen Rhinitis in der Nasenschleimhaut nachgewiesen (Huggins, Brostoff, 1975). Weitere Studien konnten bestätigen, dass bei negativem Haut- und Serumtest sIgE-Antikörper in der Nasenschleimhaut lokal produziert werden können (Rondón, 2012b). Diese lokalisierte nasale Reaktion mit lokaler Produktion von sIgE-Antikörpern bei fehlenden systemischen Zeichen einer Allergie wird als „lokale allergische Rhinitis“ bezeichnet. Sie kann bis zu 63% der Patienten mit Symptomen einer allergischen Rhinitis und negativem Haut- und Serumtest betreffen (Rondón, 2012a). Umgekehrt ist es auch möglich, dass trotz Nachweis von sIgE in der Haut oder im Serum die Patienten klinisch keine Symptome gegen dieses Allergen zeigen (Gergen, Turkeltaub, 1991; Nickelsen, 1986).

Ergibt sich aus der Anamnese und vorhergegangener Diagnostik kein einheitliches Ergebnis oder wird eine Sensibilisierung gegen mehrere Allergene festgestellt, kann durch einen nasalen Provokationstest die klinische Relevanz einer Sensibilisierung verifiziert werden. Insbesondere vor Einleitung einer spezifischen Therapie ist es wichtig, die Allergene mit der klinisch größten Relevanz zu identifizieren. Die nasale Allergenprovokation hat sich (zumindest in Deutschland) als ein Standardverfahren in der Diagnostik der allergischen Rhinitis etabliert. Dabei werden durch direkte und kontrollierte Applikation des Allergens in das „Erfolgsorgan“ die typischen Symptome der Erkrankung klinisch reproduziert. Die nasale Allergenprovokation sollte immer in reproduzierbarer und kontrollierter Weise durchgeführt werden, um Fehlinterpretationen zu vermeiden. Hierfür liegt ein Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinischen Immunologie (DGAKI) vor (Riechelmann, 2003).

Beim nasalen Provokationstest werden 50-100 Mikroliter ( $\mu\text{l}$ ) Testlösung eines Allergens direkt auf die Nasenschleimhaut als Spray appliziert. Zuvor muss eine unspezifische Reaktion durch alleinige Applikation des Lösungsmittels ausgeschlossen werden. Nach der Provokation wird die klinische Reaktion des Patienten dokumentiert. Dabei orientiert man sich an den Kardinalsymptomen der allergischen Rhinitis und erfasst, z. B. anhand einer visuellen Analogskala oder eines Punkte-Scores, die subjektive Stärke der Sekretion, Irritation und der Fernsymptome. Aus diesen Werten kann dann ein klinischer Symptom-Score gebildet werden (Tabelle 2). Das Ausmaß der Nasenatmungsbehinderung wird durch Bestimmung der nasalen Luftdurchgängigkeit (*Flow*) in der aktiven, *anterioren* Rhinomanometrie objektiviert. Dabei wird über ein Rhinomanometer das Atemluftvolumen pro Zeiteinheit über die Druckdifferenz zwischen Nasenrachenraum und Naseneingang für jede Nasenseite bestimmt (Probst, 2008). Aus dem Symptom-Score und dem *Flow*-Abfall wird das Ergebnis des Provokationstests gebildet. Abbildung 1 zeigt den von der DGAKI empfohlenen Ablauf eines nasalen Provokationstests (Riechelmann, 2003).

**Tabelle 2: Symptom-Score**

Sekretion	
kein Sekret	0 Punkte
wenig Sekret	1 Punkt
viel Sekret	2 Punkte
Irritation	
0-2x Niesen	0 Punkte
3-5x Niesen	1 Punkt
>5x Niesen	2 Punkte
Fernsymptome	
Keine Fernsymptome	0 Punkte
Tränenfluss und/ oder Gaumenjucken und/oder weitere Fernsymptome	1 Punkt
	2 Punkte

Von der DGAKI empfohlener Symptom-Score beim nasalen Provokationstest: Die Summe der jeweiligen Punkte in den drei Kategorien ergibt den Symptom-Score.

**Ablauf eines nasalen Provokationstests**

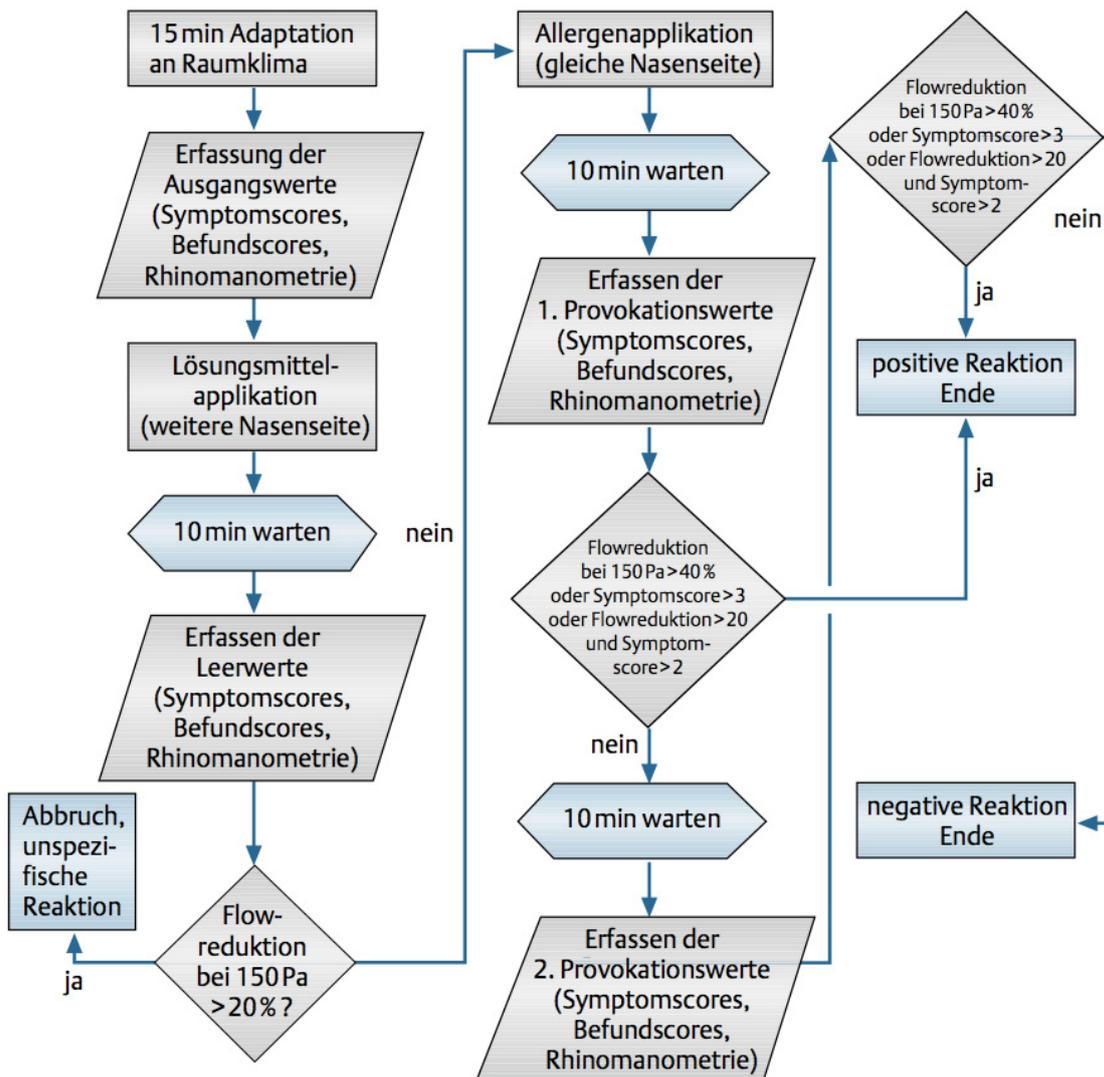


Abb. 1: Die Abbildung zeigt den von der DGAKI empfohlenen Ablauf des nasalen Provokationstest und die Bewertungskriterien (Riechelmann, 2003).

## 1.3 Therapie der allergischen Rhinitis

Grundsätzlich fußt die Behandlung der allergischen Rhinitis - wie bei den meisten anderen allergischen Erkrankungen auch - auf drei Säulen: Allergenkarenz, Pharmakotherapie und spezifische Immuntherapie.

### 1.3.1 Allergenkarenz

Die Allergenkarenz wird als erste therapeutische Maßnahme empfohlen. Ohne Allergenkontakt treten bei allergischen Erkrankungen, also auch der allergischen Rhinitis, grundsätzlich keine Symptome auf. Damit ist die Allergenkarenz zwar prinzipiell eine sinnvolle Therapie der allergischen Rhinitis, je nach Allergen gestaltet sich die Vermeidung der Exposition jedoch häufig problematisch. Während bei Haustierallergenen oder arbeitsplatzbedingter Exposition in einigen Fällen eine Allergenkarenz erreicht werden kann, ist dies bei Pollen- oder Hausstaubmilbenallergikern kaum möglich. Eine Reduzierung der Milbenlast kann hier durch den Einsatz von *Encasings*, Schwebstofffiltern oder Teppichentfernung versucht werden. Bei Gräser- oder Baumpollen ist die vollständige Vermeidung oder auch eine relevante Reduktion der Allergenmenge praktisch kaum durchzuführen. Hilfreich kann während der Allergensaison der Einsatz von Pollenfiltern im Auto, die Entfernung der Pollen durch Duschen vor dem Schlafengehen oder der Aufenthalt in geschlossenen Räumen sein (Bousquet, 2008).

### 1.3.2 Pharmakotherapie

Abhängig von der Schwere der Symptome und der Beeinträchtigung der Lebensqualität des Patienten stehen verschiedene systemische und topische Medikamente zur Verfügung. Bei allen Medikamenten handelt es sich jedoch nur um eine symptomatische Therapie.

Glukokortikoide stellen die effektivste Therapiemöglichkeit der allergischen Rhinitis dar. Sie können entweder intranasal oder systemisch appliziert werden. Die lokale Anwendung ermöglicht es, hohe Wirkspiegel in der Nasenschleimhaut bei zu vernachlässigenden systemischen Spiegeln zu erreichen. Glukokortikoide besitzen eine starke anti-inflammatorische Wirkung und führen u. a. zu einer

verminderten Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie z. B. Interleukin 4 (IL-4), IL-5, IL-13 und Histamin (Erin, 2005b; Hafez, 2004). Damit hemmen sie den Einstrom von antigenpräsentierenden Zellen (APCs), T-Zellen, Eosinophilen und reduzieren die allergische Entzündungsreaktion in der Nasenschleimhaut. Glukokortikoide entfalten ihre Wirkung frühestens zwei Stunden nach Anwendung und erreichen den Maximaleffekt erst nach regelmäßiger, mehrtägiger Gabe. Dabei vermögen sie alle Symptome der allergischen Rhinitis effektiv zu mindern. Die lokale Anwendung kann zu Nasenbluten, trockener Schleimhaut und Krustenbildung führen (Bachert, 2006; Bousquet, 2008). Orale Glukokortikoide sollen nur kurzfristig, bei fehlendem Ansprechen auf andere Medikation und bei besonders schweren Fällen der allergischen Rhinitis eingesetzt werden. Orale Glukokortikoide erreichen einen Wirkspiegel in der Nasenschleimhaut unabhängig von den anatomischen Gegebenheiten und nasaler Obstruktion. Der Nachteil einer systemischen Steroidgabe sind die bekannten Nebenwirkungen (z. B. Blutdruck- oder Blutzuckerentgleisungen). Für eine Behandlung mit intramuskulären Depotsteroiden gibt es nach heutiger Einschätzung keine Indikation mehr.

Eine weitere Wirkstoffgruppe, die zur Behandlung der allergischen Rhinitis indiziert ist, sind Antihistaminika. Sie blockieren überwiegend den Histamin-1 Rezeptor und unterdrücken somit die Histamin-induzierten Symptome Niesen, Juckreiz und Sekretion. Auch Antihistaminika stehen sowohl zur systemischen als auch topischen Anwendung zur Verfügung. Insgesamt sind sie in ihrer Wirkung den Glukokortikoiden unterlegen und eignen sich somit eher für leichte Formen der allergische Rhinitis (Bachert, 2006; Bousquet, 2008).

Chromone und Leukotrienantagonisten haben im Vergleich mit Glukokortikoiden und Antihistaminika eine geringere Wirkung und sind speziellen Indikationen (z.B. Schwangerschaft, Kinder, Kombinationstherapie) vorbehalten (Bachert, 2006; Bousquet, 2008).

Eine direkte Antagonisierung pro-inflammatorischer Mediatoren ist derzeit in klinischer Erprobung. Omalizumab beispielsweise ist ein rekombinanter, humaner, monoklonaler Antikörper, der freies IgE binden kann. Für Omalizumab konnte in klinischen Studien eine Verbesserung der klinischen Symptome und

Lebensqualität von Patienten mit allergischer Rhinitis gezeigt werden (Bousquet, 2006). Auch eine direkte Blockierung von Interleukinen, wie z. B. IL-4 und IL-13, wird untersucht (siehe Diskussion).

### **1.3.3 Spezifische Immuntherapie**

Den einzigen kausalen Therapieansatz stellt die spezifische Immuntherapie dar. Dabei unterscheidet man zwischen subkutaner und sublingualer Allergenapplikation. Zunächst wird während einer Steigerungsphase das Allergen innerhalb von Tagen bis Wochen in ansteigender Dosierung appliziert, bis eine Erhaltungsdosis erreicht ist. Diese wird dann in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von mindestens 3 Jahren verabreicht (Kleine-Tebbe, 2009). Aktuelle Hypothesen gehen von vier grundlegenden immunologischen Wirkmechanismen der spezifischen Immuntherapie aus (Akdis, 2014):

1. Verminderte Aktivierung und Degranulierung von Mastzellen und Basophilen
2. Induktion regulatorischer T- und B-Zellen
3. Zunahme von allergenspezifischem Immunglobulin G<sub>4</sub> und Abnahme von sIgE
4. Abnahme von Mastzellen und Eosinophilen im Gewebe

Zahlreiche Studien belegen die Wirksamkeit der spezifische Immuntherapie. So kommt es nicht nur zu einer Reduktion der Symptome und des Verbrauchs an Bedarfsmedikation, sondern auch zu einer Prävention von bronchialer Hyperreaktivität und von Asthma. Auch das Auftreten neuer Sensibilisierungen wird positiv beeinflusst (Compalati, 2009; Calderon, 2011). Diese positiven Effekte persistieren auch mehrere Jahre nach Abschluss der Therapie (Durham, 2010; Jacobsen, 2007). Qualitative Studien, die die subkutane mit der sublingualen Applikationsform direkt vergleichen existieren kaum. Der indirekte Vergleich zeigt ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede in der Wirksamkeit (Dretzke, 2013). Ein Vorteil der subkutanen Applikationsform ist die höhere *Compliance* der Patienten bei der Durchführung der Therapie (Kiel, 2013). Beide Therapieformen können lokale Nebenwirkungen wie Rötung, Schwellung und Juckreiz auslösen. Systemische Nebenwirkungen bis hin zum anaphylaktischen Schock können insbesondere bei der subkutanen Immuntherapie auftreten (Burks, 2013).

## 1.4 Immunologische Grundlagen der allergischen Rhinitis

Die Pathophysiologie der allergischen Rhinitis lässt sich in die Sensibilisierungsphase, die Frühphase und die Spätphase nach Allergenexposition einteilen.

### 1.4.1 Sensibilisierungsphase

Die Sensibilisierung ist der grundlegende, notwendige Schritt der allergischen Reaktion. Dabei kommt der Organismus das erstmalig mit einem Allergen in Kontakt. Allergene sind Antigene, die mit Immunzellen interagieren und die Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern induzieren können. Die Allergene werden von antigenpräsentierenden Zellen (APCs), z.B. Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen, aufgenommen und zu Peptiden gespalten. Diese Peptide werden dann über *major histocompatibility complex* Klasse II (MHC-II) Moleküle auf der Zelloberfläche *cluster of differentiation (CD) 4* positiven T-Helferzellen (CD4+ Th-Zellen) präsentiert. CD4+ Th-Zellen werden nach ihrem Zytokin-Freisetzungsmuster in Th1-Zellen (Interferon gamma, Tumornekrosefaktor alpha, IL-2), Th2-Zellen (IL-4, -5, -10, -13) und Th17-Zellen (IL-17, IL-21, IL-22) eingeteilt. Die Differenzierung nativer Th0-Zellen zu einem der Subtypen ist komplex und Gegenstand der Forschung. Sie hängt nach aktuellem Kenntnisstand jedoch vor allem von dem umgebenden Zytokinmilieu und der Interaktion mit weiteren Immunzellen ab (Klimek, Pfaar, 2011).

