

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus

In-vitro Diagnostik der Nase. Ein Methodenvergleich  
anhand chronisch nasaler Erkrankungen

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Andreas Simon Bernt  
aus München  
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias F. Kramer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Przybilla  
Prof. Dr. Andreas Leunig

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2014

Meiner Mutter



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	S. 03
1.1.	<b>Anatomie und Physiologie der Nase und Nasennebenhöhlen</b>	S. 03
1.2.	<b>Häufige chronisch entzündliche Erkrankungen der Nase und Nasennebenhöhlen</b>	S. 06
1.2.1.	Chronische Rhinosinusitis (CRS)	S. 07
1.2.2.	Polyposis nasi et sinuum	S. 10
1.2.3.	Allergische Rhinitis	S. 15
1.3.	<b>Zielsetzung der Studie</b>	S. 18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	S. 21
2.1.	<b>Studienaufbau</b>	S. 21
2.1.1.	Patientenkollektiv und Kriterien	S. 21
2.1.2.	Gruppen	S. 21
2.2.	<b>Diagnostik</b>	S. 22
2.2.1.	Fragebogen	S. 22
2.2.2.	Blutentnahme	S. 23
2.2.3.	Nasensekretgewinnung	S. 24
2.2.4.	Cytobrush und Cytospin	S. 24
2.2.5.	Weiterführende Diagnostik	S. 27
2.3.	<b>Immunzytochemische Aufarbeitung der Cytobrush-Präparate</b>	S. 28
2.4.	<b>Immunzytochemische Doppelfärbung</b>	S. 36
2.5.	<b>Auswertung der Cytobrush-Präparate</b>	S. 38
2.6.	<b>Statistik</b>	S. 40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	S. 41
3.1.	<b>Alters- und Geschlechterverteilung</b>	S. 41
3.2.	<b>Systemische in-vitro Parameter</b>	S. 42

3.2.1. Eosinophile Granulozyten im Blut.....	S. 42
3.2.2. Gesamt IgE im Serum .....	S. 43
<b>3.3. Lokale in-vitro Parameter .....</b>	<b>S. 45</b>
3.3.1. ECP im Nasensekret .....	S. 45
3.3.2. Tryptase im Nasensekret.....	S. 46
<b>3.4. Immunzytochemische Einzelfärbung .....</b>	<b>S. 48</b>
3.4.1. Eosinophile Granulozyten im Cytobrush.....	S. 48
3.4.2. Mastzellen im Cytobrush .....	S. 51
<b>3.5. Korrelation.....</b>	<b>S. 55</b>
<b>3.6. Immunzytochemische Doppelfärbung .....</b>	<b>S. 56</b>
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>S. 63</b>
<b>4.1. Diskussion der Methodik .....</b>	<b>S. 63</b>
4.1.1. Gruppeneinteilung .....	S. 63
4.1.2. Materialgewinnung .....	S. 65
4.1.3. Zytologische Färbemethoden .....	S. 71
<b>4.2. Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>S. 72</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>S. 81</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>S. 85</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>S. 87</b>
<b>8 Danksagung .....</b>	<b>S. 99</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie und Physiologie der Nase und Nasennebenhöhlen

Die Nase ist ein zentraler Bestandteil des menschlichen Gesichts und wird anatomisch in die äußere und innere Nase unterteilt. Die äußere Nase wird proximal von der knöchernen Nasenpyramide gebildet, die aus dem Pars nasalis des Os frontale, dem Processus frontalis maxillae, dem Vomer und dem Os nasale selbst besteht (Putz R., 2000). Distal angrenzend an diese Knochen besteht das Gerüst aus mehreren hyalinen Nasenknorpeln, die damit die äußere Form der Nasenflügel bis zur Nasenspitze vorgeben (Waldeyer, 2003). Der größte Anteil des Nasenrückens wird dabei von den paarig angelegten Seitenknorpeln (Cartilagine nasi laterales) gebildet, die der Nasenscheidewand, dem Septum nasi, dachähnlich von der Seite aufliegen. Kleinere Knorpel, die Cartilagine alares minores und Cartilagine nasales accessoriae tragen zur äußeren Formstabilität der Nase bei. Das Septum teilt die Nase in zwei anatomische wie funktionelle Einheiten, die Cavitas nasi, die vorne mit dem Vestibulum nasi beginnt und in den Choanen endet. Die Nasenhaupthöhle wird wiederum durch jeweils drei lateral hineinragende Nasenmuscheln, die Concha nasi inferior, media und superior, in kleinere Kompartimente unterteilt. Die Nasenmuscheln dienen der Oberflächenvergrößerung und Kanalisierung des Luftstroms in den Nasengängen.

Mit Ausnahme des Vestibulum nasi, in dem verhornendes Plattenepithel vorhanden ist, findet sich in der gesamten Nasenhaupthöhle einschließlich des Nasopharynx und der Nasennebenhöhlen respiratorisches Flimmerepithel. Die Schleimhaut der Nasenmuscheln besitzt außerdem ein dichtes Netz an Blutkapillaren, das einen so genannten Venenplexus bildet. Dadurch kann die Schleimhaut in diesen Bereichen besonders stark anschwellen und so auch den Luftstrom regulieren bzw. blockieren. Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Befeuchtung und Erwärmung der einströmenden Luft sowie bei der Zuführung eines Luftanteils zu der weit kranial an der Lamina cribrosa gelegenen Regio olfactoria, der Riechschleimhaut. In diesem Areal finden sich die eigentlichen Riechzellen, die von Stützzellen und den Bowman-Drüsen umgeben sind. Das von

den Drüsen abgesonderte Sekret dient hierbei sowohl als Solvens für Riechstoffe als auch der Reinigung (Schiebler T., 2003).

Weitere Aufgaben erfüllt die Nase als Resonanzraum, als erste Instanz der Infektabwehr und durch ihre Klima- und Filterfunktion. Die im Vestibulum befindlichen Nasenhaare, die Vibrissen sowie das respiratorische Flimmerepithel dienen der Reinigung der Luft, indem sie den Einstrom von Partikeln wie Pollen und Staub in die unteren Atemwege und Lunge reduzieren, was auch bei der allergischen Rhinitis eine entscheidende Rolle spielt.

Die Nasennebenhöhlen sind ein sehr komplex aufgebautes Hohlraumsystem, das individuell sehr verschieden ausgeprägt sein kann. Die verschiedenen Hohlräume - auch Sinus genannt - stehen über die Ostien mit der Nasenhaupthöhle in Verbindung. Die Ostien sind nötig, um eine Luftzirkulation und die Möglichkeit eines Sekretabflusses zur Reinigung sicherzustellen. Die Sinus maxillaris, frontalis und die vorderen Siebbeinzellen münden allesamt im Hiatus semilunaris am vorderen Ende der mittleren Nasenmuschel. Diese Mündungsstelle wird durch den Processus uncinatus des Os ethmoidale verdeckt und dadurch noch weiter eingengt. Der Bereich, bestehend aus den Ostien und dem mittleren Nasengang, wird als eine funktionelle Einheit angesehen und als osteomeataler Komplex bezeichnet. Er wird als Ausgangspunkt für verschiedene Erkrankungen wie beispielsweise der Polyposis nasi gesehen. In den Bereich des unteren Nasengangs mündet außerdem der Ductus nasolacimalis, der überschüssige Tränenflüssigkeit vom Auge über die Nase ableitet. Im Bereich des oberen Nasengangs befinden sich die Ostien der hinteren Siebbeinzellen und des Sinus sphenoidalis.