Im Mittelpunkt der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis steht die Th2-Immunantwort und die Synthese allergenspezifischer IgE-Moleküle: In einer ersten Interaktion binden Th2-Zellen mit dem T-Zell-Rezeptor und CD4 an den MHC-II Rezeptor/ Peptid Komplex auf APCs. Essentiell für eine Aktivierung der Zellen sind kostimulatorische Signale. Dazu gehört vor allem die Bindung zwischen CD28 der T-Zelle und dem B7 Protein der APC und das Zytokinmilieu, z.B. IL-1, IL-4. Fehlen die kostimulatorischen Signale, kommt es zur Anergie der Zellen und zu einer Toleranzentwicklung. Die aktivierten Th2-Zellen setzen Th2-Zytokine, insbesondere IL-4, IL-5 und IL-13 frei. Damit fördern sie die weitere Differenzierung und Aktivierung von Th2-Zellen. Interaktionen zwischen T- und B-Zellen, z.B. über den CD40 Liganden auf aktivierten T-Zellen und CD40 auf B-

Zellen, und Interleukine (insbesondere IL-4 und IL-13) induzieren einen Immunglobulin-Klassenwechsel von IgM zu allergenspezifischem IgE und die Differenzierung der B-Zelle zur Plasmazelle. Die IgE-Moleküle werden in den Blutkreislauf oder direkt in das Gewebe sezerniert und binden mit der *fragment crystallisable* (Fc)-Region an die alpha Untereinheit des hochaffinen Fc Epsilon Rezeptor I (FcER1) auf der Oberfläche von Mastzellen und Basophilen (Greiner, 2011b; Klimek, Pfaar, 2011).

#### **1.4.2 Frühphase**

Bei erneuter Allergenexposition wird das Allergen an der variablen Region der IgE-Moleküle auf der Oberfläche der Immunzellen gebunden. Die Kreuzvernetzung (*cross-linking*) von mindestens zwei dieser IgE-Moleküle durch das Allergen löst eine Aggregation der FcER1 alpha Untereinheit aus. Eine komplexe Signalkaskade über die beta und gamma Untereinheiten des Rezeptors sowie Guaninnucleotid-bindende Proteine wird in Gang gesetzt. Die Signaltransduktion führt zu einer Erhöhung zytoplasmatischer Kalziumspiegel durch Aktivierung von Kalziumkanälen des endoplasmatischen Retikulums und der Plasmamembran. Weiterhin werden Transkriptionsfaktoren über Guanosintriphosphatasen- und Kinasenkaskaden aktiviert (Turner, Kinet, 1999).

Die Aktivierung der Mastzellen und Basophilen führt zu einer Verschmelzung von Zellgranula mit der Zellmembran und zur Exozytose von präformierten Mediatoren wie Histamin, Heparin und Proteasen (z.B. Tryptase und Chymase). Hinzu kommt die Neusynthese und Freisetzung von Mediatoren aus dem Arachidonsäurestoffwechsel (z.B. Leukotrien C4, Prostaglandin D2 und Bradykinin). Auch Zytokine (z.B. IL-4, IL-13) und Chemokine können von Mastzellen und Basophilen freigesetzt werden (Stone, 2010; Theoharides, 2007). Die freigesetzten Mediatoren lösen durch direkte Stimulation von Endorganen und durch Reizung von Nerven die charakteristischen Symptome der allergischen Rhinitis aus. Füllung venöser Sinusoide, parasymphatische Stimulation von Drüsenzellen, Permeabilitätssteigerung von Blutgefäßen und Extravasation von Plasma werden induziert. Es folgt ein Ödem der Nasenschleimhaut, vermehrte nasale Sekretion und nasale Obstruktion. Die Reizung sensorischer Nervenfasern des *Nervus trigeminus* führt zu Juckreiz und zur Auslösung des Niesreflexes. Diese

Symptome der Frühphase werden unmittelbar nach Allergenexposition ausgelöst und halten bis zu zwei Stunden an (Klimek, Pfaar, 2011).

### **1.4.3 Spätphase**

Stunden nach Allergenexposition kommt es zu einer erneuten Zunahme der Symptome. Die bis zu 48 Stunden andauernde Spätphase ist charakterisiert durch den chemotaktisch vermittelten Einstrom und die Aktivierung von Basophilen, Neutrophilen, T-Zellen, Makrophagen und insbesondere Eosinophilen. Diese Vorgänge werden durch ein komplexes Zusammenspiel von Zytokinen, Chemokinen (z.B. Eotaxin, IL-8), Adhäsionsmolekülen (Selektine und Integrine) und deren Liganden induziert und gesteuert. Beispielsweise wird das *vascular cellular adhesion molecule 1* (VCAM-1) durch IL-4 auf Endothelzellen induziert. Basophile und Eosinophile können über *very late antigen 4* (VLA-4) an VCAM-1 binden und so gezielt in das Gewebe migrieren. Eotaxine binden an Chemokin-Rezeptoren auf Eosinophilen, Basophilen und Th2-Zellen und stimulieren die chemotaktische Migration dieser Zellen in die Mukosa. Die eingewanderten Immunzellen setzen weitere Zytokine, Chemokine, Sauerstoffradikale und pro-inflammatorische Proteine, z.B. *major basic protein*, Eosinophilenperoxidase, Kollagenase, Phosphatase und eosinophiles kationisches Protein, frei. Es kommt zu einem erneutem Auftreten der Symptomatik mehrere Stunden nach Allergenexposition. Insgesamt entspricht die Spätphase immunologisch einer chronischen Entzündungsreaktion mit Gewebsschädigung und Gewebsumbau (Elsner, 2004; Klimek, Pfaar, 2011).

Neurale Mechanismen spielen im Rahmen der allergischen Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle. Die direkte Reizung von sensorischen Nerven, Stimulation von Reflexbögen und des parasympathischen Nervensystems kann Juckreiz, Niesen, Füllung von Kapazitätsgefäßen und Stimulation von Drüsen und damit die gesamte Symptomatik der allergischen Rhinitis auslösen. Jedoch setzen auch die Nervenfasern nach Stimulation pro-inflammatorische Mediatoren, z.B. *calcitonin gene-related peptide* und Substanz P frei. Im Sinne einer neurogenen Entzündungsreaktion können so wiederum Mastzellen und andere Immunzellen aktiviert werden. Die nasale Hyperreaktivität, definiert als eine verstärkte, symptomatische Antwort auf unspezifische Reize (Tabakrauch, Stäube, Geruchsstoffe, Temperaturänderungen, Anstrengung), ist sicherlich teilweise

durch die neurogene Entzündungsreaktion bedingt (Bousquet, 2008; Greiner, 2011a; Togias, 2000). Interessanterweise scheinen auch die Epithelzellen selbst eine wichtige Rolle bei allergischen Erkrankungen der Atemwege zu spielen. So können Epithelzellen *thymic stromal lymphopoietin*, IL-25 und IL-33 produzieren und zu einer Verstärkung der Th2-Immunantwort führen (Broide, 2007).

Die allergische Rhinitis ist somit eine durch eine große Vielfalt an Zellen und Mediatoren komplex modulierte, den gesamten Organismus betreffende Entzündungsreaktion.

## 2 Ziele der Arbeit

Obwohl bereits große Fortschritte zur Aufklärung der Pathogenese und Pathophysiologie der allergischen Rhinitis geleistet wurden, sind noch viele Faktoren unzureichend geklärt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Bestimmung von Zytokinen im Nasensekret und im Blut von Probanden mit allergischer Rhinitis zu festgelegten Zeitpunkten (zehn Minuten, zwei, fünf und 24 Stunden) nach lokaler nasaler Allergenprovokation. Berücksichtigt wird somit sowohl die Früh- als auch die Spätphase der allergischen Reaktion. Insbesondere durch den Zeitpunkt 24 Stunden nach Allergenprovokation sollen späte Reaktionen und Zytokinanstiege nachgewiesen werden.

Neben den klassischen pro-inflammatorischen Zytokinen IL-4 und IL-13 sollen auch die in diesem Zusammenhang bisher nicht beschriebenen Zytokine IL-33, sST2 und Eotaxin-3 gemessen werden. Zwar gibt es bereits Daten, die zeigen, dass diese Zytokine im Rahmen der Entzündungsreaktion des allergischen Asthmas und der atopischen Dermatitis freigesetzt werden, jedoch fehlen solche Untersuchungen für die allergische Rhinitis. Zudem soll bestimmt werden, ob nach lokaler Allergenprovokation systemische Wirkungen auftreten und ob entsprechende Anstiege der Zytokinwerte im Blut gemessen werden können.

Diese Informationen sollen neue Einblicke in die Pathophysiologie der allergischen Reaktion in der menschlichen Nase ermöglichen: Der zeitliche Verlauf der Freisetzung unterschiedlicher Zytokine und deren Assoziation mit den klinischen Symptomen kann wesentlich zum Verständnis der allergischen Rhinitis beitragen. Weiterhin könnten sich daraus neue Therapiemöglichkeiten, z. B. durch spezifische Antagonisierung einzelner Zytokine, eröffnen.

## 3 Materialien und Methoden

In dieser Arbeit wurden experimentelle, nasale Allergenprovokationen an Probanden mit allergischer Rhinitis durchgeführt. Zur Quantifizierung der Beschwerden wurden Symptom-Scores erhoben und physiologische Änderungen wurden durch die *anteriore* Rhinomanometrie bestimmt. Während der Früh- und Spätphase der allergischen Reaktion wurde das Nasensekret gesammelt und Blutentnahmen durchgeführt. Anschließend wurde die Menge der Zytokine IL-4, IL-13, IL-33, sST2 und Eotaxin-3 im Nasensekret und deren Konzentration im Blut bestimmt.

### 3.1 Probandenauswahl

Initial wurden elf Probanden mit einer allergischen Rhinitis in die Studie eingeschlossen. Voraussetzung für die Aufnahme war eine Sensibilisierung gegen saisonale Allergene (z.B. Baum- oder Gräserpollen), nicht jedoch gegen perenniale Allergene (z.B. Hausstaubmilben). Um eine Stimulation durch natürliche Allergene auszuschließen, wurde die Studie außerhalb der Allergiesaison durchgeführt. Die Probanden nahmen sowohl mindestens vier Wochen vor Beginn als auch während der Studie keine Medikamente mit Einfluss auf die allergische Entzündungsreaktion ein und hatten in den letzten drei Jahren keine spezifische Immuntherapie erhalten. Weitere Ausschlusskriterien sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Eignung der Probanden wurde während eines *Screening*-Termins anhand eines Allergiefragebogens (s. Anhang) sowie eines *Prick*-Hauttests festgestellt. Zeigte sich im Hauttest eine Sensibilisierung gegen mehrere saisonale Allergene, so wurde das Allergen mit der stärksten Reaktion verwendet. Der *Prick*-Hauttest wurde mit kommerziell erhältlichen Allergenlösungen (Allergopharma, Reinbeck, Deutschland) durchgeführt (s. Anhang).

Nach nasaler Allergenprovokation mussten vier Probanden aus folgenden Gründen ausgeschlossen werden: Kontamination der *Disc* mit Blut (2), ausbleibende klinische Reaktion (1), exzessiver Alkoholkonsum innerhalb der 24-

stündigen Messzeit (1). Aufgrund der geringen Probenmenge und der Kostenintensität der Messverfahren wurden im Vorfeld die Proben eines Probanden zur Etablierung der Messmethoden verwendet. In den Proben dieses Probanden konnte daher nur IL-13 gemessen werden. Zwecks besserer Vergleichbarkeit und Korrelation werden die Ergebnisse im Folgenden einheitlich für die sechs Probanden dargestellt, bei denen alle Parameter ausgewertet werden konnten. Somit setzte sich das endgültige Probandenkollektiv aus vier weiblichen und zwei männlichen Probanden im Alter von 19 – 53 Jahren (Mittelwert: 28 Jahre, Median: 24,5 Jahre) mit einer Sensibilisierung gegen Gräser-Allergenmix (Allergopharma) zusammen. Vor Beginn der Studie wurden alle Probanden ausführlich über Ablauf sowie mögliche Risiken der Studie aufgeklärt und unterzeichneten eine Einverständniserklärung. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Studiennummer: 3530).

**Tabelle 3: Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme**

- Anamnestisch bekannte oder aktuelle psychische Erkrankung oder Störung
- Anamnestisch bekannte oder aktuelle Abhängigkeit oder Missbrauch von Alkohol, Nikotin oder Medikamenten
- Klinisch relevante Normabweichungen in Laborparametern (falls bekannt)
- Parasitenbefall
- Probanden, die an einer anderen klinischen Prüfung teilnehmen oder innerhalb der letzten 4 Wochen teilnahmen
- Systemerkrankungen wie Tuberkulose, Leukosen, Kollagenosen, Multiple Sklerose, Aids-Erkrankung, HIV-Infektion und andere Autoimmunerkrankungen
- Vorangegangene Organtransplantation
- Probanden mit teil- oder unkontrolliertem Asthma bronchiale
- Probanden mit früherem anaphylaktischen Schock
- Kinder und Jugendliche
- Schwangere und Stillende
- Operation an Nase oder Nasennebenhöhlen in den letzten drei Monaten
- Chronische Nasennebenhöhlenentzündung
- Erkältung oder sonstige Infektion in den letzten vier Wochen
- Anatomische Anomalien der Nase (z.B. ausgeprägte Nasenseptumperforation)

Die oben dargestellten Ausschlusskriterien waren für die Studienteilnahme zu beachten.

## 3.2 Nasale Provokation

Die nasale Allergenprovokation sowie das Sammeln des Nasensekrets wurden nach modifizierter Filterpapier-*Disc*-Methode durchgeführt (Wagenmann, 2005). Es wurden aus Filterpapier (Shandon Filter Cards; Shandon Inc., Pittsburgh, PA, USA) gestanzte *Discs* mit 10 Millimeter (mm) Durchmesser und 1,2 mm Dicke verwendet. Zur nasalen Allergenprovokation wurde eine Filterpapier-*Disc* mit 75 µl der Allergielösung (50.000 Biologische *Units*/ Milliliter (BU/ml), entspricht insgesamt 3.750 BU je *Disc*) getränkt, unter Sichtkontrolle auf die Schleimhaut des vorderen Nasenseptums aufgelegt und nach einer Minute entfernt (Abb. 2). Das Sammeln des Nasensekrets erfolgte durch Auflegen einer Filterpapier-*Disc* auf dieselbe Stelle der Nasenschleimhaut sowie auf die entsprechende Stelle der Gegenseite für jeweils 45 Sekunden. Anschließend wurde die *Disc* erneut gewogen, um die Menge des gesammelten Nasensekrets bestimmen zu können.

### Applikation der Filterpapier-*Disc*



Abb. 2: Applikation der Filterpapier-*Disc* auf die Schleimhaut der Nasenscheidewand: Der Naseneingang wird mit einem Nasenspekulum aufgespannt und die Filterpapier-*Disc* mit einem Hechtmaulzängelchen unter Sicht auf die Schleimhaut des vorderen Anteils der Nasenscheidewand aufgelegt.

### 3.3 Studienprotokoll

Der Studienablauf beinhaltete einen jeweils zweitägigen Provokations- und Kontrolltermin für jeden Probanden.

#### 3.3.1 Provokationstermin

Zu Beginn wurden anatomische Varianten oder Pathologien der Nase durch die *anteriore* Rhinoskopie ausgeschlossen. Es folgten fünf Nasenlavagen mit 0,9%iger Natrium-Chlorid-(NaCl)-Lösung (B. Braun Melsungen A.G., Melsungen, Deutschland), um eine Kontamination mit bereits auf der Nasenschleimhaut vorhandenen Proteinen/ Zytokinen zu vermeiden. Danach wurde durch Einlegen von Kollektions-*Discs* Nasensekret gesammelt, um den Basiswert der Zytokine im Nasensekret bestimmen zu können (Zeitpunkt: *Baseline, B1*). Zum Nachweis möglicher unspezifischer Reaktionen auf das Lösungsmittel in den Allergenlösungen wurde eine mit 75 µl Lösungsmittel getränkte Filterpapier-*Disc* einseitig appliziert und das Nasensekret im Abstand von zehn Minuten gesammelt (Zeitpunkt: *Diluent, Dil*). Anschließend folgten die nasale Allergenprovokation und die Kollektion von Nasensekret zu den Zeitpunkten zehn Minuten, zwei, fünf und 24 Stunden nach Allergenprovokation. Zu jedem Zeitpunkt wurden die klinische Reaktionen und die physiologischen Änderungen dokumentiert:

- Der Symptom-*Score* erfasste die subjektive Stärke der Nasenatmungsbehinderung, der Sekretion der Nase sowie des Juckreizes von Nase, Ohren, Rachen und Augen anhand einer visuellen Analogskala in Millimetern (0 - 100 mm). Zusätzlich wurde die Anzahl des Niesens im vorherigen Zeitabschnitt gezählt.
- Zur Objektivierung der Nasenatmungsbehinderung wurde eine *anteriore* aktive Rhinomanometrie (Rhinomanometer A 310, Atmos, Medizin Technik GmbH & Co. KG, Lenzkirch, Deutschland) durchgeführt.
- Um mögliche systemische Wirkungen der Allergenprovokation feststellen zu können, wurden vor Allergenprovokation sowie fünf und 24 Stunden nach Allergenprovokation Blutentnahmen in Blutserum-Röhrchen (Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

- Durch Wiegen der Kollektions-*Disc* vor und nach Applikation konnte die Menge des Nasensekrets festgestellt werden.

Eine Übersicht des Ablaufs wird in Abbildung 3 dargestellt.

### 3.3.2 Kontrolltermin

Der Kontrolltermin wurde mindestens drei Tage vor oder zwei Wochen nach dem Provokationstermin durchgeführt, um nach Provokation anhaltende erhöhte Basiswerte der Zytokine auszuschließen. Die Allergenprovokation wurde an diesen Terminen durch die alleinige Applikation des Lösungsmittels ersetzt. Das weitere Protokoll entsprach dem Provokationstermin.

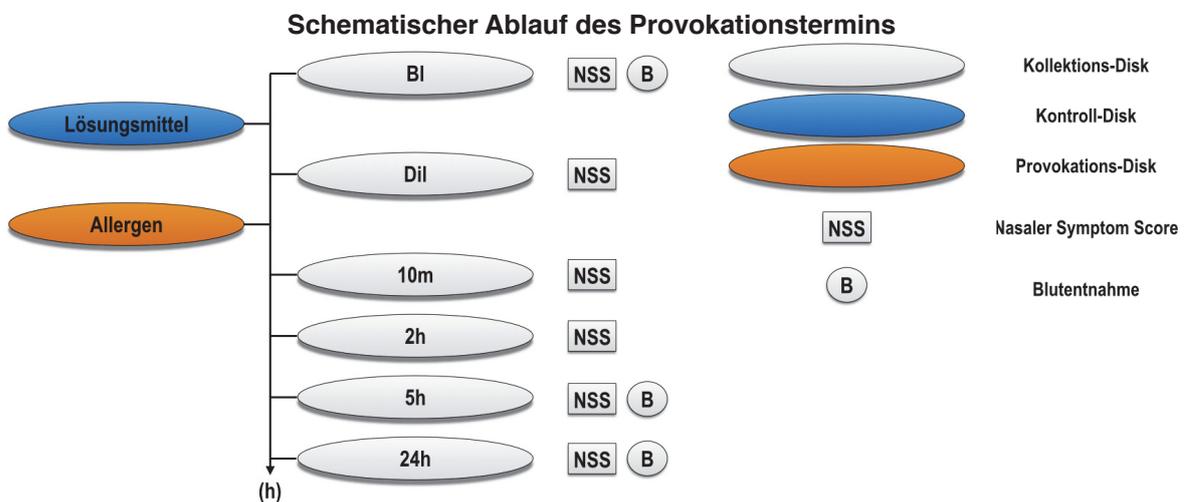


Abb. 3: Zeitlicher Ablauf der nasalen Provokation. Während des Kontrolltermins wurde die Provokations-*Disc* durch eine weitere, mit dem Lösungsmittel getränkte Kontroll-*Disc* ersetzt (h=Stunden).

## 3.4 Probenverarbeitung

Die Kollektions-*Disc* wurde bei 4°C (Grad Celsius) und unter schwachem Schütteln in 500 µl NaCl in einem 2 ml Röhrchen (Cryo SS, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) eluiert. Nach zwei bis vier Stunden wurde die *Disc* entfernt und das Eluat fünf Minuten bei 2800 rpm (*revolutions per minute*) zentrifugiert, um Zellen und Mukus zu entfernen. Der Überstand wurde in acht 0,5 ml Röhrchen (LoBind; Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland) aliquotiert (5x30 µl und 3x60 µl) und bei -80°C gelagert.

Die Blutröhrchen wurden nach Blutentnahme zwischen 45 und 90 Minuten aufrecht gelagert, um die Gerinnung des Blutes zu ermöglichen. Anschliessend wurden die Röhrchen fünf Minuten bei 2800 rpm zentrifugiert, um Serum und korpuskuläre Blutbestandteile zu trennen. Das Serum wurde ebenfalls in 0,5 ml Röhrchen (8x60 µl) aliquotiert und bei -80° C gelagert.

## 3.5 Zytokinmessung

Die Zytokine im Nasensekret und Blutserum wurden mittels *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA; sST2, IL-33) sowie *electrochemiluminescence-multiplex-immunoassays* (IL-4, IL-13, Eotaxin-3) gemessen. In den Vormessungen hatte sich gezeigt, dass keine relevanten Änderung auf der kontralateralen Nasenseite zu messen sind, weshalb im Weiteren nur das Nasensekret der provozierten, ipsilateralen Seite verwendet wurde.

### 3.5.1 ELISA

Bei dem ELISA nach dem Sandwich-Prinzip werden mit *capture*-Antikörpern beschichtete 96-*well* Mikrotiterplatten verwendet (Abb. 4). Zunächst werden die Proben in die *wells* pipettiert und der *capture*-Antikörper bindet spezifisch das zu untersuchende Protein in der Probe. Durch mehrfaches Waschen der Platte werden ungebundene Substanzen von der Platte entfernt und dann der *detection*-Antikörper hinzugefügt. Dieser bindet spezifisch an das bereits vom *capture*-Antikörper gebundene zu untersuchende Protein. In einem erneuten Waschschrift werden freie Antikörper entfernt. Als nächstes wird das Reporterenzym (falls nicht bereits fest an dem *detection*-Antikörper gebunden) hinzugegeben und bindet während einer weiteren Inkubationszeit an den *capture*-Antikörper. Nach erneutem Waschen wird ein Farbstoffsubstrat hinzugesetzt. Dieses wird durch das Reporterenzym zu einem Produkt umgesetzt und es findet ein Farbumschlag statt. Die Menge des umgesetzten Substrates sowie Stärke des Farbumschlages hängt von der Menge des Enzyms im *well* und somit von der Menge des zu untersuchenden Proteins ab. Die Reaktion wird durch Zugabe einer *stop-solution* nach einer definierten Zeit beendet. Aus dem Farbumschlag kann nun durch optische Extinktion sowie durch Kalibrierung mit

einer Standardreihe von bekannten Proteinkonzentrationen, die Konzentrationsmenge des Proteins in jedem *well* berechnet werden.

sST2 wurde mit einem ultrasensitiven, vorbeschichteten *Kit* (Quantikine® ELISA ST2 Human ST2/IL-1 R4 *Immunoassay*, R&D Systems Europe, Abingdon, UK) nach Herstellerprotokoll gemessen (Abb. 5). IL-33 wurde ebenfalls mit einem ultrasensitiven, vorbeschichteten *Kit* (LEGEND MAX Human IL- 33 ELISA Kit, BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA) nach Herstellerprotokoll gemessen (Abb. 6). Die Sensitivität der *assays* lag bei  $\leq 5.9$  pg/ml für sST2 und  $\leq 6.1$  pg/ml für IL-33. Die ELISA-Platten wurden maximal 30 Minuten nach Zugabe der *stop-solution* auf einem ELISA-Reader (DTX 880 Multimode Detector, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Germany) ausgelesen. Die Proben wurden jeweils im Duplikat vermessen. Bei einem Variationskoeffizienten von  $> 20\%$  wurde die Messung für diese Probe wiederholt.

#### ELISA Methode

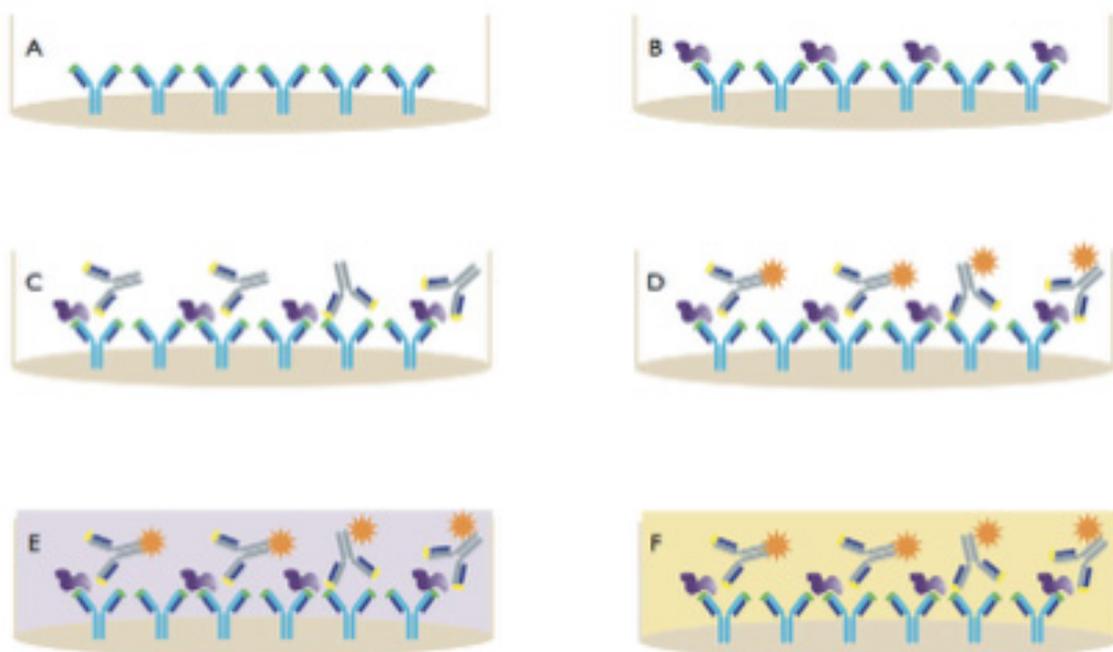


Abb. 4: Schematischer Versuchsablauf eines ELISA: A: Platte mit *capture*-Antikörpern; B: Bindung der Proteine durch die *capture*-Antikörper; C: Bindung der *detection*-Antikörper an das Protein; D: Bindung des Reportenzyms; E: Zugabe des Farbstoffsubstrats und Farbumschlag; F: Beenden der Reaktion durch Hinzufügen der *stop-solution* (Quantikine® ELISA ST2 Human ST2/IL-1 R4 *Immunoassay*, R&D Systems Europe, Abingdon, UK, Benutzerhandbuch).

### ST2 ELISA Versuchsprotokoll

50 µl *assay diluent* RD1-63/ *well*; 50 µl Probe oder Standard/ *well*

(2h)

4x Waschen (je 300 µl Waschpuffer/ *well*); 100 µl ST2 *conjugate*/ *well*

(2h)

4x Waschen; 100 µl *substrate-solution*/ *well*

(30m)

100 µl *stop-solution*/ *well*

Abb. 5: ST2 ELISA Versuchsprotokoll (Quantikine® ELISA ST2 Human ST2/IL-1 R4 Immunoassay, R&D Systems Europe, Abingdon, UK, Benutzerhandbuch).

### IL-33 ELISA Versuchsprotokol

4x Waschen; 50 µl *assay buffer* B/ *well*; 50 µl Probe oder Standard/ *well*

(16h)

4x Waschen; 100 µl *detection*-Antikörper

(1h)

4x Waschen; 100 µl Avidin-HRP B Lösung/ *well*

(30m)

5x Waschen; 100 µl *substrate-solution* F/ *well*

(15m)

100 µl *stop-solution*/ *well*

Abb. 6: IL-33 ELISA Versuchsprotokoll (LEGEND MAX, Human IL- 33 ELISA Kit, BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA, Benutzerhandbuch)

### 3.5.2 Electrochemiluminescence-multiplex-immunoassays

Die IL-4, IL-13 und Eotaxin-3 Werte wurden mit ultrasensitiven vorbeschichteten *electrochemiluminescence-multiplex-immunoassays* (MesoScale Discovery, Gaithersburg, MD, USA) gemessen (Abb. 7). Diese Methode ermöglicht die Messung mehrerer Zytokine in einem einzigen *well*. Dazu ist jedes *well* in unterschiedlichen *Spots* mit spezifischen Antikörpern gegen unterschiedliche Zytokine vorbeschichtet. Bei Zugabe der Probe binden die spezifischen Antikörper die Zytokine im jeweiligen *Spot*. Nach Auswaschen der ungebundenen Substanzen werden spezifische *detection*-Antikörper hinzugegeben und binden

an die Zytokine. Die *detection*-Antikörper sind mit SULFO-TAG, einer elektrochemilumineszenten Verbindung, bestückt. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung kommt es zu einer Lichtemission, die abhängig von der Menge des jeweiligen Zytokins ist. Somit kann durch Messen der Lichtemission die Zytokinmenge in der Probe bestimmt werden. Das genaue Versuchsprotokoll ist in Abbildung 8 dargestellt.

### **Electrochemiluminescence-multiplex-immunoassay Methode**

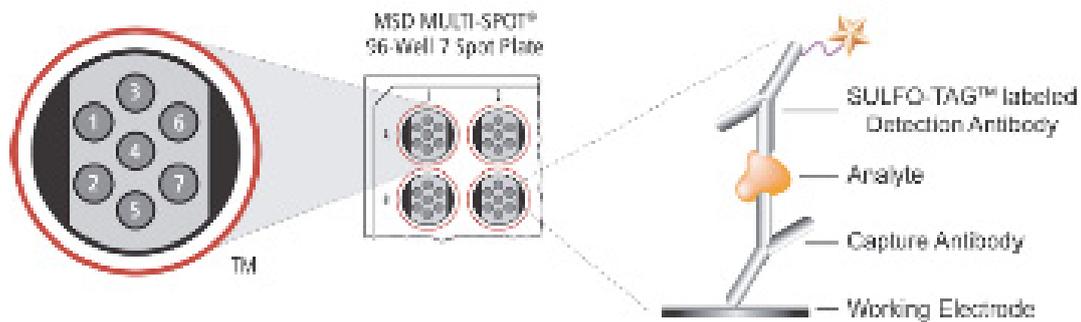


Abb. 7: 96-*well*-Platte mit sieben *Spots* pro *well*. In jedem der sieben *Spots* kann ein anderes Zytokin gemessen werden. Im rechten Teil der Abbildung ist das *Sandwich*-Prinzip des *assays* dargestellt: Der *capture*-Antikörper bindet das gesuchte Protein. Auch der *detection*-Antikörper mit MSD SULFO-TAG lagert sich an das Protein an. Durch Anlegen einer Spannung über die Elektrode kommt es zu einer Lichtemission (Mesoscale Discovery, Gaithersburg, MD, USA, *User Manual*).

### **Electrochemiluminescent-Multiplex-Immunoassay Versuchsprotokoll**

<p>Blocken der Platte mit 25 µl Diluent 2 (MSD)</p> <p>(30m)</p> <p>25 µl Standart oder Probe pro Well</p> <p>(2h)</p> <p>3x Waschen; 25µl Antikörper mit Sulfo-Tag (MSD) pro Well</p> <p>(2h)</p> <p>4x Waschen; 150 µl 2x Lesepuffer (MSD) pro Well</p> <p>Auslesen der Platte mit Sector Imager 6000 (MSD)</p> <p>Analyse der Rohdaten mit der Software Discovery Workbench 3.0 (MSD)</p>
--

Abb. 8: IL-4, IL-13 und Eotaxin-3 *electrochemiluminescence-multiplex-immunoassay* Versuchsprotokoll (Mesoscale Discovery, Gaithersburg, MD, USA).

### 3.6 Mengenerberechnung und Statistik

Für die Rückrechnung von den gemessenen Zytokinkonzentrationen zur Zytokinmenge, die pro Kollektions-*Disc* gesammelt wurde, wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Menge} = \text{Konzentration} * (\text{Disc-Gewicht} / \text{Eluatvolumen})$$

Im Folgenden sind alle Angaben für die Zytokine im Nasensekret als Gesamtmenge pro Kollektions-*Disc* dargestellt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm MedCalc 12.1.0 (Kagi, Berkeley, CA, USA). Da keine Normalverteilung vorlag, wurden nicht-parametrische statistische Verfahren angewandt. Zunächst wurde der Friedman-Test durchgeführt um signifikante Differenzen im Datenverlauf der Zeitpunkte festzustellen. Anschließend erfolgte die Berechnung des p-Wertes der einzelnen Messzeitpunkte nach Allergenprovokation gegenüber dem Messzeitpunkt nach Applikation des Lösungsmittels (Zeitpunkt: *DiI*) durch die *post-hoc* Analyse von Conover. Die signifikanten Zeitpunkte wurden mit den Symptomen sowie mit den weiteren Zytokinen zu dem korrespondierenden Zeitpunkt korreliert. Zur Bestimmung der Korrelationen wurde der Rangkorrelationskoeffizient mit Kendalls Tau und Spearmans Rangkorrelationskoeffizient berechnet. Die im Folgenden dargestellten Werte sind Mittelwerte (MW) +/- Standardabweichung des Mittelwertes (SEM). P-Werte von  $p < 0,05$  (beidseitig) wurden als signifikant betrachtet.

Für die Erstellung der Grafiken wurde das Programm Prism (Graph Pad, San Diego, CA, USA) verwendet.

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Kontrollprovokation

Die während der Kontrollprovokationen erhobenen klinischen Symptom-Scores, Rhinomanometriewerte sowie Nasensekret- und Serumwerte aller Zytokine zeigten bei keinem Probanden und zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine signifikante Änderung.

## 4.2 Allergenprovokation

### 4.2.1 Klinische Symptome

Die nasale Allergenprovokation führte zu den typischen klinischen Symptomen und physiologischen Änderungen. Aus dem Mittelwert der Millimeter Angaben auf der visuellen Analogskala für Niesen, Juckreiz und Sekretion zu jedem Zeitpunkt wurde der nasale Symptom-Score gebildet. Unmittelbar nach der Allergenprovokation kam es zu einem signifikanten, steilen Anstieg des Symptom-Scores. Im Verlauf waren die Symptome stetig rückläufig und der Symptom-Score fiel bei 24 Stunden wieder auf einen niedrigen, nicht signifikanten Wert ab (Abb. 9, Tabelle 4). Weiterhin löste die Allergenprovokation bei den Probanden unmittelbar Niesen mit einer statistisch signifikanten Erhöhung der Anzahl nach zehn Minuten aus (Tabelle 5). Auch in der Rhinomanometrie kam es zehn Minuten nach Allergenprovokation zu einem deutlichen, jedoch statistisch nicht signifikanten Abfall der nasalen Luftdurchgängigkeit. Die Symptome nahmen kontinuierlich zum Ende des Beobachtungszeitraums ab (Tabelle 6).