Die Nasenschleimhaut wird sensibel von Ästen des N. trigeminus, dem N. ophthalmicus im ventralen Bereich und dem N. maxillaris im dorsalen Bereich versorgt. Diese afferenten Nerven vermitteln die allseits bekannten Symptome bei Infektionen der oberen Atemwege, wie Juckreiz und Niesreiz (Nishino, 2000; Songu, 2009). Die sekretorische Steuerung der Glandulae nasales erfolgt über sympathische und parasympathische Fasern des vegetativen Nervensystems. Die parasympathischen, sekretionsfördernden Impulse gelangen über den N. facialis und den N. petrosus major in das Ganglion pterygopalatinum und von dort zur Nasenschleimhaut. Sekretionshemmende, sympathische Informationen gelangen

vom Plexus caroticus internus über den N. petrosus profundus in die Fossa pterygoidea und von dort zur Nasenschleimhaut (Trepel, 2004).

Die arterielle Blutversorgung der Nase wird hauptsächlich aus der A. sphenopalatina und der A. palatina descendens, die beide der A. maxillaris entstammen, sichergestellt. Letztere entstammt dem Stromgebiet der A. carotis externa. Zusätzlich bezieht die Nase arterielles Blut aus dem Stromgebiet der A. carotis interna über die A. ophthalmica. Dieser entspringen die Aa. ethmoidales anterior und posterior. Während die A. ethmoidalis anterior mit ihren Ästen den ventralen Bereich der Nase versorgt und im Bereich des Locus Kiesselbachii mit dem Stromgebiet der A. carotis externa anastomosiert, versorgt die A. ethmoidalis posterior hauptsächlich die Nasennebenhöhlen.

Arterien und Venen werden ebenfalls durch die genannten vegetativen Nervenfasern versorgt und haben deswegen auch einen entscheidenden Einfluss auf die Blutzufuhr und damit auf das An- bzw. Abschwellen der Schleimhaut in der Nase. Dieses Zusammenwirken spielt auch beim sog. 'Nasenzzyklus' eine wichtige Rolle. Dabei schwellen die Schleimhautareale im Bereich der Nasenmuscheln unwillkürlich wechselseitig an bzw. ab und geben damit der Schleimhaut der jeweils 'zugeschwollenen' Seite eine bessere Möglichkeit der Regeneration, da sowohl der Luftstrom als auch der Flüssigkeitsverlust abnimmt. Diese Beobachtung wurde erstmals von Richard Kayser beschrieben (Kayser, 1895). Der eigentliche Begriff des 'Nasenzzyklus' entstand jedoch erst später. Die Existenz dieses wiederkehrenden Zyklus ist allerdings durchaus umstritten. Vielmehr wird daher von spontanen, physiologischen Schleimhautveränderungen und dem daraus resultierenden Flow gesprochen (Eccles, 2000; Gilbert & Rosenwasser, 1987).

Eine weitere entscheidende Funktion kommt dem Epithel mit der Reinigung der Luft zu. Es besteht, wie oben bereits erwähnt, aus einem mehrreihigen hochprismatischen Flimmerepithel. Am apikalen Pol der Zelle befinden sich die Kinozilien, die aktive Bewegungen ausführen können. Diese bestehen aus Paaren von Mikrotubuli, die kreisförmig um ein zentrales Paar angeordnet sind. Die Kinozilien der einzelnen Zellen sind in der Lage, synchronisierte Aktionen im Sinne von Wellenbewegungen auszuführen. Hierdurch kann ein gerichteter Abtransport von Schleim und den darin enthaltenen Fremdkörpern, wie z.B. Pollen oder Staub

erfolgen. Entscheidend ist diese Fähigkeit beispielsweise in den Nasennebenhöhlen, da das Ostium hier oft nicht am tiefsten Punkt liegt und der Transport gegen die Schwerkraft erfolgen muss. Der Abtransport in der Nasenhaupthöhle erfolgt dabei in Richtung Ostien und weiter Richtung Choanen und wird als mukoziliäre Clearance bezeichnet. Neben der rein mechanischen Reinigungsfunktion kommt dem Epithel laut neuerer Forschung auch eine sensorische Funktion zu. Offenbar exprimieren diese Zellen Bitterrezeptoren, die über einen komplexen Mechanismus die Aktivität erhöhen können und so eine direkte Reaktion auf äußere Reize zeigen (Braun, T., Mack & Kramer, 2011; Shah, Ben-Shahar, Moninger, Kline & Welsh, 2009).

Neben den zilien-tragenden Epithelzellen durchsetzen zahlreiche Becherzellen das Epithel. Zahlenmäßig ist etwa jede fünfte bis sechste Zelle des Epithels eine Becherzelle, was einen nicht unerheblichen Anteil ausmacht. Die Becherzellen produzieren und sezernieren Schleim mittels Exozytose und sorgen auf diese Weise ebenso für die notwendige Befeuchtung wie auch für eine Schutzschicht des Epithels.

## **1.2 Häufige chronisch entzündliche Erkrankungen der Nase und Nasennebenhöhlen**

Die Rhinitis bezeichnet eine Entzündung der Nasenschleimhaut und stellt ein sehr häufiges Erkrankungsbild dar. Definitionsgemäß müssen dabei typische Symptome wie Rhinorrhoe, Niesreiz und nasale Verstopfung an mindestens zwei aufeinanderfolgenden Tagen auftreten (Bousquet et al., 2008). Die unterschiedlichen Formen der Rhinitis zeigen oft klinisch eine ähnliche Symptomatik und auch einen sehr ähnlichen Verlauf und sind daher nicht immer auf den ersten Blick zu unterscheiden. Es gibt eine ganze Reihe verschiedener Entzündungsformen der Nase und Nasennebenhöhlen, allerdings möchte ich mich nachfolgend auf die drei häufigsten chronischen Krankheitsbilder beschränken.

### 1.2.1 Chronische Rhinosinusitis (CRS)

Die Rhinosinusitis ist eine der häufigsten entzündlichen Erkrankungen der Schleimhäute des Nasen- und Rachenraumes. Bei Kindern entsteht eine akute Sinusitis aus etwa 5-10% der Rhinitiden (Wald, 1996). Von Juli 2000 bis Juni 2001 wurden in Deutschland über 6 Millionen akute und über 2,5 Millionen chronische Sinusitisfälle diagnostiziert (Quelle: IMS HEALTH 2001, Frankfurt). Daraus ergeben sich über 8,5 Millionen Fälle pro Jahr allein für Deutschland. In den USA zeigen Studien vergleichbar hohe Prävalenzen, denen zufolge rund 14% der amerikanischen Bevölkerung im Jahr an einer Sinusitis erkranken (Kaliner, M., 1998). In den USA steht die CRS mit jährlich 37 Millionen Betroffenen damit an der Spitze der häufigsten chronischen Erkrankungen (Braun, H. et al., 2003). Die Zahlen der Rhinitiden - die meist einer Sinusitis vorausgehen - sind noch eindrucksvoller: Geschätzte 1 Milliarde Erkrankungsfälle gibt es pro Jahr in den USA, und amerikanische Schulkinder verpassen aufgrund dieser Tatsache jährlich etwa 22 Millionen Schultage (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2004). Im Jahr 1996 mussten in den USA allein für das Krankheitsbild der Sinusitis als Primärdiagnose etwa \$ 3,4 Milliarden aufgewendet werden; rechnet man die Kosten der Begleit- bzw. Folgeerkrankungen, wie z.B. eine Otitis media hinzu, so stiegen die Kosten auf nahezu \$ 5,8 Milliarden (Ray et al., 1999).

Eine Bezeichnung als Rhinosinusitis ist dabei zutreffender als der allgemein übliche Terminus Sinusitis, da eine Infektion aufgrund der Anatomie selten nur eine oder mehrere Sinus, sondern vielmehr auch die Nasenhaupthöhle betrifft oder gar von ihr ausgeht (Kaliner, M. A. et al., 1997). Entgegen der allgemeinen Auffassung lässt sich auch schon oft bei einer alleinigen Rhinitis eine Infektionsbeteiligung einer oder mehrerer Sinus nachweisen (Gwaltney, Phillips, Miller & Riker, 1994; Van Cauwenberge, Ingels, Bachert & Wang, 1997). Damit scheint eine strikte Trennung nicht sinnvoll und der Übergang einer Rhinitis in eine Rhinosinusitis ist als fließend anzusehen (Van Crombruggen, Van Bruaene, Holtappels & Bachert, 2010). Seit der EP<sup>3</sup>OS-Studie (European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps) im Jahr 2007 gilt somit der Terminus 'Rhinosinusitis' als wissenschaftlich aktuelle Bezeichnung (Fokkens, Lund & Mullol, 2007a).

Rhinosinuitiden werden in akute, akut rezidivierende und chronische Verläufe unterteilt (Bousquet, Van Cauwenberge & Khaltaev, 2001). Bestehen die typischen Symptome wie Rhinorrhoe, postnasal-drip, Husten, Fieber und Kopfschmerzen weniger als 8 Wochen mit max. 3-4 Episoden im Jahr, spricht man von einer akuten Rhinosinusitis. Bestehen die Beschwerden dagegen länger oder häufiger ohne vollständige Beschwerdefreiheit zwischen den Erkrankungsepisoden, geht man von einer chronischen Rhinosinusitis aus (Lund & Kennedy, 1995). Als akut rezidivierende Sinusitiden bezeichnet man mehr als 4 akute Episoden im Jahr, allerdings nur bei jeweils vollständiger Symptomrückbildung.

Auslöser einer Rhinosinusitis ist oftmals ein banaler viraler Infekt (Rhinitis oder Schnupfen), der die Nasenschleimhäute anschwellen lässt und mit einer gesteigerten Sekretproduktion sowie Nies- und Juckreiz einhergeht. Wird die Infektion einer Rhinitis in die Nasennebenhöhlen fortgeleitet, führt dies auch dort zu gesteigerter Sekretproduktion. Die Schleimhautschwellungen - oft auch in Kombination mit anatomischen Anomalien - behindern den Sekretabfluss aus den Nasennebenhöhlen. Der entstehende Sekretrückstau in die Nasennebenhöhlen begünstigt eine bakterielle Superinfektion dieser Areale und führt anschließend zu einer eitrigen Entzündung (Boenninghaus, 2005). Die vorherrschenden klinischen Symptome sind vor allem eine behinderte Nasenatmung, postnasal-drip und eine eitrige Rhinorrhoe. Etwa die Hälfte der Patienten klagt außerdem über Kopfschmerzen, wohingegen nur etwa ein Drittel Hustenreiz oder eine Hyposmie bzw. eine Anosmie angibt (Kaliner, M., 1997). Bei einem Übergang einer Rhinosinusitis in eine CRS spielen eine ganze Reihe von Faktoren eine Rolle. Durch die ablaufende und fortbestehende Entzündungsreaktion kommt es zur Freisetzung von zahlreichen Entzündungsmediatoren hauptsächlich durch Leukozyten, die wiederum das Einwandern weiterer Entzündungszellen in das Gewebe begünstigen. Da die neu eingewanderten Leukozyten ebenfalls Entzündungsmediatoren freisetzen, kommt es zu einem selbsterhaltenden Kreislauf (Rice, 2004). Neben der Einwanderung weiterer Zellen des Immunsystems haben diese Mediatoren auch einen positiven Einfluss auf die Überlebenszeit der Leukozyten und auch auf den mukoziliären Abtransport.

Besonders die Entzündungsmediatoren eosinophiler Granulozyten können zu Ziliostase führen und damit den Abtransport des Sekrets nachhaltig negativ beeinflussen (Kaliner, M. A. et al., 1997). Daraus ergibt sich ein eindickendes Sekret in Verbindung mit einer weiteren Schädigung der Schleimhaut. Diese hypertrophiert und vermindert so zusätzlich die Belüftung. Schließlich endet dieser sich selbst steigernde Prozess in einer CRS mit den typischen Symptomen eines Sekretstaus, einer chronischen Entzündungsreaktion und der dauerhaften Störung des mukoziliären Abtransports. Weitere begünstigende Faktoren stellen anatomische Anomalien dar, wie Nasenseptumdeviationen oder auch eine Concha bullosa (luftgefüllte Nasenmuschel). Diese können vor allem in dem engen Bereich des mittleren Nasenganges die Belüftung der Nasennebenhöhlen zusätzlich behindern. Daher wird der osteomeatale Komplex als kritischer Bereich bei der Entstehung der CRS angesehen (Slavin et al., 2005).

Die CRS wird oft in Verbindung mit verschiedenen anderen Erkrankungen gebracht, wie z.B. der Otitis media, der allergischen Rhinitis und dem Asthma bronchiale. Besonders die beiden zuletzt genannten Erkrankungen werden sehr häufig bei einer CRS beobachtet (Kaliner, M., 1997). Da die Häufigkeit der assoziierten Erkrankungen sehr hoch ist, sollten diese bei der Behandlung mit einbezogen werden.

Im klinischen Alltag ist aufgrund der oft ähnlichen Symptomatik eine Abgrenzung zu anderen Krankheitsbildern vielfach schwierig (Bhattacharyya, 2005). Die Genese der CRS wird als multifaktoriell angesehen und ist daher nicht immer einfach zu diagnostizieren. Auch aufgrund von CT- Scans kann oft keine eindeutige Diagnose gestellt werden; vielmehr sind den Symptomen, dem Erkrankungsverlauf und den klinischen Untersuchungen gleichermaßen Aufmerksamkeit zu schenken (Stewart & Johnson, 2004).

## 1.2.2 Polyposis nasi et sinuum

Die CRS wird laut gängiger Klassifikation in eine CRS mit nasaler Polyposis (CRS<sub>NP</sub>) und eine ohne (CRS, oft auch CRS<sub>NP</sub>) unterteilt. Damit wäre die Polyposis nasi definitionsgemäß eine Unterform der CRS (Baraniuk & Maibach, 2005; Meltzer et al., 2004). Allerdings ist diese Sichtweise durchaus umstritten, da einzig die ähnliche Symptomatik auf eine enge Verbindung schließen lässt. So weisen einige Studien darauf hin, dass die Polyposis nasi eher als eine eigenständige Erkrankung anzusehen ist (Hosemann, Gode & Wagner, 1994; Jankowski, Bouchoua, Coffinet & Vignaud, 2002; Polzehl, Moeller, Riechelmann & Perner, 2006; Rudack, Sachse & Alberty, 2004).