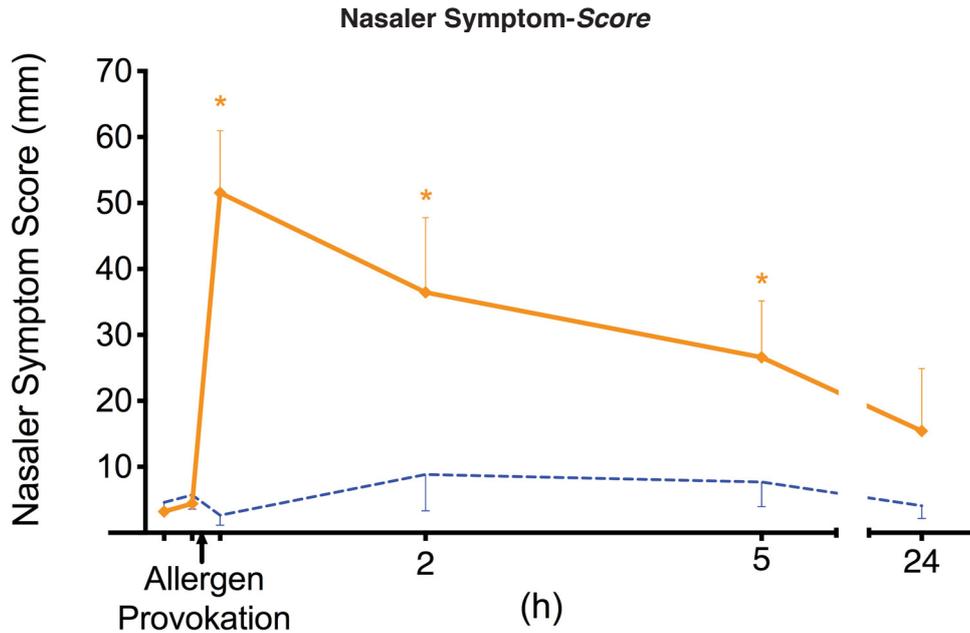


Abb. 9: Nasaler Symptom-Score im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Millimeter (mm). (— Allergenprovokation, - - - Kontrollprovokation, \*  $p < 0.05$ , h = Stunden, n = 6)

Tabelle 4: Nasaler Symptom-Score

	Provokation			Kontrolle		
	MW	SEM	P	MW	SEM	P
<b>BI</b>	3,2	0,8	n.s.	4,6	1,5	n.s.
<b>Dil</b>	4,4	1,2	n.s.	5,7	2,1	n.s.
<b>10m</b>	51,6	9,4	<0,05	2,7	1,5	n.s.
<b>2h</b>	36,4	11,3	<0,05	8,8	5,5	n.s.
<b>5h</b>	26,6	8,5	<0,05	7,6	3,7	n.s.
<b>24h</b>	15,4	9,4	n.s.	4,1	1,9	n.s.

Nasaler Symptom Score im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Millimeter (n=6). (MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung des Mittelwertes, p = Signifikanzwert, n.s. = nicht signifikant)

**Tabelle 5: Anzahl des Niesens**

	Provokation			Kontrolle		
	MW	SEM	P	MW	SEM	P
<b>BI</b>	0	0	n.s.	0	0	n.s.
<b>Dil</b>	0	0	n.s.	0,2	0,2	n.s.
<b>10m</b>	6	3,7	<0,05	0	0	n.s.
<b>2h</b>	0,1	0,1	n.s.	0,2	0,2	n.s.
<b>5h</b>	0,1	0,04	n.s.	0	0	n.s.
<b>24h</b>	0,1	0,02	n.s.	0	0	n.s.

Anzahl des Niesens pro zehn Minuten im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation (n=6). (MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung des Mittelwertes, p = Signifikanzwert, n.s. = nicht signifikant)

**Tabelle 6: Nasaler Flow**

	Provokation			Kontrolle		
	MW	SEM	P	MW	SEM	P
<b>BI</b>	213	47,4	n.s.	376	84,2	n.s.
<b>Dil</b>	272,7	75,3	n.s.	319,4	100,6	n.s.
<b>10m</b>	76,7	38,3	n.s.	386,7	71,5	n.s.
<b>2h</b>	169,4	36,3	n.s.	372,6	120,4	n.s.
<b>5h</b>	167,4	71,9	n.s.	302	58	n.s.
<b>24h</b>	228,7	49	n.s.	298	92,1	n.s.

Nasaler Flow im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Kubikzentimeter/ Sekunde bei 150 Pascal (n=6). (MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung des Mittelwertes, p = Signifikanzwert, n.s. = nicht signifikant)

#### 4.2.2 Interleukin-4

Im Nasensekret war IL-4 vor und zehn Minuten nach Allergenprovokation nicht nachweisbar. Zwei Stunden nach Allergenprovokation zeigte sich ein Anstieg, der bei fünf Stunden einen maximalen, signifikant erhöhten Wert erreichte. Nach 24 Stunden war IL-4 erneut nicht messbar (Abb. 10, Tabelle 7). Im Serum konnte IL-4 zu keinem der drei Messzeitpunkte nachgewiesen werden.

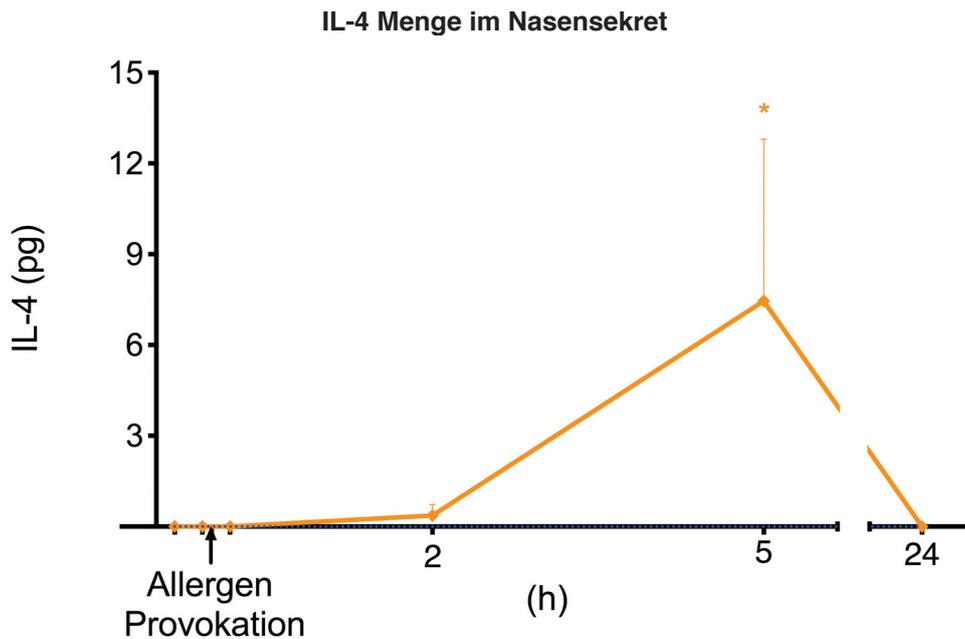


Abb. 10: IL-4 Menge im Nasensekret im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Picogramm (pg). Während der Kontrollprovokation konnte IL-4 zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. (— Allergenprovokation, - - - Kontrollprovokation, \*  $p < 0.05$ , h = Stunden, n = 6)

**Tabelle 7: IL-4 Menge im Nasensekret**

	Provokation			Kontrolle		
	MW	SEM	P	MW	SEM	P
<b>Bl</b>	0	0	n.s.	0	0	n.s.
<b>Dil</b>	0	0	n.s.	0	0	n.s.
<b>10m</b>	0	0	n.s.	0	0	n.s.
<b>2h</b>	0,4	0,4	n.s.	0	0	n.s.
<b>5h</b>	7,5	5,3	<0,05	0	0	n.s.
<b>24h</b>	0	0	n.s.	0	0	n.s.

IL-4 Menge im Nasensekret im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Picogramm (n=6). (MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung des Mittelwertes, p = Signifikanzwert, n.s. = nicht signifikant)

### 4.2.3 Interleukin-13

Nach Allergenprovokation folgte ein kontinuierlicher Anstieg der IL-13 Menge bis zu einem signifikanten Maximum bei fünf Stunden. Zum 24 Stunden Zeitpunkt fielen die Werte erneut auf ein niedriges Niveau (Abb. 11, Tabelle 8). Im Serum zeigte sich ein geringer Anstieg nach fünf Stunden, jedoch war die Änderung zu keinem Zeitpunkt signifikant (Abb. 12, Tabelle 9).

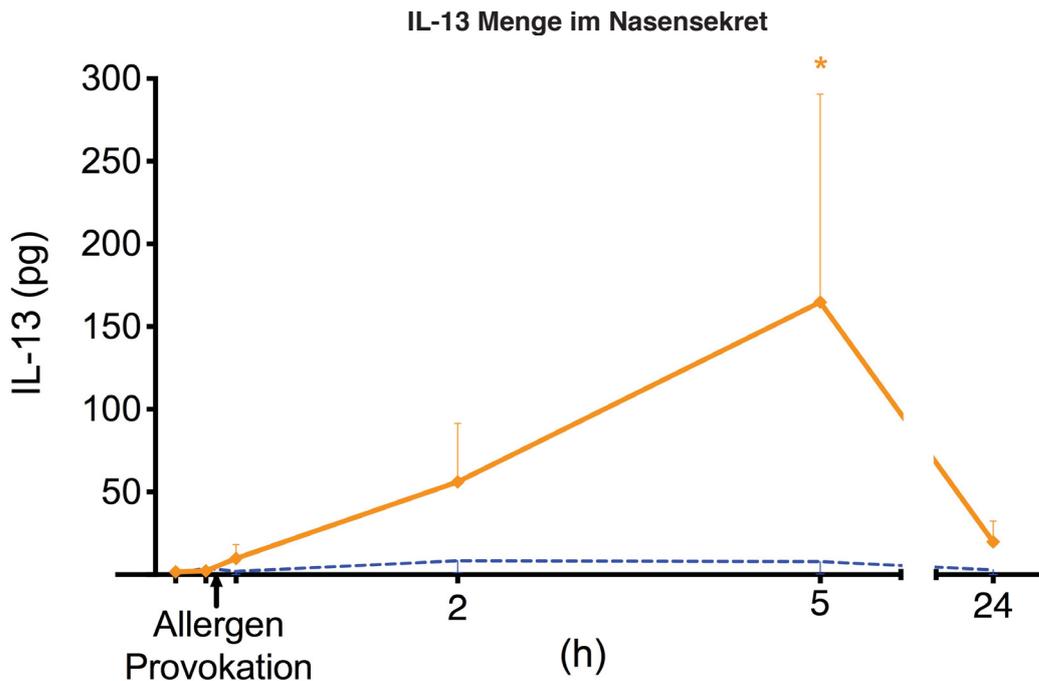


Abb. 11: IL-13 Menge im Nasensekret im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Picogramm. (— Allergenprovokation, - - - Kontrollprovokation, \*  $p < 0.05$ , h = Stunden, n = 6)

Tabelle 8: IL-13 Menge im Nasensekret

	Provokation			Kontrolle		
	MW	SEM	P	MW	SEM	P
<b>Bl</b>	1,6	1,6	n.s.	0,7	0,7	n.s.
<b>Dil</b>	2,3	2,3	n.s.	4	2,9	n.s.
<b>10m</b>	9,8	8,4	n.s.	2	2	n.s.
<b>2h</b>	56,1	35,4	n.s.	8,4	7	n.s.
<b>5h</b>	164,8	125,9	<0,05	7,9	7,5	n.s.
<b>24h</b>	19,9	12,6	n.s.	2,9	2,9	n.s.

IL-13 Menge im Nasensekret im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Picogramm (n=6). (MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung des Mittelwertes, p = Signifikanzwert, n.s. = nicht signifikant)

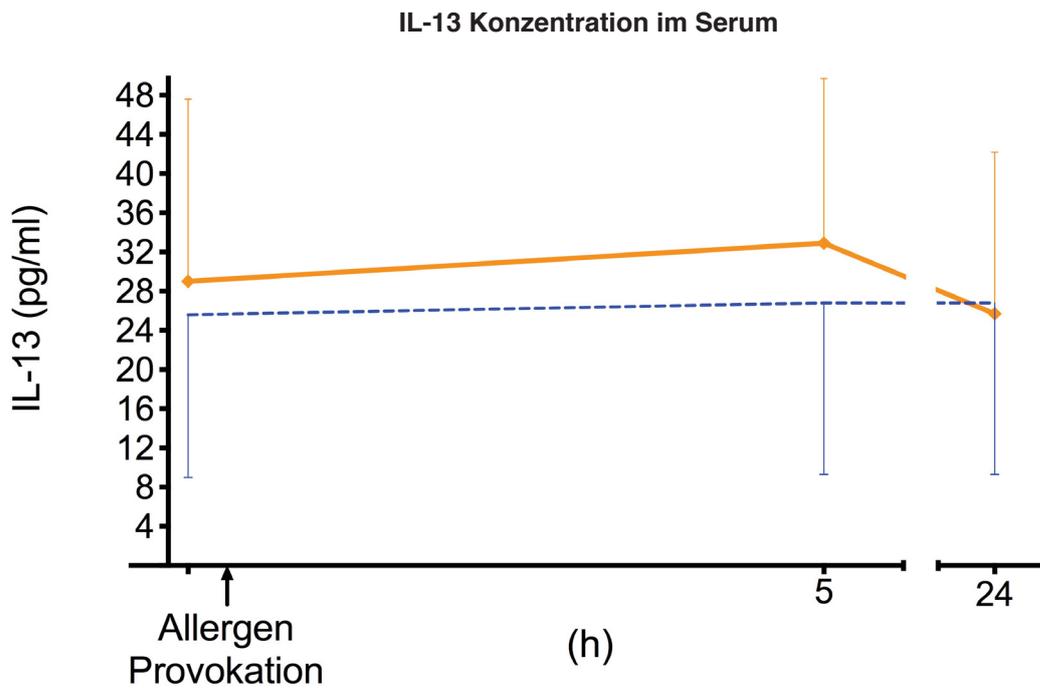


Abb. 12: IL-13 Konzentration im Serum im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Picogramm/Milliliter (pg/ml).  
 (— Allergenprovokation, - - - Kontrollprovokation, \*  $p < 0.05$ , h = Stunden, n = 6).

**Tabelle 9: IL-13 Konzentration im Serum**

	Provokation			Kontrolle		
	MW	SEM	P	MW	SEM	P
<b>BI</b>	29	18,6	n.s.	25,6	16,6	n.s.
<b>5h</b>	32,9	16,8	n.s.	26,8	17,5	n.s.
<b>24h</b>	25,7	16,5	n.s.	26,8	17,5	n.s.

IL-13 Konzentration im Serum im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in in Picogramm/Milliliter (n=6). (MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung des Mittelwertes, p = Signifikanzwert, n.s. = nicht signifikant)

#### 4.2.4 Eotaxin-3

Die Eotaxin-3 Menge im Nasensekret zeigte von zwei Stunden über fünf Stunden bis zu einem Maximalwert bei 24 Stunden einen kontinuierlichen signifikanten Anstieg (Abb. 13, Tabelle 10). Im Serum zeigte sich ein geringer, jedoch nicht signifikanter Anstieg nach fünf Stunden (Abb. 14, Tabelle 11).

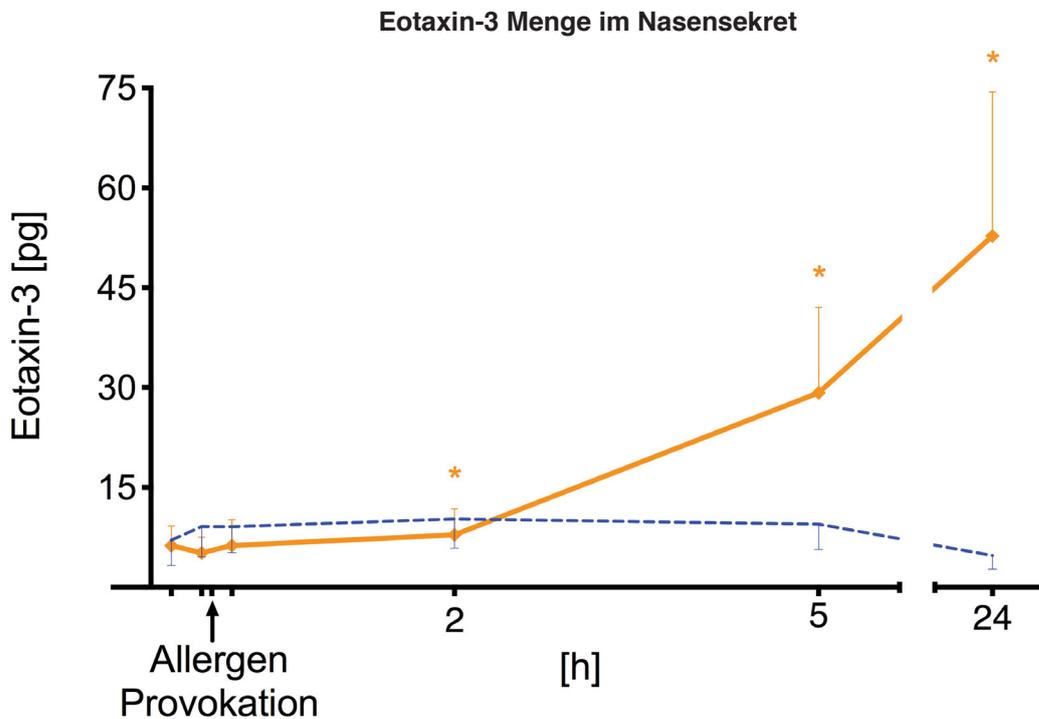


Abb. 13: Eotaxin-3 Menge im Nasensekret im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Picogramm (pg).