Die Diagnose Polyposis nasi ist zwar weitaus seltener als die der CRS, wurde aber laut dem IMS Health in Frankfurt (2001) über 220.000 mal pro Jahr in Deutschland gestellt. In den USA und Finnland wird die Inzidenz mit 1% bis 4,3% der Gesamtbevölkerung angegeben (Hedman, Kaprio, Poussa & Nieminen, 1999; Michaels & Hellquist, 2001; Settipane & Chafee, 1977). Dabei ist das männliche Geschlecht im Verhältnis von etwa 3:1 deutlich häufiger betroffen als das weibliche (Drake-Lee, Lowe, Swanston & Grace, 1984).

Klinisch imponiert die Polyposis nasi durch semitransparente, wässrige, weiß-glasige Wucherungen der Schleimhaut von Nase und Nasennebenhöhlen. Die Gewebsvermehrungen werden als gutartige Geschwülste der Schleimhaut angesehen, wobei sie eine verminderte Vaskularisation und Innervation aufweisen und dadurch ihr charakteristisches Aussehen erhalten (Lund, 1995; Mygind, 1990). Grundsätzlich können Nasenpolypen nahezu im gesamten Nasenraum auftreten. Eine eindeutige Lokalisation der erkrankten Schleimhaut ist daher nicht sicher zu bestimmen, allerdings ist die laterale Nasenwand im Bereich des mittleren Nasenganges und besonders der Bereich des osteomeatalen Komplexes der Ort des häufigsten Auftretens von Nasenpolypen (Larsen, Tinggaard, Harcourt, Sofsrud & Tos, 1998; Larsen & Tos, 1991, 2004; Lund, 1995; Stammberger & Posawetz, 1990). Interessanterweise neigt beispielsweise die untere Nasenmuschel kaum zur Ausbildung von Nasenpolypen. Einen plausiblen Erklärungsansatz hierfür gibt es bislang nicht.

Nasenpolypen können sowohl solitär als auch multipel auftreten. Am häufigsten treten sie allerdings als gestielte, traubenförmige, ödematöse Gewebssäcke auf, die in die Nasenhaupthöhle oder - bei ausgeprägtem Befund - sogar in den Nasenrachenraum prolabieren können. Dabei lässt sich das Ausmaß in vier klinische Grade einteilen, die von Rasp et al. beschrieben wurden (Rasp, Kramer, Ostertag & Kastenbauer, 2000). Sinnvoll erscheint eine solche Einteilung sowohl im klinischen Alltag als auch für die Nachsorge betroffener Patienten. Aufgrund der oben beschriebenen Beschaffenheit und der Lokalisation der Nasenpolypen lässt sich auch die Symptomatik leicht erklären. Die häufigsten Beschwerden sind dabei Nasenatmungsbehinderung, postnasal-drip, Rhinorrhoe, Rhinophonia clausa, Kopfschmerzen sowie Störungen des Riechvermögens. Als weitere Folge können - abhängig vom Ausprägungsgrad - zusätzlich Schnarchen und Belüftungsstörungen des Mittelohres auftreten.

Die Ätiologie ist trotz umfangreicher Erforschung der Polyposis nasi bisher nicht aufgeklärt. Dabei wirft vor allem der eigentliche Entstehungsprozess der Polypen noch Fragen auf (Rinia, Kostamo, Ebbens, van Drunen & Fokkens, 2007). Eine erste Problemstellung ergibt sich dabei bereits aus der oben erwähnten Definition, da bisher nicht abschließend geklärt ist, ob und inwiefern die Polyposis nasi ein eigenständiges Krankheitsbild darstellt und ob sich die Erkrankung systemisch erstreckt oder sich nur lokal auf einen Teilbereich der Nase und Nasennebenhöhlen bezieht. Weitgehend Einigkeit besteht in der Literatur hingegen in der Co-Morbidität von Polyposis nasi und einigen systemischen Erkrankungen. So ist die Inzidenz von Nasenpolypen bei Asthma bronchiale, zystischer Fibrose, primärer Ziliendyskinesie und Analgetika-Intoleranz deutlich erhöht. Die genaue Verbindung dieser Krankheitsbilder zur Polyposis nasi ist nicht geklärt, doch gilt dies als sehr wahrscheinlich. Etwa 40% der Patienten mit Polyposis nasi leiden auch an Asthma, wobei die intrinsische Form am häufigsten in Verbindung mit nasalen Polypen beobachtet wird (Bachert et al., 2003). Studien zufolge ist die Prävalenz der Polyposis nasi bei männlichen Asthmatikern über dem 40. Lebensjahr am höchsten (Settipane & Chafee, 1977). Dabei sind nasale Polypen oft erst 10 Jahre nach der Erstdiagnose von Asthma bronchiale festzustellen (Fokkens, Lund & Mullol, 2007b).

Das gleichzeitige Auftreten von Nasenpolypen, Asthma und einer Analgetika-Intoleranz (auch Aspirin- oder ASS-Intoleranz) wird als Samter-Trias bezeichnet. Auch dieser Zusammenhang der drei Krankheitsbilder ist keineswegs eine neue Beobachtung, da sie erstmals 1922 beschrieben wurde (Widal, Abrami & Lermoyez, 1987). Trotzdem ist die genaue Pathophysiologie auch hier bis heute weitgehend unbekannt. Ein Auftreten einer Analgetika-Intoleranz außerhalb der Samter-Trias ist dabei aber weitaus häufiger zu beobachten. Während man in der Allgemeinbevölkerung von einer Inzidenz von etwa 1% ausgeht, liegt die Inzidenz bei Polyposis nasi bei etwa 40% (Hosemann, Kuhnel & Pfeifer, 2000; Kaldenbach et al., 1999; Reiß, 2009; Settupane & Chafee, 1977). Liegt eine nachgewiesene Analgetika-Intoleranz vor, kann eine Polyposis nasi mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden (Gosepath, Hoffmann, Schafer, Amedee & Mann, 1999; May, Wagner, Langenbeck & Weber, 2000; Settupane, 1986). Zum Teil sehr kontroverse Diskussionen gibt es über die Vergesellschaftung der Polyposis nasi mit Allergien bzw. allergischer Rhinitis. So belegen Studien sowohl eine Korrelation zu Allergien als auch zu Asthma bronchiale (Karjalainen et al., 2003; Munoz del Castillo et al., 2009). Allerdings wird dies v.a. in Bezug auf die Allergien von anderen widerlegt (Bachert et al., 2003; Keith et al., 1994; Lund, 1995; Mygind, 1990). Wissenschaftlich lässt sich somit die Entstehung einer Polyposis nasi nicht sicher mit dem allergischen Formenkreis verbinden. Weiterführende Forschung wird nötig sein, um diese fragliche Verbindung zu klären.

Einen klaren Hinweis auf die Grunderkrankung geben dagegen auftretende Nasenpolypen zumeist bei Kindern. Da Nasenpolypen üblicherweise erst im Erwachsenenalter entstehen, werden diese deshalb bei Kindern als direkter Hinweis auf z.B. eine zystische Fibrose (CF) angesehen (Gruyter, 2004; Shwachman, Kulczycki, Mueller & Flake, 1962). Aufgrund eines Defekts des CFTR Gens auf Chromosom 7 wird ein Chloridionen-Kanal falsch gebildet. Dies führt zu gestörter Produktion von hochviskösem Schleim und folglich zu reduziertem mukoziliären Abtransport. Diese Konstellation begünstigt das Entstehen von rezidivierenden Sinusitiden, Polyposis nasi und Bronchitiden. Die Prävalenz von nasalen Polypen bei CF wird mit 40 - 50% angegeben (Rinia et al., 2007).

Ein ähnlicher Zusammenhang zeigt sich bei der primären, ziliären Dyskinesie. Im Unterschied zur CF führt hier ein genetischer Defekt zu fehlgebildeten Kinozilien. Zentraler Bestandteil ist dabei das Motorprotein Dynein, das für die aktiven Bewegungen verantwortlich ist. Aufgrund der Störung ist keine oder nur eine asynchrone, ungerichtete Bewegung möglich, so dass ein gezielter Abtransport des Schleims unmöglich wird. Die Folgen sind ähnlich denen der CF, die zu chronischen Entzündungszuständen der Atemwege und Polyposis nasi führen. Das gleichzeitige Auftreten von Situs inversus, CRS oder Polyposis nasi und gegebenenfalls gestörter Spermienmotilität wird als Kartagener-Syndrom bezeichnet.

Nasendpolypen zeichnen sich histologisch durch Fibrose, eine ödematöse Schwellung des Gewebes bei verdickter Basalmembran und eine überwiegend eosinophile Infiltration aus. Entdeckt wurden die eosinophilen Granulozyten bereits 1879 von Dr. Paul Ehrlich (Ehrlich, 1879). Diese eosinophilen Granulozyten besitzen eine Vielzahl von Granula mit einer ganzen Reihe von zelltoxischen Proteinen, die sie in großen Mengen durch Exozytose freisetzen können. Sie dienen in erster Linie der Abwehr körperfremder Zellen, indem sie deren Zellmembranen zerstören. Ebenso spielen sie eine Rolle in der Parasitenabwehr und im Heilungsprozess von Geweben. Eine besondere Bedeutung haben dabei vor allem die folgenden vier Proteine: das 'Eosinophilic Cathionic Protein' (ECP), das 'Major Basic Protein' (MBP), die Eosinophile Peroxidase (EPO) und das Eosinophile Protein X (EPX), das neuerdings auch 'Eosinophil-Derived Neurotoxin' (EDN) genannt wird. Neben den o.g. zelltoxischen Proteinen besitzen die Granula noch eine Reihe von weiteren Zytokinen und Chemokinen wie Interleukin-5 (IL-5), 'Regulated Upon Activation Normal T-cell Expressed and Presumably Secreted' (RANTES), 'Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor' (GM-CSF) und 'Growth-Related Oncogene  $\alpha$ ' (GRO- $\alpha$ ) (Hamilos et al., 1998; Hao, Pang & Wang, 2006; Hogan et al., 2008; Kroegel, 1992; Simon et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Gewebeeosinophilie dabei mit dem Erkrankungsgrad korreliert. Daher wird das gebildete ECP als zentraler Marker für die Gewebeentzündung herangezogen (Behnecke, Mayr, Schick, Iro & Raithel, 2008). Außerdem geht man davon aus, dass durch die oben genannten Mediatoren und den damit verbundenen Zellschaden vermehrt Wachstumsfaktoren ausgeschüttet werden

und somit ein gesteigerter Zellzyklus induziert wird (Coste et al., 1996). Allen voran scheint das IL-5 eine bedeutende Rolle zu spielen. So soll es dazu beitragen, dass eosinophile Granulozyten aus dem Knochenmark ins Blut freigesetzt werden und in entzündete Gewebe einwandern. Die Migration in Gewebe wird entscheidend vom endothelialen 'Vascular Cell Adhesion Molecule 1' (VCAM-1) gefördert. Dort angekommen zeigen sie aufgrund der vorhandenen Entzündungsmediatoren IL-5, GM-CSF und IL-3 eine gesteigerte Aktivität wie auch eine längere Überlebenszeit durch verzögerte Apoptose. Diese Erkenntnisse und die zentrale Bedeutung von IL-5 zeigen außerdem einen möglichen Ansatzpunkt für eine Therapie auf (Bachert, Gevaert, Holtappels, Cuvelier & van Cauwenberge, 2000; Bachert, Wagenmann, Hauser & Rudack, 1997; Kramer, Ostertag, Pfrogner & Rasp, 2000; Kramer & Rasp, 1999; Stone, Prussin & Metcalfe, 2010). Erste klinische Tests weisen aber darauf hin, dass eine alleinige Intervention mittels eines Anti-IL-5 Antikörpers nicht ausreichend ist, um eine Symptomverbesserung zu erzielen. Es wird eine Beteiligung weiterer Mediatoren vermutet; hier ist vor allem GM-CSF zu nennen (Rinia et al., 2007).

Neben eosinophilen Infiltraten gibt es auch neutrophil dominierte Polypen, die z.B. in Zusammenhang mit einer CF bzw. dem Young- oder Kartagener-Syndrom gesehen werden (Bachert, 2003). Sie sind aber weitaus seltener und haben nur einen geringen prozentualen Anteil. Die eosinophilen Polypen dagegen haben einen Anteil von etwa 70-90% an den Nasenpolypen .

Neben den Granulozyten-Ansammlungen lassen sich auch zahlreiche Mastzellen und deren freigesetztes Histamin feststellen. Normalerweise setzen Mastzellen ihre Histamin-beinhaltende Granula durch eine IgE-vermittelte Signaltransduktion frei. Die entsprechend benötigten Rezeptoren sitzen dabei auf der Zellmembran. Allerdings scheinen die Mastzellen in Nasenpolypen nicht über die sonst übliche Transduktion durch IgE zur Degranulation angeregt zu werden; der genaue Mechanismus ist bisher unklar (Drake-Lee, Barker & Thurley, 1984).

Die Therapie der Polyposis nasi besteht je nach Ausmaß der Erkrankung aus medikamentöser oder chirurgischer Intervention. Nicht selten ist der Leidensdruck der Patienten enorm, so dass auch eine kombinierte Therapie zur Anwendung kommt. Nachdem die Polyposis nasi sehr stark zu Rezidiven neigt und eine kausale Therapie bisher nicht verfügbar ist, sind häufig mehrere Operationen

nötig. Idealerweise werden Nasenpolypen endoskopisch mittels FESS (functional endoscopic sinus surgery) entfernt. Als sehr hilfreich haben sich topische und systemische Steroide erwiesen, da sie die Entzündungsreaktion in der Nasenschleimhaut abschwächen. Da Nasenpolypen meist gut auf diese Therapie ansprechen, werden Kortikosteroide sowohl prä- als auch postoperativ erfolgreich eingesetzt. Eine kurzzeitige kombinierte systemisch-lokale Anwendung hat sich dabei als sehr wirkungsvoll herausgestellt. Zur Rezidivprophylaxe als Daueranwendung werden in der Regel nur topische Steroide in Form eines Nasensprays verwendet, um unerwünschte systemische Nebenwirkungen auszuschließen bzw. zu minimieren (Bachert, 2003; Bachert et al., 2003; Lund, 1995; Mygind, 1999; Rasp et al., 2000; Stammberger, 1999).

### 1.2.3 Allergische Rhinitis

Allergie ist ein Begriff, der sich aus den altgriechischen Wörtern *allos* "fremd, anders" und *ergon* "Verrichtung, Reaktion" ableitet. Der im heutigen Sinne gebräuchliche Begriff Allergie wurde bereits 1906 von dem Wiener Kinderarzt Clemens von Pirquet erstmals formuliert (Pirquet, 1906). Bis heute hat sich die Definition - auch wenn diese nun konkreter formuliert wird - nicht grundlegend geändert und man versteht unter einer Allergie eine spezifische, hypersensitive Entzündungsreaktion eines Immunsystems auf ein Allergen (Bousquet et al., 2001; Gruyter, 2004). Der Krankheitswert liegt hierbei in der eigentlichen Reaktion eines Organismus gegenüber an sich unschädlichen Substanzen oder Partikeln. Diese werden von dem betroffenen Immunsystem fälschlich als gefährlich interpretiert und führen damit zu einer unnötigen und oft übertriebenen Immunantwort.