(— Allergenprovokation, - - - Kontrollprovokation, \*  $p < 0.05$ , h = Stunden, n = 6).

**Tabelle 10: Eotaxin-3 Menge im Nasensekret**

	Provokation			Kontrolle		
	MW	SEM	P	MW	SEM	P
<b>Bl</b>	6,3	2,9	n.s.	7,1	3,8	n.s.
<b>Dil</b>	5,2	2,3	n.s.	9,1	4,6	n.s.
<b>10m</b>	6,3	3,9	n.s.	9,1	3,9	n.s.
<b>2h</b>	7,9	3,9	<0,05	10,3	4,4	n.s.
<b>5h</b>	29,2	12,8	<0,05	9,5	3,8	n.s.
<b>24h</b>	52,8	21,6	<0,05	4,8	2,0	n.s.

Tabelle 9: Eotaxin-3 Menge im Nasensekret im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Picogramm (n=6). (MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung des Mittelwertes, p = Signifikanzwert, n.s. = nicht signifikant)

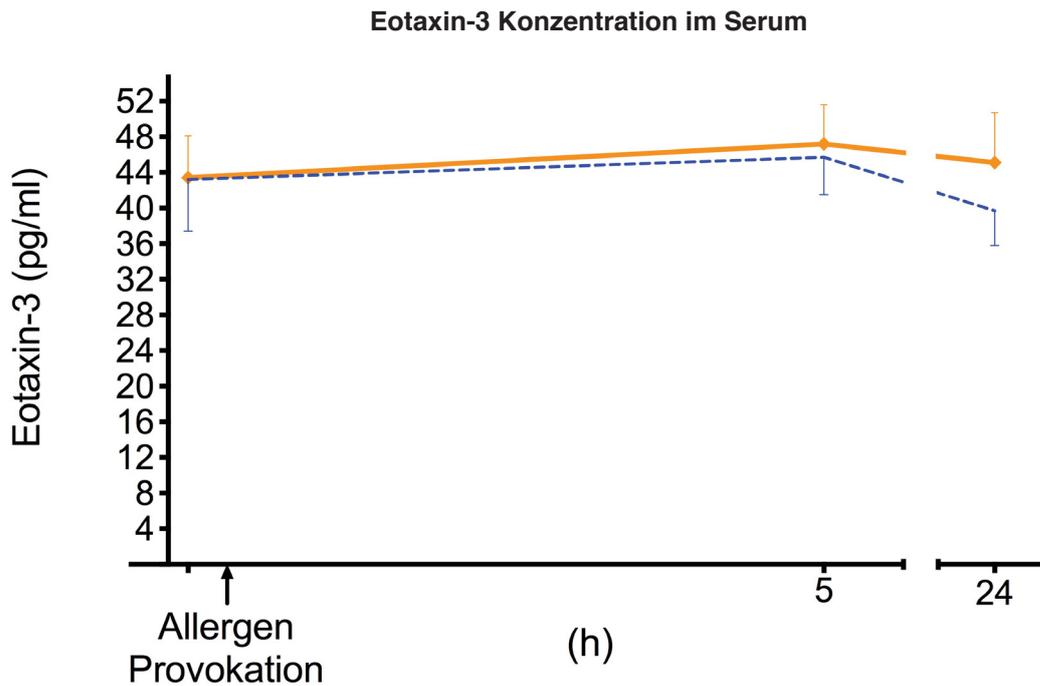


Abb. 14: Eotaxin-3 Konzentration im Serum im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Picogramm/Milliliter (pg/ml).  
 (— Allergenprovokation, - - - Kontrollprovokation, \*  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ).

**Tabelle 11: IL-13 Konzentration im Serum**

	Provokation			Kontrolle		
	MW	SEM	P	MW	SEM	P
<b>Bl</b>	43,4	4,7	n.s.	43,2	5,8	n.s.
<b>5h</b>	47,2	4,4	n.s.	45,7	4,2	n.s.
<b>24h</b>	45,1	5,6	n.s.	39,7	3,9	n.s.

IL-13 Konzentration im Serum im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Picogramm/Milliliter ( $n=6$ ). (MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung des Mittelwertes,  $p$  = Signifikanzwert, n.s. = nicht signifikant)

#### 4.2.5 Interleukin-33

Für die IL-33 Menge im Nasensekret konnte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung nach Allergenprovokation festgestellt werden werden. Die Kurve zeigte jedoch einen biphasischen Verlauf (Abb. 15, Tabelle 12). Im Serum konnte IL-33 nicht nachgewiesen werden.

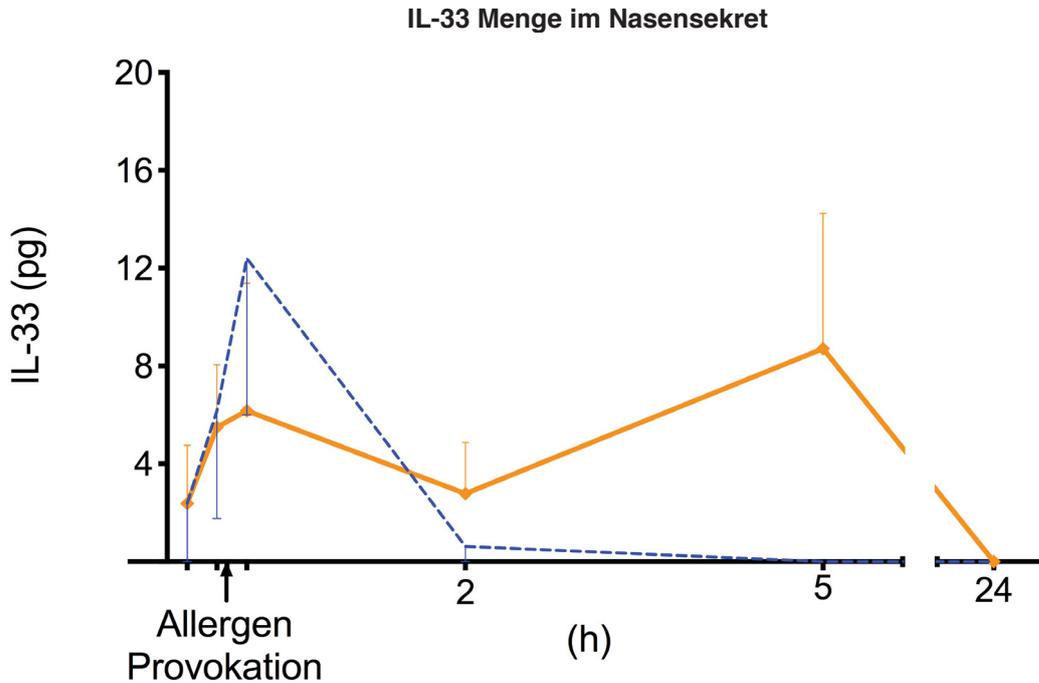


Abb. 15: IL-33 Menge im Nasensekret im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Picogramm (pg). (— Allergenprovokation, - - - Kontrollprovokation, \*  $p < 0.05$ , h = Stunden, n = 6)

**Tabelle 12: IL-33 Menge im Nasensekret**

	Provokation			Kontrolle		
	MW	SEM	P	MW	SEM	P
<b>BI</b>	2,4	2,4	n.s.	2,4	2,4	n.s.
<b>Dil</b>	5,5	2,6	n.s.	6,2	4,4	n.s.
<b>10m</b>	6,6	5,2	n.s.	12,4	6,4	n.s.
<b>2h</b>	2,8	2,1	n.s.	0,6	0,6	n.s.
<b>5h</b>	8,7	5,5	n.s.	0	0	n.s.
<b>24h</b>	0	0	n.s.	0	0	n.s.

IL-33 Menge im Nasensekret im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Picogramm (n=6). (MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung des Mittelwertes, p = Signifikanzwert, n.s. = nicht signifikant)

#### 4.2.6 sST2

Die sST2-Menge im Nasensekret zeigte nach Allergenprovokation einen zweipfeligen Kurvenverlauf: Nach einem ersten steilen Anstieg nach zehn Minuten fiel die Menge bei zwei Stunden zunächst wieder ab. Es folgte ein erneuter kontinuierlicher Anstieg bis zu einem maximalen Wert 24 Stunden nach Allergenprovokation (Abb. 16, Tabelle 13). Im Serum zeigte sich ein geringer, kontinuierlicher Anstieg fünf und 24 Stunden nach Allergenprovokation. Die Konzentrationsänderung erreichte jedoch keine Signifikanz (Abb. 17, Tabelle 14).

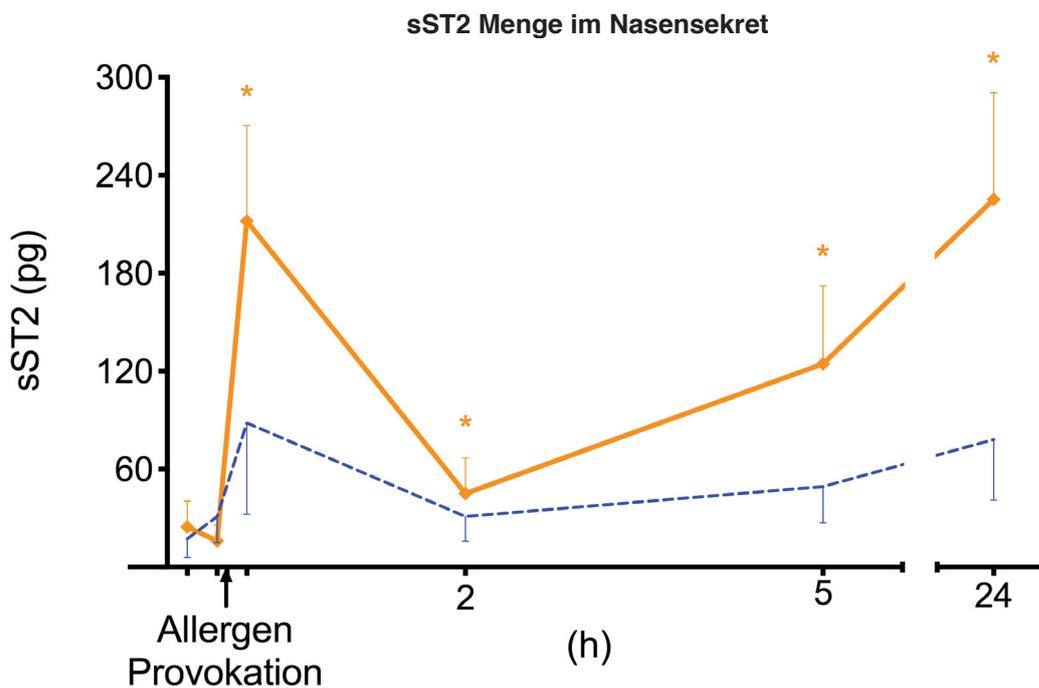


Abb. 16: sST2 Menge im Nasensekret im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Picogramm (pg). (— Allergenprovokation, - - - Kontrollprovokation, \*  $p < 0.05$ , h = Stunden, n = 6)

Tabelle 13: sST2 Menge im Nasensekret

	Provokation			Kontrolle		
	MW	SEM	P	MW	SEM	P
<b>Bl</b>	24,6	15,8	n.s.	17,3	11,4	n.s.
<b>Dil</b>	16	9,7	n.s.	30,9	16	n.s.
<b>10m</b>	211,9	58,5	<0,05	88,3	55,9	n.s.
<b>2h</b>	45	21,9	<0,05	30,9	15,1	n.s.
<b>5h</b>	124,5	47,7	<0,05	49,3	22,2	n.s.
<b>24h</b>	225,3	65,3	<0,05	78,1	37,1	n.s.

sST2 Menge im Nasensekret im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Picogramm (n=6). (MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung des Mittelwertes, p = Signifikanzwert, n.s. = nicht signifikant)

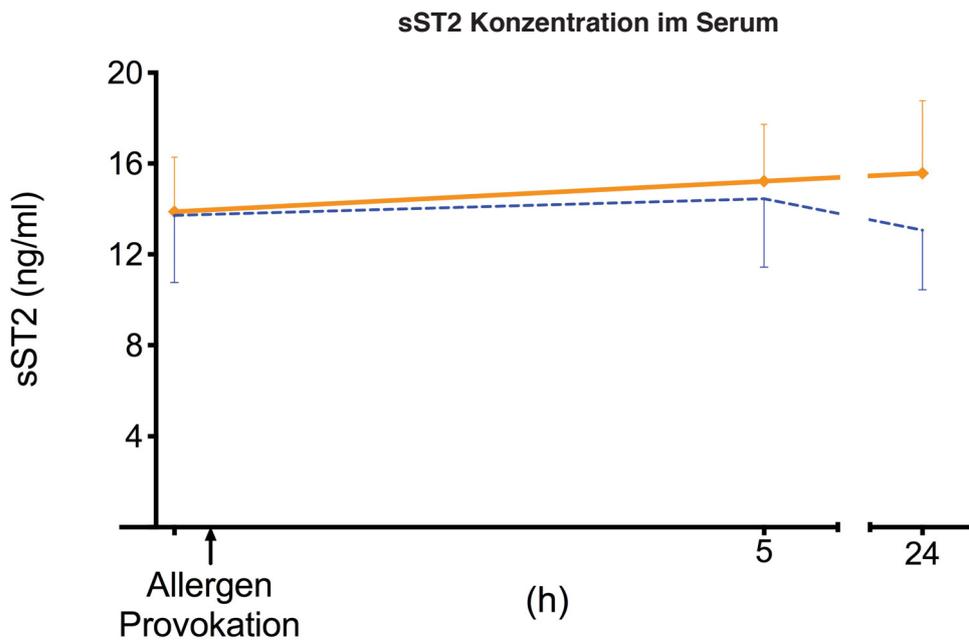


Abb. 17: sST2 Konzentration im Serum im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Nanogramm/ Milliliter (ng/ ml).  
 (— Allergenprovokation, - - - Kontrollprovokation, \*  $p < 0.05$ , h = Stunden, n = 6).

**Tabelle 14: sST2 Konzentration im Serum**

	Provokation			Kontrolle		
	MW	SEM	P	MW	SEM	P
<b>BI</b>	13,9	2,4	n.s.	13,7	3	n.s.
<b>5h</b>	15,2	2,5	n.s.	14,5	3	n.s.
<b>24h</b>	15,6	3,2	n.s.	13,1	2,6	n.s.

sST2 Konzentration im Serum im zeitlichen Verlauf nach Allergen- und Kontrollprovokation in Nanogramm/Milliliter (n=6). (MW = Mittelwert, SEM = Standardabweichung des Mittelwertes, p = Signifikanzwert, n.s. = nicht signifikant)

## 4.3 Korrelationen

Die signifikant erhöhten Zytokinmengen wurden mit den Mengen der anderen Zytokine und den klinischen Symptome an den entsprechenden Zeitpunkten korreliert. Zur Bestimmung der Korrelationen wurde Kendalls Tau und Spearmans Rangkorrelationskoeffizient berechnet. Es zeigten sich signifikante Korrelationen bei IL-4 (Tabelle 15), IL-13 (Tabelle 16) und sST2 (Tabelle 17):

**Tabelle 15: IL-4 Korrelationen**

	IL-4 (5h)			
	rho	p	tau	p
<b>Nasaler Symptom-Score</b>	0,88	0,0206	0,745	0,0587
<b>Obstruktion</b>	0,88	0,0206	0,745	0,0587
<b>Sekretion</b>	0,88	0,0206	0,745	0,0587
<b>IL-13</b>	0,955	0,003	0,926	0,0168

Spearmans Rangkorrelationskoeffizient (rho) und Kendalls Tau (tau) für IL-4 (n=6). (p = Signifikanzwert)

**Tabelle 16: IL-13 Korrelationen**

	IL-13 (5h)			
	rho	p	tau	p
<b>Nasaler Symptom-Score</b>	0,928	0,0077	0,828	0,0324
<b>Obstruktion</b>	0,928	0,0077	0,828	0,0324
<b>IL-4</b>	0,955	0,003	0,926	0,0168

Spearmans Rangkorrelationskoeffizient (rho) und Kendalls Tau (tau) für IL-13 (n=6). (p = Signifikanzwert)

**Tabelle 17: Korrelationen**

	sST2 (24h)			
	rho	p	tau	p
<b>Obstruktion</b>	0,812	0,0499	0,69	0,0801
<b>Juckreiz</b>	0,971	0,0012	0,931	0,0155

Spearmans Rangkorrelationskoeffizient (rho) und Kendalls Tau (tau) für sST2 (n=6). (p = Signifikanzwert)

## 5 Diskussion

In dieser Studie wurde die Freisetzung von Zytokinen ins Nasensekret und Blut nach nasaler Allergenprovokation bei Probanden mit allergischer Rhinitis untersucht. Nach Allergenprovokation konnten bei den Probanden die typischen klinischen Symptome und physiologischen Änderungen beobachtet werden. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg von IL-4, IL-13 sowie Eotaxin-3 in der Spätphase und von sST2 sowohl in der Früh- als auch in der Spätphase nach Allergenprovokation im Nasensekret. Dabei korrelierten die Änderungen einiger Zytokine mit klinischen Symptomen der Probanden. Signifikante Änderungen der IL-33 Menge im Nasensekret konnten hingegen nicht gemessen werden.

### 5.1 Studiendesign

Die Anwendung der Filterpapier-*Disc*-Methode zur Durchführung der nasalen Allergenprovokation ermöglichte es, eine lokale, nasale Allergenprovokation durchzuführen, Nasensekret zu sammeln und dabei gleichzeitig physiologische Parameter zu bestimmen. Diese Methode hat wesentliche Vorteile gegenüber anderen Methoden zur nasalen Provokation (z.B. Verwendung eines Pumpsprays zur Provokation) und Sammeln von Nasensekret (z.B. Nasenlavagen) (N Franklin Adkinson u. a., 2008):

- Aufgrund der geringen Größe und Auflagefläche der *Disc* wird die Nasenschleimhaut nur sehr wenig unspezifisch gereizt. Während beispielsweise eine Nasenlavage mit NaCl auf einen großen Teil der Nasenschleimhaut wirkt, kann die *Disc* mit 10 mm Durchmesser auf einen kleinen Teil der Schleimhaut platziert werden. Die physiologischen Parameter der Nase, z. B. die nasale Luftdurchgängigkeit, werden dabei kaum beeinflusst. Diese können so wiederholt gemessen werden.
- Das Einlegen der *Disc* wird dabei von dem Probanden deutlich besser toleriert als z.B. wiederholte Nasenlavagen. Allerdings erfordert das Einlegen der *Disc* eine gewisse Einarbeitungszeit und Routine, sodass in dieser Studie zwei der ersten Probanden aufgrund von Nasenbluten nach der Einlage der *Disc* ausgeschlossen werden mussten.

- Die Nasenschleimhaut ist gut zugänglich. Die direkte Applikation von Allergenen auf die Nasenschleimhaut entspricht letztendlich der natürlichen Exposition und eignet sich damit hervorragend die allergische Reaktion der Nase zu simulieren und zu untersuchen.
- Durch die definierte Menge des Allergens und die konstante Aufliegezeit der *Discs* handelt es sich zudem um eine sehr gut steuerbare und reproduzierbare Methode. Für jeden Probanden konnte damit eine identische Allergenmenge und Applikationszeit sichergestellt werden.
- Das Wiegen der trockenen *Disc* vor der Applikation, erneutes Wiegen der feuchten *Disc* nach Lage auf der Nasenschleimhaut sowie das Eluieren in ein festgelegtes Volumen erlaubt eine exakte Quantifizierung des gesammelten Nasensekrets. Die Berechnung der Gesamtmenge der Zytokine in dem Nasensekret ermöglicht es - im Gegensatz zur Konzentrationsangabe - Verdünnungseffekte, z.B. durch starke Sekretion von wässrigem Nasensekret, zu berücksichtigen.
- Mit der *Disc*-Methode kann unverdünntes oder nur sehr gering verdünntes Nasensekrets wiederholt gesammelt werden. Während bei Nasenlavagen in der Regel mit Volumina zwischen 2,5 und 5 ml gearbeitet wird, wurde die *Disc* in den Experimenten dieser Arbeit in 500 µl eluiert. Nachteilig ist dabei, dass im Vergleich zur Nasenlavage nur geringe Sekretmengen für die sich anschließenden Laboruntersuchungen bereitstehen. Der große Vorteil ist jedoch die geringe Verdünnung. So können Zytokine, die in nur geringen Mengen freigesetzt werden, nachgewiesen werden. Beispielsweise konnten Erin und Mitarbeiter IL-4 nur im unverdünntem Nasensekret und nicht in Nasenlavagen nachweisen (Erin, 2005b).

Die Allergenprovokation fand außerhalb der Allergiesaison statt und die klinische Reaktion auf die Allergenprovokation wurde mittels *Symptom-Score* und Rhinomanometrie dokumentiert. Auch wurden mit der Anamnese und dem *Prick*-Hauttest Allergiker mit ganzjährigen Beschwerden, z.B. mit einer Sensibilisierung gegen Hausstaubmilben, ausgeschlossen. Dadurch konnte weitgehend sichergestellt werden, dass bei den Probanden eine adäquate allergische Entzündungsreaktion nur durch die Provokation mit der *Provokations-Disc* ausgelöst wurde. Die in die Analyse eingeschlossenen Patienten zeigten

ausnahmslos einen signifikanten Anstieg des Symptom-Scores und einen Abfall des nasalen *Flows*.

Das Nasensekrets wurde zu den Zeitpunkten 10m, 2h, 5h und 24h nach Allergenprovokation gesammelt. Die Zeitpunkte wurden gewählt, um sowohl die Früh- (10m) als auch die Spätphase (2h, 5h) der allergischen Reaktion zu untersuchen. In zahlreichen vorhergehenden klinischen Studien hatte sich gezeigt, dass insbesondere zu diesen Zeitpunkten signifikante Freisetzungen von Zytokinen zu erwarten sind. Der 24h Zeitpunkt ermöglicht es auch sehr späte Reaktionen zu dokumentieren. In dieser Studie konnten so auch signifikant erhöhte Werte von Eotaxin-3 und sST2 zu dem 24h Zeitpunkt gemessen werden. Der Verlauf der Freisetzung zwischen und nach den vermessenen Zeitpunkten bleibt allerdings unklar und sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Die Auswahl des Allergens beruhte auf der Anamnese und der klinischen Reaktion im *Prick*-Hauttest. Ein Proband unserer Studie musste wegen ausbleibender klinischer Reaktion nach Allergenprovokation ausgeschlossen werden. Diese Beobachtung bestätigt, dass eine Sensibilisierung im *Prick*-Hauttest nicht immer mit einer klinischen Reaktion nach Exposition mit diesem Allergen einhergehen muss. Für folgende Studien sollte daher ein positiver nasaler Provokationstest als weiteres Einschlusskriterium diskutiert werden. Dieser wesentliche Unterschied zwischen allergischer Sensibilisierung und tatsächlicher, klinisch relevanter allergischer Rhinitis ist auch der Grund dafür, dass nasale Allergenprovokationen seit Jahren einen Eingang in die klinische Routinediagnostik gefunden haben.

## **5.2 Interleukin-4**

IL-4 wird hauptsächlich von Th2-Zellen produziert, jedoch können auch Basophile, Eosinophile und Mastzellen IL-4 freisetzen. IL-4 interagiert mit den Zielzellen über die Typ I und Typ II IL-4-Rezeptoren (IL-4R). Beide Rezeptoren bestehen aus jeweils zwei Untereinheiten und besitzen beide die IL-4R alpha Untereinheit. Der Typ I Rezeptor kann nur IL-4 binden und zeichnet sich durch die *gamma-chain* Untereinheit aus. Zusammen mit IL-2, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21

wird IL-4 zur Gruppe *der common gamma-chain* Zytokinfamilie gezählt. Den Typ I Rezeptor findet man vor allem auf hämatopoetischen Zellen und T-Zellen. Der Typ II Rezeptor dagegen besitzt die IL-13R alpha 1 Untereinheit und kann sowohl von IL-4 als auch IL-13 stimuliert werden. Er ist sowohl auf hämatopoetischen als auch auf anderen Zelltypen, z.B. Fibroblasten oder Endothelzellen, nicht jedoch auf T-Zellen, lokalisiert. IL-4 trägt wesentlich zur Differenzierung nativer Th0-Zellen zu Th2-Helferzellen, dem Antigenwechsel von IgM zu IgE in B-Zellen und der Erhöhung der MHC-II-Expression auf Monozyten, Makrophagen und B-Zellen bei. Weiterhin bewirkt IL-4 eine Hoch-Regulierung von Adhäsionsmolekülen, z.B. VCAM-1, auf Endothelzellen und fördert so den Einstrom von Immunzellen in das Gewebe (Akdis, 2011; Wills-Karp, Finkelman, 2008).

Zahlreiche Studien belegen die zentrale Rolle von IL-4 im Rahmen der allergischen Rhinitis. Erstmals konnten Durham und Mitarbeiter IL-4 mRNA nach lokaler Allergenprovokation in der Nasenschleimhaut von Probanden mit allergischer Rhinitis nachweisen (Durham, 1992). Bradding und Mitarbeiter konnten mit der Immunhistochemie zeigen, dass sich bei Probanden mit allergischer Rhinitis signifikant mehr IL-4 positive Zellen - überwiegend Mastzellen - als bei Kontrollprobanden in der Mukosa der Nasenschleimhaut finden (Bradding, 1993). Der direkte Nachweis von IL-4 stellte sich jedoch zunächst schwierig dar, u.a. da das Protein in nur geringen Mengen produziert und zudem schnell wieder abgebaut wird. Wagenmann und Mitarbeiter konnten durch Anwendung der *Disc*-Methode und sensitiver Nachweismethoden einen signifikanten Anstieg von IL-4 vier, fünf und sieben Stunden nach nasaler Provokation von Probanden mit saisonaler allergischer Rhinitis zeigen (Wagenmann, 2005). Auch Erin und Mitarbeiter wiesen einen kontinuierlichen, signifikanten IL-4 Anstieg von zwei bis acht Stunden nach Allergenprovokation im unverdünnten Nasensekret nach (Erin, 2005a).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg von IL-4 fünf Stunden nach Allergenprovokation demonstriert werden. Damit wird die Beobachtung, dass IL-4 vor allem in der Spätphase der allergischen Reaktion freigesetzt wird, bestätigt. Hervorzuheben ist, dass die IL-4 Menge signifikant mit dem Ausmaß der nasalen Sekretion und Obstruktion fünf Stunden nach Allergenprovokation korreliert. Auch andere Arbeitsgruppen konnten signifikante Korrelationen mit

diesen klinischen Symptomen nachweisen: Beispielsweise zeigten Ciprandi und Mitarbeiter eine negative Korrelation der IL-4 Werte in Nasenlavagen mit der nasalen Luftdurchgängigkeit in der Rhinomanometrie bei Probanden mit allergischer Rhinitis während natürlicher Exposition (Ciprandi, 2004). Ursache der durch IL-4 induzierten Nasenatmungsbehinderung könnte eine IL-4 vermittelte Sekretion von Mukus und die Metaplasie von Atemwegsepithel in Mukus produzierende Becherzellen sein (Dabbagh, 1999). Die Korrelation von IL-4 mit dem nasalen Symptom-Score unterstreicht nochmals die starke pro-inflammatorische Wirkung dieses Zytokins. Somit erscheint die Hemmung von IL-4 als eine sinnvolle Option zur Therapie der allergischen Rhinitis. In der Tat konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass die IL-4 Produktion sowohl durch topische Steroide als auch durch Antihistaminika signifikant gesenkt wird. Zudem kommt es dabei zu einer deutlichen Reduktion der klinischen Symptome. (Ciprandi, 2005; Erin, 2005b; Hafez, 2004). Auch eine direkte Hemmung der IL-4 Effekte wird untersucht: Nach Applikation von Pitakinra, einem veränderten IL-4 Protein welches an die IL-4R alpha Untereinheit bindet und die Wirkung von IL-4 und IL-13 hemmt, zeigten Asthmatiker eine deutlichen geringeren Abfall der forcierten Einsekundenkapazität als nach Placebogabe (Bice, 2014). Somit ist eine Hemmung von IL-4 bei der allergischen Rhinitis grundsätzlich denkbar.

### **5.3 Interleukin-13**

IL-13 wird u.a. von T-Zellen, Mastzellen, Basophilen, Eosinophilen und natürlichen Killerzellen freigesetzt. Da IL-13, wie auch IL-4, den IL-13R alpha 1/ IL-4R alpha Typ II - Rezeptor stimulieren kann, besitzen IL-4 und IL-13 ein ähnliches Wirkspektrum (Wills-Karp, Finkelman, 2008). IL-13 fördert den Antigenwechsel von IgM zu IgE sowie die MHC-II und CD23 Expression auf B-Zellen. Weitere immunologische Effekte sind Aktivierung und Verlängerung der Überlebenszeit von Eosinophilen, Makrophagen und dendritischen Zellen. Im Gegensatz zu IL-4 kann IL-13 nicht an den Typ I - Rezeptor binden. Während viele hämatopoetische und Stromazellen (z.B. glatte Muskelzellen und Epithelzellen) beide Rezeptortypen besitzen, findet sich auf T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Basophilen nur der Typ I - Rezeptor. IL-13 besitzt keinen Einfluss auf die Differenzierung nativer Th0-Zellen zu Th2-Helferzellen. Somit unterscheiden sich

die zwei Zytokine in dem Spektrum ihrer Zielzellen und auch der intrazellulären Signaltransduktion (Poulsen, Hummelshoj, 2007; Wills-Karp, Finkelman, 2008).

IL-13 wird in der Nasenschleimhaut von Probanden mit allergischer Rhinitis exprimiert (Pawankar, 1995). Interessanterweise zeigte sich bei Probanden mit allergischer Rhinitis im Vergleich mit gesunden Kontrollen kein signifikanter Unterschied der IL-13 mRNA Expression in der Nasenschleimhaut. Jedoch kam es 24 Stunden nach Allergenprovokation zu einem signifikanten Anstieg der IL-13 mRNA positiven Zellen. Andere Arbeitsgruppen konnten einen Anstieg der IL-13 Werte im Nasensekret zwischen vier und acht Stunden nach lokaler Allergenprovokation messen (Erin, 2005a; 2005b).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen signifikanten Anstieg der IL-13 Menge fünf Stunden nach Allergenprovokation und bestätigen damit die Beteiligung von IL-13 an der Spätphase der allergischen Rhinitis. Angesichts des ähnlichen Wirkspektrums ist es nicht verwunderlich, dass die IL-13 Menge im Nasensekret, ebenso wie IL-4, mit der Sekretion, Obstruktion und dem nasalen Symptom-Score fünf Stunden nach Allergenprovokation korreliert. Zudem korrelieren die Mengen dieser Zytokine untereinander zu diesem Zeitpunkt, da beide Zytokine vorrangig von Th2-Zellen, Mastzellen und Basophilen freigesetzt werden. Im Mausmodell konnte die nasale Obstruktion - das wesentliche klinische Symptom der Spätphase - durch Hemmung von IL-13 stark abgeschwächt werden (Miyahara, 2006). Die Korrelation der IL-13 Menge mit der subjektiven nasalen Obstruktion fünf Stunden nach Allergenprovokation in der vorliegenden Arbeit geben einen weiteren Hinweis, dass IL-13 wesentlich zu der nasalen Obstruktion in der Spätphase beiträgt. Die therapeutische Anwendung von monoklonalen Anti-IL-13 Antikörpern bei Asthmatikern zeigt erste Erfolge in Phase II klinischen Studien. Nach Gabe von Lebrikizumab oder Anrukinzumab konnte eine Verbesserung der basalen forcierten Einsekundenkapazität sowie ein geringerer Abfall derselben nach Allergenprovokation im Vergleich zur Placebogabe festgestellt werden (Bice, 2014). Eine Anwendung bei allergischer Rhinitis wurde bisher nicht beschrieben, könnte jedoch in Zukunft einen interessanten Therapieansatz darstellen.

## 5.4 Eotaxin-3

Eotaxin-3 gehört zusammen mit Eotaxin-1 und Eotaxin-2 aufgrund zwei hintereinander gebundener Cystein Aminosäuren zu der C-C-Familie der Chemokine. Eotaxin-3 wird häufig auch als CC-Chemokin-Ligand-26 (CCL26) bezeichnet (Nakayama, 2010). Eotaxin-3 wird von Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und anderen Stromazellen nach Stimulation durch IL-4 und IL-13 freigesetzt (Blanchard, 2005; Dulkys, 2001; Komiya, 2003). Eotaxin-3 kann den CC-Rezeptor 3 auf Eosinophilen, Basophilen und Th2-Zellen sowie den CX3C-Rezeptor 1 auf natürlichen Killerzellen und Monozyten stimulieren. Damit fördert Eotaxin-3 die chemotaktische Migration dieser Zellen. Allerdings ist die agonistische Wirkung von Eotaxin-3 sowohl für den CC-Rezeptor 3 als auch den CX3C-Rezeptor 1 ca. zehnfach geringer als eine Stimulation dieser Rezeptoren durch andere Chemokine wie z.B. Eotaxin-1 (Kitaura, 1999; Nakayama, 2010). Weiterhin ist Eotaxin-3 ein Antagonist des CC-Rezeptors 1, 2 und 5 (Ogilvie, 2003; Petkovic, 2004). Diese Rezeptoren finden sich auf verschiedenen Immunzellen, u.a. Monozyten, Makrophagen, Basophilen. Eine Stimulation dieser Rezeptoren führt zur Chemotaxis, Aktivierung sowie Freisetzung von Enzymen und Zytokinen der Zielzellen (Ogilvie, 2001). Entsprechend könnten diese Effekte durch Eotaxin-3 gehemmt werden. So konnten Ogilvie und Mitarbeiter zeigen, dass Eotaxin-3 über den CC-Rezeptor 2 eine aktive Bewegung weg von einem Eotaxin-3 Gradienten und eine Hemmung der Enzymfreisetzung bei Monozyten induziert (Ogilvie, 2003). Als ein nur partieller Agonist für CC-Rezeptor 3 und CX3C-Rezeptor 1 sowie Antagonist für CC-Rezeptor 1, 2 und 5 könnte Eotaxin-3 eine Rolle in der Modulation und Abschwächung der allergischen Entzündungsreaktion spielen.