Allergische Erkrankungen haben eine stetig zunehmende Inzidenz. In Deutschland konnte ein Anstieg der allergischen Rhinitis von 10% in 1992 auf 17% in 1998 gezeigt werden (Hermann-Kunz, 2000). Bereits im Kindes- und Jugendalter kann eine allergische Rhinitis im Durchschnitt bei fast 11% der Probanden festgestellt werden. Dabei ist ein stetiger Anstieg der Prävalenz mit dem Alter zu verzeichnen. Die Krankheitshäufigkeit reicht dabei von 0,5% bei 0-2 jährigen Kleinkindern bis hin zu fast 15% bei 14-17 jährigen Jugendlichen (Langen,

2012; Schlaud, 2007) und über 20% bei 30-39 jährigen (Langen, Schmitz & Steppuhn, 2013). Häufig gibt es eine Koinzidenz mit anderen allergischen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem atopischen Ekzem, der Nahrungsmittelallergie, der Urtikaria sowie dem allergischem Asthma bronchiale und Insektengiftallergien. Insgesamt leiden in Deutschland ca. 40% der Erwachsenen an Allergien (Hermann-Kunz, 2000). Zwar gibt es sowohl regional (Hermann-Kunz, 1999), als auch global deutliche Unterschiede in der Inzidenz (Janson et al., 2001), allgemein ist jedoch ein deutlicher globaler Anstieg der Allergieerkrankungen in den europäischen Industrienationen zu verzeichnen. In den USA ist ein ähnlicher Trend zu beobachten. Dort wurden im Jahr 2005 auf Grund einer allergischen Rhinitis 22 Millionen Arztbesuche registriert. Damit leiden rund 7,3% der amerikanischen Bevölkerung an einer allergischen Rhinitis. 5 Jahre zuvor lag die Quote noch bei 6.3%. Auch die Kosten im amerikanischen Gesundheitssystem stiegen im gleichen Zeitraum erheblich auf nahezu das Doppelte, nämlich auf \$11,2 Milliarden (Soni, 2008). Andere Quellen berichten in den USA von Inzidenzen zwischen 9% und 24% bei Erwachsenen und bis zu 42% bei Kindern (Borish, 2003). Die allergische Rhinitis ist damit die häufigste atopische Erkrankung und verursacht somit beachtliche Kosten, weswegen diese seit einigen Jahren vermehrt im Fokus der Aufmerksamkeit steht. Auch gesundheitspolitisch ist sie von immer größerer Brisanz (Kurth, Lange, Kamtsiuris & Holling, 2009).

Entsprechend der Klassifikation nach Coombs und Gell lassen sich Allergien in vier verschiedene Typen einteilen (Gell & Coombs, 1963). Die Typen I bis III gehören zur Gruppe der so genannten Frühtypen, die antikörpervermittelte Reaktionen darstellen. Typ IV grenzt sich von den anderen ab, da dieser zeitverzögert und zellvermittelt abläuft und somit einen grundlegend anderen Mechanismus aufweist. Die allergische Rhinitis kann klinisch, wie in der ARIA-Studie (Bousquet et al., 2001) beschrieben, klinisch noch weiter unterteilt und klassifiziert werden. So unterscheidet man eine persistierende, also dauerhaft symptomatische von einer intermittierenden, nur zeitweise auftretenden allergischen Rhinitis. Außerdem wird die Stärke der Symptome in 'mild' und 'moderat-stark' unterteilt. Für die Klassifizierung sind also allein die Symptome bestimmend. Bestehen Symptome länger als 4 Wochen pro Jahr bzw. 4 Tage pro Woche, spricht man von einer persistierenden allergischen Rhinitis. Treten

Symptome dagegen seltener auf, wird von einer intermittierenden allergischen Rhinitis gesprochen.

Die allergische Rhinitis sowie das allergische Asthma und auch die Urtikaria gehören dem Typ I - auch Soforttyp genannt - an. Bei diesem Typus kommt es nach dem symptomlosen Erstkontakt des Allergens mit T- und B-Lymphozyten in dem betreffenden Organismus zur Ausbildung von spezifischen IgE-Antikörpern. Diese Antikörper werden von Plasmazellen produziert, die durch die Umwandlung von B-Lymphozyten mittels z.B. Interleukin 4 (IL-4) entstehen. Erneuter Allergenkontakt bewirkt eine sofortige Bindung des entsprechenden Allergens durch die spezifischen IgE-Antikörper. Da vor allem Mastzellen hochaffin IgE-Antikörper über den FcεRI-Rezeptor binden (Stone et al., 2010), kommt es zu einer Degranulation dieser Zellen. Hierdurch werden entzündungsfördernde Mediatoren wie Histamin, Prostaglandine und Leukotriene freigesetzt. Diese Botenstoffe rufen letztendlich die bekannten Symptome einer allergischen Reaktion hervor, nämlich Juck- und Niesreiz, Sekretion und ödematöse Schwellung.

Neben den Mastzellen besitzen auch die hauptsächlich gewebsständigen eosinophilen Granulozyten den oben genannten hochaffinen FcεRI-Rezeptor für IgE-Antikörper (Dombrowicz & Capron, 2001; Kayaba et al., 2001). Dieser Rezeptor wird in eosinophilen Granulozyten allerdings in nur geringen Mengen exprimiert. Werden eosinophile Granulozyten zum Degranulieren angeregt, setzen sie eine Vielzahl von zytotoxischen Substanzen frei und führen dadurch zu einer lokalen Gewebszerstörung, die wiederum die Einwanderung weiterer eosinophiler Granulozyten nach sich zieht. Daher ist bei Allergikern häufig eine erhöhte Anzahl eosinophiler Granulozyten nachweisbar (Bentley et al., 1992).

Diagnostisch wertvoll ist hierbei das eosinophile kationische Protein (engl. eosinophil cationic protein, ECP), das in eosinophilen Granulozyten produziert wird und damit spezifisch für diesen Zelltyp ist. Durch die Gewinnung von Nasensekret, z.B. mittels eines Watteträgers, kann die ECP-Konzentration bestimmt werden. Diese lässt Rückschlüsse auf die Anzahl der gewebsständigen eosinophilen Granulozyten zu, da eine Korrelation dieser beiden Größen gezeigt werden konnte (Beppu et al., 1994). Analog hierzu lässt sich mit Tryptase verfahren, einem Enzym, das hauptsächlich von Mastzellen, aber auch von basophilen Granulozyten exprimiert wird. Da allerdings die Anzahl basophiler Granulozyten der

Nasenschleimhaut verschwindend gering ist (Canakcioglu et al., 2009; Heppt, 1995), kann deren Anteil bei der Bestimmung der Tryptase-Konzentration vernachlässigt werden. Somit können Rückschlüsse auf die Anzahl der vorhandenen Mastzellen in dem betreffenden Gewebe gezogen werden (Rasp & Hochstrasser, 1993).