Verschiedene Studien haben eine Beteiligung von Eotaxinen an Erkrankungen des atopischen Formenkreises gezeigt. Probanden mit atopischer Dermatitis weisen im Vergleich mit Kontrollprobanden signifikant erhöhte Eotaxin-3 Serumwerte auf, die zudem mit der Schwere der Erkrankung korrelieren (Kagami, 2003). Erste Hinweise für die Beteiligung von Eotaxin-3 an dem Pathomechanismus der allergischen Rhinitis gibt die Beschreibung einer Assoziation von Einzelnukleotid-Polymorphismen von Eotaxin-3 mit der allergischen Rhinitis (Chae, 2005). In Nasenlavagen von Probanden mit

allergischer Rhinitis konnte ein signifikanter Anstieg von Eotaxin-1 nach Allergenprovokation und signifikant erhöhte Eotaxin-2 Werte im Vergleich mit Kontrollen gezeigt werden (De Corso, 2011; Semik-Orzech, 2011). Diese Art von Studien lagen für Eotaxin-3 bisher nicht vor.

In der vorliegende Arbeit wird erstmals ein signifikanter Eotaxin-3 Anstieg im Nasensekret bei Probanden mit allergischer Rhinitis nach nasaler Allergenprovokation nachgewiesen. Der zeitliche Verlauf der Freisetzung, mit Beginn bei zwei Stunden und einem Maximum bei 24 Stunden, sowie die Korrelation mit den klinischen Symptomen deutet auf eine Beteiligung vor allem in der Spätphase hin. Auch bei Asthmatikern konnte eine erhöhte Eotaxin-3 Genexpression 24 Stunden nach Allergenprovokation im Bronchialepithel nachgewiesen werden (Berkman, 2001). Damit könnte Eotaxin-3 eine wichtige Rolle in der Regulation der chemotaktischen Migration von Immunzellen in die Nasenschleimhaut in der Spätphase nach Allergenexposition spielen. Letztendlich sind weitere Studien und funktionelle Experimente notwendig um die Funktion von Eotaxin-3 in der Pathophysiologie der allergische Rhinitis weiter zu entschlüsseln.

## **5.5 Interleukin-33 und sST2**

IL-33 gehört zusammen mit IL-1 alpha, IL-1 beta und IL-18 zu der Familie der IL-1-Zytokine. Da IL-33 erst kürzlich als Ligand des Rezeptors ST2 identifiziert wurde, sind die Funktionsmechanismen und Wirkungen noch Gegenstand der Forschung. IL-33 wird in Stromazellen wie z.B. Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothel- und Epithelzellen exprimiert und nach mechanischem Stress oder Nekrose der Zelle freigesetzt (Akdis, 2011; Kakkar, 2012). Es sind mehrere Subtypen des ST2-Rezeptors bekannt. Die ST2L-Form findet sich auf vielen für die allergische Entzündungsreaktion wesentlichen Immunzellen, z.B. Basophilen, Eosinophilen, Mastzellen und Th2-Zellen. Die Stimulation durch IL-33 führt zu einer Aktivierung dieser Zellen und damit zu einer Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Unterstützung der allergischen Entzündungsreaktion. Neben dem ST2L-Rezeptor existiert eine durch alternatives *Splicing* gebildete, lösliche Form des Rezeptors (sST2). sST2 kann unter

anderem von Fibroblasten, Makrophagen, Monozyten in Gegenwart von IL-1, Lipopolysacchariden oder Tumornekrosefaktor alpha sowie aktivierten Th2-Zellen freigesetzt werden. sST2 kann freies IL-33 binden und damit die Aktivierung des ST2L und möglicherweise die inflammatorische Wirkung hemmen (Akdis, 2011).

Verschiedene Studien geben erste Hinweise auf eine Beteiligung von IL-33 und sST2 an der allergischen Entzündungsreaktion und der Pathogenese von Erkrankungen des atopischen Formenkreises:

- Erhöhte sST2-Serumwerte konnten während einer Sepsis und einem kardiogenen Schock nachgewiesen werden (Hoogerwerf, 2010; Parenica, 2012).
- Patienten mit allergischer Rhinitis haben im Vergleich zu Kontrollprobanden erhöhte sST2 und IL-33 Serumwerte sowie eine erhöhte IL-33 und ST2L Expression in der Nasenschleimhaut (Kamekura, 2012; Sahlander, 2010).
- Asthmatiker weisen eine erhöhte Expression von IL-33 in Bronchialepithelzellen auf. Die Expression korreliert mit der Krankheitsschwere (Préfontaine, 2009).
- Bei einer akuten Asthmaexazerbation kommt es zu einem Anstieg der sST2-Serumwerte. Die Höhe korreliert dabei mit der Schwere der Exazerbation (Oshikawa, 2001).

Ein Vorkommen im Nasensekret und die Freisetzung nach Allergenprovokation wurden bisher nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Erhöhung der sST2 Menge im Nasensekret zu allen Messzeitpunkten nach Allergenprovokation gezeigt werden. Damit wird erstmalig das Freisetzungsmuster von sST2 nach Allergenprovokation charakterisiert. Es zeigt sich ein biphasischer Anstieg der sST2 Menge im Nasensekret in der Spät- und Frühphase, insbesondere zehn Minuten und 24 Stunden nach Allergenprovokation. Im Mausmodell konnte ebenfalls eine biphasische Freisetzung des murinen ST2 Proteins drei und 36 Stunden nach Allergenexposition beschrieben werden (Oshikawa, 2002). In vorhergehenden Studien konnten Wagenmann und Mitarbeiter feststellen, dass auch Histamin biphasisch mit *Peaks* in der Früh- und Spätphase nach nasaler Allergenprovokation in das Nasensekret wird freigesetzt. Begründet wurde dieser zeitliche Verlauf der Histaminfreisetzung durch Aktivierung von Mastzellen in der

Frühphase und die Aktivierung von Basophilen in der Spätphase nach Allergenprovokation (Wagenmann, 2005; 1997). Auch in der vorliegenden Arbeit könnte damit der zeitliche Verlauf der sST2 Freisetzung erklärt werden: Shimizu und Mitarbeiter fanden eine hohe Expression von sST2 mRNA in Mastzellen (Shimizu, 2005). Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sST2 in Granula von Basophilen vorliegt und durch Aktivierung und Degranulierung von Basophilen freigesetzt werden kann (Pecaric-Petkovic, 2009).

Für IL-33 konnte weder nach Allergen- noch Kontrollprovokation eine signifikante Änderungen der Menge im Nasensekret gezeigt werden. Ursächlich könnte z.B. die geringe Probandenzahl oder ein Anstieg des Zytokins außerhalb der untersuchten Messzeitpunkte sein. Während der Kontrollprovokation zeigt sich ein - jedoch nicht signifikanter - Anstieg der IL-33 Menge nach Auflage der Kontroll-*Disc* auf die Nasenschleimhaut. Kakkar und Mitarbeiter konnten zeigen, dass IL-33 auch nach mechanischem Reiz aus Zellen freigesetzt wird (Kakkar, 2012). Entsprechend könnte bereits das Auflegen der *Disc* eine Freisetzung von IL-33 bewirkt haben. Interessanterweise war die IL-33 Menge im Nasensekret um ein Vielfaches niedriger als die des löslichen Täuschrezeptors sST2. Eine ähnliche Beobachtung konnten Wagenmann und Mitarbeiter bei einem anderen Zytokin machen: Die Menge des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 beta war 1000-fach niedriger als die Menge des natürlichen Antagonisten IL-1 Rezeptor alpha (Wagenmann, 2005). Es wurde eine Regulierung der pro-inflammatorischen Effekte durch die Produktion großer Mengen des Antagonisten in der Nasenschleimhaut in Betracht gezogen. Dies könnte auch für IL-33/ sST2 zutreffen.

Die sST2 Menge im Nasensekret korreliert zu dem 24h Zeitpunkt mit der Obstruktion und dem Juckreiz. Die Schlussfolgerung, dass sST2 zur Regulierung der Entzündungsreaktion freigesetzt wird, ist naheliegend. Die Experimente anderer Arbeitsgruppen unterstützen diese Annahme: Die systemische Gabe von Anti-IL-33 führte zu einer Herabsetzung der Symptome, Eosinophileninfiltration in der Nasenschleimhaut und der IgE-Serumwerte im Mausmodell der allergischen Rhinitis (Kim, 2012). Die Verabreichung eines ST2-Fusionsproteins bewirkte eine verminderte Eosinophileninfiltration sowie IL-4- und IL-13-Freisetzung im Mausmodell von Asthma (Akdis, 2011). In Zusammenschau der aktuellen

Datenlage und der Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit kann davon ausgegangen werden, dass sST2 zur Modulation der Entzündungsreaktion in der allergischen Rhinitis beiträgt. Die Antagonisierung von IL-33 könnte daher zukünftig eine sinnvolle Therapieoption der allergischen Rhinitis darstellen.

## 6 Schlussfolgerungen

Weltweit leiden über 500 Millionen Menschen an einer allergischen Rhinitis. Damit ist die allergische Rhinitis eine der häufigsten Erkrankungen überhaupt. Sie kann nicht nur zu einer massiven Einschränkung der Lebensqualität der Betroffenen führen, sondern verursacht auch immense sozioökonomische Kosten (Bousquet, 2008). Entsprechend wichtig ist die Aufklärung der immunologischen Mechanismen der Erkrankung und die aus diesen Erkenntnissen resultierende Entwicklung neuer, gezielter Therapieoptionen.

Eine wesentliche Methode dazu ist die nasale Allergenprovokation. Die nasale Allergenprovokation mit der *Disc*-Methode ermöglichte es, die Früh- und Spätphase der allergischen Reaktion der Nase auszulösen und zu untersuchen. Synchron konnten die klinischen Symptome dokumentiert werden. Dabei konnte unverdünntes Nasensekret gesammelt, die freigesetzten Zytokine gemessen und der zeitliche Verlauf der Freisetzung charakterisiert werden. Somit hat sich die nasale Provokation und das Sammeln von Nasensekret mit der *Disc*-Methode auch in dieser Studie bewährt.

IL-4 und IL-13 nehmen eine zentrale Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung der allergischen Entzündungsreaktion ein. Auch in unserer Studie konnten wir die Freisetzung dieser Zytokine in der Spätphase mit einer signifikanten Erhöhung fünf Stunden nach nasaler Allergenprovokation zeigen. Die Rolle von Eotaxin-3 und IL33/ sST2 in der Pathogenese der allergischen Rhinitis ist bisher wenig untersucht. Erstmals wird mit dieser Arbeit die Freisetzung von Eotaxin-3 in der Spätphase und von sST2 in der Früh- sowie Spätphase in das Nasensekret nach lokaler Allergenprovokation bei Patienten mit allergischer Rhinitis nachgewiesen. Dabei konnten auch die typischen klinischen Reaktionen und physiologischen Änderungen dokumentiert werden.

Obwohl im Serum keine signifikanten Änderungen der Zytokinkonzentration gemessen werden konnten, zeigte sich z.B. bei sST2 ein geringer Anstieg der Zytokinkonzentrationen nach Allergenprovokation. Die nasale Allergenprovokation

könnte also nicht nur zu einer lokalen Symptomatik und Entzündung in der Nase führen, sondern möglicherweise auch auch systemische Reaktionen auslösen.

Insgesamt liefert diese Arbeit einen weiteren Baustein zu einem besseren Verständnis der immunologischen Grundlagen der allergischen Rhinitis. Weitere Studien z.B. mit einer höheren Probandenzahl, sensitiveren *assays* und funktionellen Experimenten können auf diesen Ergebnissen aufbauen und die Rolle der untersuchten Zytokine in der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis weiter entschlüsseln.

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Akdis, Mübeccel; Akdis, Cezmi A (2014): „Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens.“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 133 (3), S. 621–631, DOI: 10.1016/j.jaci.2013.12.1088.
- Akdis, Mübeccel; Burgler, Simone; Cramer, Reto; u. a. (2011): „Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : receptors, functions, and roles in diseases.“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 127 (3), S. 701–710, DOI: 10.1016/j.jaci.2010.11.050.
- Bachert, Claus; Borchard, Ulrich; Wedi, Bettina; u. a. (2006): „Allergische Rhinokonjunktivitis Leitlinie der DGAI in Abstimmung mit der DDG“. In: *JDDG*. 4 (3), S. 264–275, DOI: 10.1111/j.1610-0387.2006.04349.x.
- Berkman, N; Ohnana, S; Chung, F K; u. a. (2001): „Eotaxin-3 but not eotaxin gene expression is upregulated in asthmatics 24 hours after allergen challenge.“. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 24 (6), S. 682–687.
- Bice, Jeffrey B; Leechawengwongs, Evelyn; Montanaro, Anthony (2014): „Biologic targeted therapy in allergic asthma.“. In: *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 112 (2), S. 108–115, DOI: 10.1016/j.anaai.2013.12.013.
- Blanchard, Carine; Durual, Stéphane; Estienne, Monique; u. a. (2005): „Eotaxin-3/CCL26 gene expression in intestinal epithelial cells is up-regulated by interleukin-4 and interleukin-13 via the signal transducer and activator of transcription 6.“. In: *The international journal of biochemistry & cell biology*. 37 (12), S. 2559–2573, DOI: 10.1016/j.biocel.2005.06.010.
- Bousquet, J; Khaltaev, N; Cruz, A A; u. a. (2008): „Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen).“. *Allergy*. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01620.x.
- Bousquet, J; Van Cauwenberge, P; Aït-Khaled, N; u. a. (2006): „Pharmacologic and anti-IgE treatment of allergic rhinitis ARIA update (in collaboration with GA2LEN)“. In: *Allergy*. 61 (9), S. 1086–1096, DOI: 10.1111/j.1398-9995.2006.01144.x.
- Bradding, P; Feather, I H; Wilson, S; u. a. (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.“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 151 (7), S. 3853–3865.

- Broide, David H (2007): „The pathophysiology of allergic rhinoconjunctivitis.“. In: *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies*. 28 (4), S. 398–403, DOI: 10.2500/aap.2007.28.3011.
- Burks, A Wesley; Calderon, Moises A; Casale, Thomas; u. a. (2013): „Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report.“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 131 (5), S. 1288–1296.e3, DOI: 10.1016/j.jaci.2013.01.049.
- Calderon, M A; Penagos, M; Sheikh, A; u. a. (2011): „Sublingual immunotherapy for allergic conjunctivitis: Cochrane systematic review and meta-analysis“. In: *Clinical & Experimental Allergy*. 41 (9), S. 1263–1272, DOI: 10.1111/j.1365-2222.2011.03835.x.
- Chae, Soo-Cheon; Park, Young-Ran; Oh, Gyung-Jae; u. a. (2005): „The suggestive association of eotaxin-2 and eotaxin-3 gene polymorphisms in Korean population with allergic rhinitis.“. In: *Immunogenetics*. 56 (10), S. 760–764, DOI: 10.1007/s00251-004-0746-2.
- Ciprandi, Giorgio; Cirillo, Ignazio; Vizzaccaro, Andrea; u. a. (2004): „Correlation of nasal inflammation and nasal airflow with forced expiratory volume in 1 second in patients with perennial allergic rhinitis and asthma.“. In: *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 93 (6), S. 575–580, DOI: 10.1016/S1081-1206(10)61266-5.
- Ciprandi, Giorgio; Cirillo, Ignazio; Vizzaccaro, Andrea; u. a. (2005): „Desloratadine and levocetirizine improve nasal symptoms, airflow, and allergic inflammation in patients with perennial allergic rhinitis: a pilot study.“. In: *International immunopharmacology*. 5 (13-14), S. 1800–1808, DOI: 10.1016/j.intimp.2005.05.008.
- Compalati, Enrico; Penagos, Martin; Tarantini, Francesco; u. a. (2009): „Specific immunotherapy for respiratory allergy: state of the art according to current meta-analyses“. In: *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 102 (1), S. 22–28, DOI: 10.1016/S1081-1206(10)60103-2.
- Dabbagh, K; Takeyama, K; Lee, H M; u. a. (1999): „IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo.“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 162 (10), S. 6233–6237.
- De Corso, E; Baroni, S; Romitelli, F; u. a. (2011): „Nasal lavage CCL24 levels correlate with eosinophils trafficking and symptoms in chronic sino-nasal eosinophilic inflammation.“. In: *Rhinology*. 49 (2), S. 174–179, DOI: 10.4193/Rhin.
- Dretzke, Janine; Meadows, Angela; Novielli, Nicola; u. a. (2013): „Subcutaneous and sublingual immunotherapy for seasonal allergic rhinitis: A systematic review and indirect comparison.“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 131 (5), S. 1361–1366, DOI: 10.1016/j.jaci.2013.02.013.