Die erwähnten eosinophilen Granulozyten lassen sich aber nicht nur lokal in der Nasenschleimhaut, sondern auch systemisch im Blut bestimmen. In der Diagnostik werden sowohl diese als auch andere Parameter wie z.B. das Gesamt-IgE verwendet. Beide können Hinweise auf eine mögliche Atopie geben und somit als Marker fungieren (Chen, S. T., Sun, Lu, Lue & Chou, 2006). Die systemische Gewinnung von Untersuchungsmaterial bietet gegenüber der lokalen den Vorteil, dass Blut meist leicht zu entnehmen ist. Vielfach können diese Parameter auch im Rahmen der oft üblichen routinemäßigen Blutentnahme im Labor mitbestimmt werden.

Wie bereits erwähnt, sind derzeit viele verschiedene Methoden weltweit etabliert, um Allergien zu diagnostizieren. Je nach Erkrankung werden unterschiedliche Tests oder Kombinationen hiervon angewendet, um bestmögliche Diagnosen stellen zu können. Das Vorhandensein der oben erwähnten hochspezifischen IgE-Antikörper macht man sich somit in der Diagnostik der Allergien zu Nutze.

### **1.3 Zielsetzung der Studie**

In der Diagnostik chronischer nasaler Erkrankungen hat sich eine Vielzahl von verschiedenen Methoden etabliert. Diese werden sowohl einzeln als auch in Kombination mit anderen Methoden simultan eingesetzt. Aufgrund dieser vielen unterschiedlichen Testmöglichkeiten und der Messung von sowohl systemischen als auch lokalen Parametern war es Ziel dieser Studie, die Vergleichbarkeit und Aussagekraft der Messdaten bei chronisch nasalen Erkrankungen zu evaluieren. Bei dieser Studie stand das durch einen Cytobrush von der Nasenschleimhaut gewonnene Material besonders im Blickfeld. Solches Material steht normalerweise im Klinikalltag nicht zur Verfügung, sondern kann nur durch einen erheblichen

Mehraufwand gewonnen werden. Es ist aber für die Untersuchung besonders wertvoll, da es Aufschluss über den Zustand und die vorhandenen Zellpopulationen der Schleimhaut gibt. Durch die gleichzeitige Bestimmung der Parameter aus Blut, Nasenwatte und Cytobrush ist eine vergleichende Betrachtung möglich. Somit ist es möglich Rückschlüsse auf die Relevanz der gemessenen lokalen und systemischen Werte zu ziehen.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Studienaufbau**

#### 2.1.1 Patientenkollektiv und Kriterien

In die Studie wurden 120 Patienten im Alter zwischen 18 und 65 Jahren eingeschlossen. Es handelte sich um Patienten, die in der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde im Zeitraum von November 2007 bis August 2008 wegen chronischer nasaler Beschwerden vorstellig wurden. Die Teilnahme an der Studie erfolgte freiwillig nach vorausgegangener Aufklärung und einer schriftlichen Einverständniserklärung. Die aktuellen Datenschutzrichtlinien wurden befolgt. Die Durchführung der Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt. Im Probandenkollektiv befanden sich 59 Frauen (49,2%) und 61 Männer (50,8%).

Von der Studie ausgeschlossen wurden Patientinnen in der Schwangerschaft oder Stillzeit, Patienten in schlechtem Allgemeinzustand bzw. mit schweren Allgemeinerkrankungen sowie Patienten mit malignen Erkrankungen. Ebenso wurde mit Patienten bei bekanntem Alkohol- und/oder Drogen- bzw. Medikamentenmissbrauch verfahren. Die aktuelle Einnahme eines Antihistaminikums oder eines Steroids (topisch nasal oder systemisch) war ebenfalls ein Ausschlusskriterium. Ferner konnten Patienten mit mangelnder Kooperationsbereitschaft und ungenügenden Deutschkenntnissen, aufgrund von unzureichendem Verständnis der deutschen Patienten-Einverständniserklärung, nicht berücksichtigt werden.

#### 2.1.2 Gruppen

Alle Patienten, die in die Studie eingeschlossen werden konnten, wurden nach abgeschlossener Diagnostik und der Beurteilung der vorliegenden Ergebnisse in vier verschiedene Gruppen eingeteilt. Für die Eingruppierung war

die klinisch dominierende Erkrankung ausschlaggebend. Folgende Gruppen wurden gebildet: allergische Rhinitis ('Allergie'), chronische Rhinosinusitis ohne Polypen ('CRS'), Polyposis nasi et sinuum ('Polyposis') und Patienten ohne Anhalt für eine entzündliche Nasenerkrankung ('Kontrolle'). Die Patienten wurden dabei nach den zum Untersuchungszeitpunkt klinisch relevantesten Befunden eingruppiert. Hierbei waren sowohl die Symptomatik des Patienten als auch die klinischen Befunde und die laborchemischen Parameter entscheidend. Bei der allergischen Rhinitis wurde aufgrund der geringen Gruppenstärke (n=34) keine Unterscheidung in Bezug auf das Allergen oder auf eine perenniale bzw. saisonale Symptomatik vorgenommen, jedoch wiesen alle Patienten zum Untersuchungszeitpunkt Symptome auf, die auf ihre Allergie zurückzuführen waren. In der Gruppe der chronischen Rhinosinusitis gab es keine Patienten mit nasalen Polypen. Diese wurden der Gruppe der Polyposis nasi zugeordnet. In der Kontrollgruppe wurden Patienten aufgenommen, die zwar unter chronischen nasalen Beschwerden wie z.B. einer Nasenatmungsbehinderung litten, bei denen es aber keinen Anhalt für eine Allergie, CRS oder Polyposis nasi gab. Dies war beispielsweise bei einer Nasenseptumdeviation oder anderen anatomischen Varianten der Nasenhöhle der Fall.

## **2.2 Diagnostik**

### **2.2.1 Fragebogen**

Alle Patienten, die in die Studie eingeschlossen werden konnten, wurden noch vor dem Allergiescreening mittels eines Fragebogens zu ihren Beschwerden befragt. Die Patienten sollten Angaben bezüglich der Intensität bzw. des Ausmaßes ihrer Beschwerden machen. Gefragt wurde nach folgenden Symptomen: Nasenatmungsbehinderung, Nasensekretion, Niesreiz, Jucken der Nase, Augenjucken/-brennen, Nasennebenhöhlenbeschwerden, Schleimbildung im Rachen, saisonale bzw. ganzjährige Beschwerden sowie deren tageszeitliches, tätigkeits- und ortsabhängiges Auftreten. Außerdem wurde nach Neurodermitis gefragt.

Bei der Intensität konnte zwischen 4 Stufen von 'keine' (0) bis 'stark' (+++) gewählt werden. Mit diesem leicht verständlichen Fragebogen war es möglich, einen guten Überblick über die Symptome der Patienten zu gewinnen. Der Fragebogen wurde lediglich zur Eingruppierung der Patienten herangezogen.

### 2.2.2 Blutentnahme

Die Allergie-Diagnostik erfolgte in mehreren Schritten. Nach ausführlicher Anamnese und HNO-ärztlicher Untersuchung inklusive nasaler Endoskopie wurde mit der Probengewinnung begonnen.

Mit Hilfe eines Blutentnahmesystems (Sarstedt Monovette, Nümbrecht, Deutschland) wurde durch Punktion einer peripheren Armvene venöses Vollblut abgenommen und zwar sowohl mittels einer 7,5 ml Serum- als auch einer 2,7 ml EDTA-Monovette. Die Gesamtzahl der eosinophilen Granulozyten ließ sich aus dem EDTA-Blut maschinell im Institut für Klinische Chemie der Universität München ermitteln. Die Serum-Monovette wurde bei Raumtemperatur für 30 min zur Agglutination stehen gelassen und im Anschluss bei 4 °C zentrifugiert. Aus dem gewonnenen Serum wurden im Allergie-Labor das Gesamt-IgE (ImmunoCap, Phadia, Freiburg Deutschland) sowie der Screeningparameter SX1 bestimmt. Das CAP-FEIA SX1-Screeningverfahren (Phadiatop, Phadia, Freiburg Deutschland) ist eine sehr zuverlässige Methode um Allergien zu detektieren. Sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität liegt bei jeweils etwa 94% (Rasp, 1992). Hierbei handelt es sich um einen Multitest, welcher die häufigsten Inhalationsallergene mittels spezifischem IgE nachweist. Auf folgende Allergene wurde mit dem SX1-Screeningverfahren getestet: D. pteronyssinus, Katzenschuppen und Epithel, Hundeschuppen, Lieschgras, Roggen, Birke, Beifuß und Cladosporium herbarum. Ein positives SX1-Testergebnis bei unbekannter Sensibilisierung eines Patienten war dabei Anlass zu weiterführender Diagnostik.

### 2.2.3 Nasensekretgewinnung

Die Gewinnung von Nasensekret erfolgte mit Hilfe von kleinen Watteröllchen. Diese wurden vorab mittels einer Bajonettpinzette gedreht und anschließend unter anteriorer Rhinoskopie in den mittleren Nasengang eingelegt. Nach etwa 20 min wurden sie wieder entnommen. Bis zur Weiterverarbeitung im Labor wurden die mit Nasensekret getränkten Watteröllchen in einem luftdichten Röhrchen verschlossen und im Kühlschrank gelagert (Röhre 13ml 101x16,5mm, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Im Labor erfolgte das Abzentrifugieren des gewonnenen Sekrets aus der Watte bei 4 °C und 3000 U/min für 10 min (Hettich Zentrifuge Rotina 46 R, Tuttlingen, Deutschland). Hierzu wurde ein Sieb in das vorhandene Röhrchen eingelegt, um das Sekret von der Watte zu trennen. Das so gewonnene Nasensekret wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren.

Die Bestimmung des enthaltenen ECP und der Tryptase erfolgte mittels Fluoreszenz Enzym Immuno Assay (FEIA) (ImmunoCap, Phadia, Freiburg, Deutschland).

### 2.2.4 Cytobrush und Cytospin

Nach dem Entfernen der Watteröllchen wurde Zellmaterial mittels Cytobrush (Cytobrush® Plus GT, Medscand Medical, Schweden) an der vorderen, mittleren Nasenmuschel ohne Anästhesie gewonnen (Abbildung 01). Das Einführen des

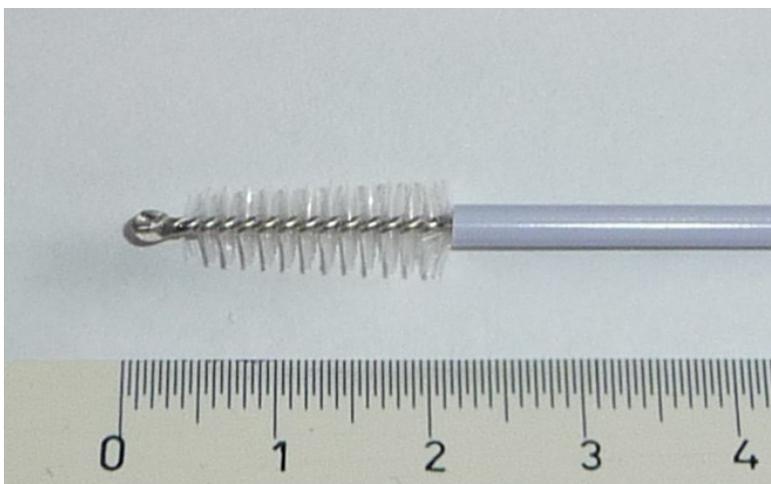


Abbildung 01: der verwendete Cytobrush zur Zellgewinnung; der Nylonbürstenkopf erstreckt sich über eine Länge von etwa 2cm; die Länge der Nylonborsten variiert zwischen ca. 2 mm an der Spitze mit der Kunststoff-Kugel und ca. 3 mm am Ende des Kopfes.

Dargestellte Maßeinheit in cm.

Cytobrush erfolgte unter direkter Sicht und mit Hilfe eines Nasen-Spekulums. Mittels einer 180°-Drehung um die Längsachse wurde Zellmaterial von der mittleren Nasenmuschel und dem Septum entnommen. Der Cytobrush wurde anschließend in einem mit 5 ml steriler PBS-Lösung (Tabelle 01) gefüllten Zentrifugenröhrchen (Thermo Fisher Scientific NUNC 15ml, Waltham, USA) suspendiert. Um die Zellen an die Lösung abzugeben, wurde der Cytobrush innerhalb der Lösung mit schnellen Rotationsbewegungen um die Längsachse an der Zentrifugenröhrchen-Wand gedreht. Analog erfolgte ein zweiter Cytobrush auf der anderen Nasenseite an korrespondierender Stelle. Dieser wurde in derselben Lösung suspendiert, um eine ausreichend hohe Zellzahl zu erzielen.

Herstellung der PBS-Lösung (engl. Phosphate Buffered Saline)	
Stocklösung	Die Stocklösung (0,1 molar) stellt die Grundsubstanz der verwendeten PBS-Lösung dar und wurde aus folgenden Komponenten hergestellt: 14,7g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat 2,4g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat 83g NaCl 1l destilliertes H <sub>2</sub> O Die Lösung wurde auf einen ph von 7,4 eingestellt
Verwendete PBS-Lösung	Entspricht der Stocklösung in einer Verdünnung von 1:10 (0,01 molar)

Tabelle 01: Herstellung der verwendeten PBS-Lösung

Diese Methode entsprach im Wesentlichen der von Pipkorn beschriebenen Technik (Pipkorn, Karlsson & Enerback, 1988). Im Labor wurde die Zellsuspension aufgearbeitet. Zuerst erfolgte das Abzentrifugieren (Hettich Zentrifuge Rotina 46 R, Tuttlingen, Deutschland) bei 4° Celsius, 1200 U/min für 15 min. Die Beschleunigung und das Abbremsen der Zentrifuge geschah bei moderatem Tempo (Stufe 4 von 10), um das entstandene Zellpellet zu schonen. Die überschüssige PBS-Lösung wurde nun vorsichtig am Rand abgesaugt, zum Waschen dann erneut 5 ml PBS-Lösung hinzugegeben. Mittels Pipette konnte das Zellpellet resuspendiert werden. Anschließend erfolgte die erneute Zentrifugation mit oben genannten Parametern. Das nun entstandene, von Schleim und anderen

Fremdkörpern befreite Zellpellet wurde abermals von der überschüssigen PBS-Lösung bis auf einen Überstand von 1 ml befreit. Nun war es möglich, das Zellpaket in dieser Rest-Lösung schonend zu resuspendieren, bis eine homogene Trübung zu erkennen war.

Zur Vorbereitung der Cytospins (Hettich Zyto-Winkelkammer Nr.1662, Tuttlingen, Deutschland) wurden diese mit Objektträgern Superfrost Plus