- Dulkys, Y; Schramm, G; Kimmig, D; u. a. (2001): „Detection of mRNA for eotaxin-2 and eotaxin-3 in human dermal fibroblasts and their distinct activation profile on human eosinophils.“. In: *The Journal of investigative dermatology*. 116 (4), S. 498–505, DOI: 10.1046/j.1523-1747.2001.01299.x.
- Durham, S R; Ying, S; Varney, V A; u. a. (1992): „Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia.“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 148 (8), S. 2390–2394.
- Durham, Stephen R; Emminger, Waltraud; Kapp, Alexander; u. a. (2010): „Long-term clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet.“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 125 (1), S. 131–8.e1–7, DOI: 10.1016/j.jaci.2009.10.035.
- Elsner, J; Escher, S E; Forssmann, U (2004): „Chemokine receptor antagonists: a novel therapeutic approach in allergic diseases.“. In: *Allergy*. 59 (12), S. 1243–1258, DOI: 10.1111/j.1398-9995.2004.00710.x.
- Erin, E M; Leaker, B R; Zacharasiewicz, A S; u. a. (2005a): „Single dose topical corticosteroid inhibits IL-5 and IL-13 in nasal lavage following grass pollen challenge.“. In: *Allergy*. 60 (12), S. 1524–1529, DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00928.x.
- Erin, E M; Zacharasiewicz, A S; Nicholson, G C; u. a. (2005b): „Topical corticosteroid inhibits interleukin-4, -5 and -13 in nasal secretions following allergen challenge.“. In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 35 (12), S. 1608–1614, DOI: 10.1111/j.1365-2222.2005.02381.x.
- Gergen, P J; Turkeltaub, P C (1991): „The association of allergen skin test reactivity and respiratory disease among whites in the US population. Data from the Second National Health and Nutrition Examination Survey, 1976 to 1980.“. In: *Archives of internal medicine*. 151 (3), S. 487–492.
- Greiner, Alexander N; Hellings, Peter W; Rotiroti, Guiseppina; u. a. (2011a): „Allergic rhinitis.“. In: *Lancet*. 378 (9809), S. 2112–2122, DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60130-X.
- Greiner, Alexander N; Hellings, Peter W; Rotiroti, Guiseppina; u. a. (2011b): „Allergic rhinitis.“. In: *The Lancet*. 378 (9809), S. 2112–2122, DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60130-X.
- Hafez, Shereen F; Sallam, Maha M; Ibraheem, Samer A (2004): „Local expression of IL-4 and IL-5 in perennial allergic rhinitis and their modulation by topical corticosteroid therapy.“. In: *The Egyptian journal of immunology / Egyptian Association of Immunologists*. 11 (1), S. 111–121.
- Hoogerwerf, Jacobien J; Tanck, Michael W T; van Zoelen, Marieke A D; u. a. (2010): „Soluble ST2 plasma concentrations predict mortality in severe

- sepsis.“. In: *Intensive care medicine*. 36 (4), S. 630–637, DOI: 10.1007/s00134-010-1773-0.
- Huggins, K G; Brostoff, J (1975): „Local production of specific IgE antibodies in allergic-rhinitis patients with negative skin tests.“. In: *Lancet*. 2 (7926), S. 148–150.
- Jacobsen, L; Niggemann, B; Dreborg, S; u. a. (2007): „Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study.“. In: *Allergy*. 62 (8), S. 943–948, DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01451.x.
- Kagami, S; Kakinuma, T; Saeki, H; u. a. (2003): „Significant elevation of serum levels of eotaxin-3/CCL26, but not of eotaxin-2/CCL24, in patients with atopic dermatitis: serum eotaxin-3/CCL26 levels reflect the disease activity of atopic dermatitis.“. In: *Clinical and experimental immunology*. 134 (2), S. 309–313.
- Kakkar, Rahul; Hei, Hillary; Dobner, Stephan; u. a. (2012): „Interleukin 33 as a mechanically responsive cytokine secreted by living cells.“. In: *The Journal of biological chemistry*. 287 (9), S. 6941–6948, DOI: 10.1074/jbc.M111.298703.
- Kamekura, R; Kojima, T; Takano, K; u. a. (2012): „The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis.“. In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 42 (2), S. 218–228, DOI: 10.1111/j.1365-2222.2011.03867.x.
- Kiel, Menno A; Röder, Esther; Gerth van Wijk, Roy; u. a. (2013): „Real-life compliance and persistence among users of subcutaneous and sublingual allergen immunotherapy.“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.03.013.
- Kim, Y H; Yang, T Y; Park, C-S; u. a. (2012): „Anti-IL-33 antibody has a therapeutic effect in a murine model of allergic rhinitis.“. In: *Allergy*. 67 (2), S. 183–190, DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02735.x.
- Kitaura, M; Suzuki, N; Imai, T; u. a. (1999): „Molecular cloning of a novel human CC chemokine (Eotaxin-3) that is a functional ligand of CC chemokine receptor 3.“. In: *The Journal of biological chemistry*. 274 (39), S. 27975–27980.
- Kleine-Tebbe, J; Bufe, A; Ebner, C; u. a. (2009): „Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen“. In: *Allergo* ....
- Klimek, L; Pfaar, O (2011): „[Allergic rhinitis. Immunological and neurogenic mechanisms].“. In: *HNO*. 59 (12), S. 1191–1197, DOI: 10.1007/s00106-011-2294-z.

- Komiya, Akiko; Nagase, Hiroyuki; Yamada, Hirokazu; u. a. (2003): „Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells.“. In: *Cellular immunology*. 225 (2), S. 91–100.
- Lack, G (2001): „Pediatric allergic rhinitis and comorbid disorders.“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 108 (1 Suppl), S. S9–15.
- Miyahara, Satoko; Miyahara, Nobuaki; Matsubara, Shigeki; u. a. (2006): „IL-13 is essential to the late-phase response in allergic rhinitis.“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 118 (5), S. 1110–1116, DOI: 10.1016/j.jaci.2006.06.014.
- Mutius, von, E (2010): „99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: farm lifestyles and the hygiene hypothesis.“. In: *Clinical and experimental immunology*. 160 (1), S. 130–135, DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04138.x.
- Mutius, von, Erika; Vercelli, Donata (2010): „Farm living: effects on childhood asthma and allergy.“. In: *Nature reviews. Immunology*. 10 (12), S. 861–868, DOI: 10.1038/nri2871.
- N Franklin Adkinson, Jr; William W Busse, M D; Bochner, Bruce S; u. a. (2008): *Middleton's Allergy: Principles and Practice*. Mosby. — ISBN: 9780323056595
- Nakayama, Takashi; Watanabe, Yoshiko; Oiso, Naoki; u. a. (2010): „Eotaxin-3/CC chemokine ligand 26 is a functional ligand for CX3CR1.“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 185 (11), S. 6472–6479, DOI: 10.4049/jimmunol.0904126.
- Nathan, Robert A (2007): „The burden of allergic rhinitis.“. In: *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies*. 28 (1), S. 3–9.
- Nickelsen, J A; Georgitis, J W; Reisman, R E (1986): „Lack of correlation between titers of serum allergen-specific IgE and symptoms in untreated patients with seasonal allergic rhinitis.“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 77 (1 Pt 1), S. 43–48.
- Ogilvie, P; Bardi, G; Clark-Lewis, I; u. a. (2001): „Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5.“. In: *Blood*. 97 (7), S. 1920–1924.
- Ogilvie, Patricia; Paoletti, Samantha; Clark-Lewis, Ian; u. a. (2003): „Eotaxin-3 is a natural antagonist for CCR2 and exerts a repulsive effect on human monocytes.“. In: *Blood*. 102 (3), S. 789–794, DOI: 10.1182/blood-2002-09-2773.
- Oshikawa, K; Kuroiwa, K; Tago, K; u. a. (2001): „Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation.“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine*. 164 (2), S. 277–281.

- Oshikawa, K; Yanagisawa, K; Tominaga, S; u. a. (2002): „Expression and function of the ST2 gene in a murine model of allergic airway inflammation“. In: *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 32 (10), S. 1520–1526, DOI: 10.1046/j.1365-2745.2002.01494.x.
- Parenica, Jiri; Malaska, Jan; Jarkovsky, Jiri; u. a. (2012): „Soluble ST2 levels in patients with cardiogenic and septic shock are not predictors of mortality.“. In: *Experimental and clinical cardiology*. 17 (4), S. 205–209.
- Pawankar, R U; Okuda, M; Hasegawa, S; u. a. (1995): „Interleukin-13 expression in the nasal mucosa of perennial allergic rhinitis.“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine*. 152 (6 Pt 1), S. 2059–2067.
- Pecaric-Petkovic, Tatjana; Didichenko, Svetlana A; Kaempfer, Sacha; u. a. (2009): „Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33.“. In: *Blood*. 113 (7), S. 1526–1534, DOI: 10.1182/blood-2008-05-157818.
- Petkovic, Vibor; Moghini, Christian; Paoletti, Samantha; u. a. (2004): „Eotaxin-3/CCL26 is a natural antagonist for CC chemokine receptors 1 and 5. A human chemokine with a regulatory role.“. In: *The Journal of biological chemistry*. 279 (22), S. 23357–23363, DOI: 10.1074/jbc.M309283200.
- Poulsen, Lars K; Hummelshoj, Lone (2007): „Triggers of IgE class switching and allergy development.“. In: *Annals of medicine*. 39 (6), S. 440–456, DOI: 10.1080/07853890701449354.
- Préfontaine, David; Lajoie-Kadoch, Stéphane; Foley, Susan; u. a. (2009): „Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells.“. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 183 (8), S. 5094–5103, DOI: 10.4049/jimmunol.0802387.
- Probst, Rudolf; Grevers, Gerhard; Iro, Heinrich (2008): *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. Georg Thieme Verlag. — ISBN: 9783131521231
- Renz, H; Biedermann, T; Bufe, A; u. a. (2010): „In-vitro-Allergiediagnostik“. In: *Allergo J*.
- Riechelmann, H; Bachert, C; Goldschmidt, O; u. a. (2003): „Application of the Nasal Provocation Test on Diseases of the Upper Airways“. In: *Laryngo-Rhino-Otologie*. 82 (3), S. 183–188, DOI: 10.1055/s-2003-38411.
- Rondón, C; Campo, P; Galindo, L; u. a. (2012a): „Prevalence and clinical relevance of local allergic rhinitis.“. In: *Allergy*. 67 (10), S. 1282–1288, DOI: 10.1111/all.12002.
- Rondón, Carmen; Campo, Paloma; Togias, Alkis; u. a. (2012b): „Local allergic rhinitis: concept, pathophysiology, and management.“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 129 (6), S. 1460–1467, DOI: 10.1016/j.jaci.2012.02.032.

- Ruëff, F; Bergmann, K C; Brockow, K; u. a. (2010): „Hauttests zur Diagnostik von allergischen Soforttyp-Reaktionen“. In: *Allergo* ....
- Sahlander, Karin; Larsson, Kjell; Palmberg, Lena (2010): „Increased serum levels of soluble ST2 in birch pollen atopics and individuals working in laboratory animal facilities.“. In: *Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine*. 52 (2), S. 214–218, DOI: 10.1097/JOM.0b013e3181d09868.
- Semik-Orzech, Aleksandra; Barczyk, Adam; Wiaderkiewicz, Ryszard; u. a. (2011): „Eotaxin, but not IL-8, is increased in upper and lower airways of allergic rhinitis subjects after nasal allergen challenge.“. In: *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies*. 32 (3), S. 230–238, DOI: 10.2500/aap.2011.32.3435.
- Shimizu, M; Matsuda, A; Yanagisawa, K (2005): „Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis“. In: *Human molecular* ....
- Stone, Kelly D; Prussin, Calman; Metcalfe, Dean D (2010): „IgE, mast cells, basophils, and eosinophils.“. In: *The Journal of allergy and clinical immunology*. 125 (2 Suppl 2), S. S73–80, DOI: 10.1016/j.jaci.2009.11.017.
- Theoharides, Theoharis C; Kempuraj, Duraisamy; Tagen, Michael; u. a. (2007): „Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation.“. In: *Immunological reviews*. 217, S. 65–78, DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00519.x.
- Togias, Alkis (2000): „Unique mechanistic features of allergic rhinitis“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 105 (6), S. S599–S604, DOI: 10.1067/mai.2000.106885.
- Turner, H; Kinet, J P (1999): „Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI.“. In: *Nature*. 402 (6760 Suppl), S. B24–30.
- Wagenmann, M; Baroody, F M; Cheng, C C; u. a. (1997): „Bilateral increases in histamine after unilateral nasal allergen challenge.“. In: *American journal of respiratory and critical care medicine*. 155 (2), S. 426–431, DOI: 10.1164/ajrccm.155.2.9032173.
- Wagenmann, M; Schumacher, L; Bachert, C (2005): „The time course of the bilateral release of cytokines and mediators after unilateral nasal allergen challenge.“. In: *Allergy*. 60 (9), S. 1132–1138, DOI: 10.1111/j.1398-9995.2005.00867.x.
- Wills-Karp, Marsha; Finkelman, Fred D (2008): „Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways.“. In: *Science signaling*. 1 (51), S. pe55, DOI: 10.1126/scisignal.1.51.pe55.
- Wright, A L; Holberg, C J; Martinez, F D; u. a. (1994): „Epidemiology of physician-diagnosed allergic rhinitis in childhood.“. In: *Pediatrics*. 94 (6 Pt 1), S. 895–901.

# 8 Anhang

## 8.1 Allergie-Fragebogen



Universitätsklinikum Düsseldorf

Allergie-Sprechstunde

Leiter Priv.-Doz. Dr. M. Wagenmann

Hals-, Nasen- und Ohrenklinik

Direktor der Klinik Univ.-Prof. Dr. Jörg Schipper

Patientenetikett

### Allergie-Fragebogen

Arzt:

Datum:

#### Aktuelle Beschwerden (Bitte ankreuzen)

Beschwerden	keine	gering	mäßig	schwer
Verstopfte Nase				
Nasenlaufen				
Schleimbildung im Rachen, Hals				
Niesreiz (Niesanfälle)				
Juckreiz in der Nase				
Rötung, Juckreiz der Augen				
Augentränen				
Husten, Reizhusten				
Asthma, Atemnot, schweres				
Juckreiz an Lippen, Rachen,				
Hautausschlag, Neurodermitis				

Seit wie vielen Jahren bestehen die Symptome? \_\_\_\_\_ Jahre

Zu welcher Tageszeit haben Sie Beschwerden?  nachts  tagsüber

Zu welcher Jahreszeit haben Sie Beschwerden? (Bitte einkreisen):

Jan----Feb----März----Apr----Mai----Juni----Juli----Aug----Sept----Okt----Nov----Dez

Wie häufig haben Sie Beschwerden?  an weniger als 4 Tagen/Woche  an mehr als 4 Tagen/Woche

an weniger als 4 Wochen/Jahr  an mehr als 4 Wochen/Jahr

Haben Sie an bestimmten Orten Beschwerden?

---

Bitte kreuzen Sie im Folgenden das Zutreffende an und schreiben Sie genauere Angaben auf:

Unverträglichkeit von Medikamenten:  Nein  Ja (falls ja, welche?):  
\_\_\_\_\_

Unverträglichkeit von Aspirin:  Nein  Ja

Unverträglichkeit von Lebensmitteln:  Nein  Ja (falls ja, welche?):  
\_\_\_\_\_

Aufgetretene Beschwerden bei obengenannten Unverträglichkeiten?  
\_\_\_\_\_

Welche Medikamente nehmen Sie regelmäßig ein?  
\_\_\_\_\_

Frühere Operationen an der Nase oder den Nasennebenhöhlen?  Nein  Ja (falls ja, welche?):  
\_\_\_\_\_

Wurde früher bereits ein Allergietest durchgeführt:  Nein  Ja (Zeitpunkt):  
\_\_\_\_\_

Welche Allergien wurden früher festgestellt?  
\_\_\_\_\_

Wurde Ihre Allergie bereits mit folgenden Mitteln behandelt?

Nasenspray:  Nein  Ja

Antihistaminika (antiallergische Tabletten):  Nein  Ja

Hyposensibilisierung („Allergieimpfung“, -spritze):  Nein  Ja Zeitdauer: \_\_\_\_\_Jahre

Haben sich Ihre Beschwerden durch diese Behandlung gebessert?  Nein  Ja

### Frühere Beschwerden:

Waren in Ihrer Kindheit bereits folgende Erkrankungen bekannt?

Allergien:  Nein  Ja

Asthma:  Nein  Ja

Hauterkrankungen:  Nein  Ja

Folgende Behandlung hat stattgefunden:

---

### Haben Blutsverwandte (Eltern, Geschwister, Großeltern) von Ihnen eine der folgenden Beschwerden?

Allergien  Nein  Ja (Wer, welche?)

---

Asthma:  Nein  Ja (Wer?)

---

Hauterkrankungen  Nein  Ja (z.B. Neurodermitis, Wer?)

---

### Informationen zu Ihrer Wohnsituation:

Haustiere:  Nein  Ja Welche? (z.B. Hund): \_\_\_\_\_

Teppichboden:  Nein  Ja Zimmer (z.B. Schlafzimmer): \_\_\_\_\_

Kübelpflanzen:  Nein  Ja Zimmer (z.B. Wohnzimmer): \_\_\_\_\_

Feuchte Stellen, Schimmel:  Nein  Ja Zimmer (z.B. Badezimmer) \_\_\_\_\_

### Teilen Sie uns mit, was Sie zusätzlich für wichtig zur Abklärung Ihrer Allergie halten:

---

---

---

---

## 8.2 Prick-Testbogen

**Universitätsklinikum Düsseldorf**  
 Moorenstraße 5  
 40225 Düsseldorf  
 Tel.: 0211/811-7582  
**HNO-Klinik**  
**Direktor: Prof. Dr. J. Schipper**  
**Allergieambulanz**

Datum: \_\_\_\_\_

Untersucher: \_\_\_\_\_

	Prick
1	NaCL
2	Histamin
3	Gräser
4	Bäume I
5	Bäume II
6	Pilze I
7	Pilze II
8	Roggen
9	Birke
10	Hasel
11	Erlen
12	Wegerich
13	Beifuß
14	Brennnessel
15	Ragweed
16	Katze
17	Hund
18	Alternaria
19	Cladosporium
20	Aspergillus
21	Penicillium
22	D. farinae
23	D. pteron.
24	Lepidoglyphus d.
25	Acarus siro
26	Tyrophagus p.
27	
28	
29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	

	Scratch
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	

Beurteilung	Prick (mm Ø)	
	Quaddel	Erythem
Ø	Ø	<3
+	2-3	3-5
++	3	6-10
+++	4-6	11-20
++++	>6	>20
	Pseudopodien	

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift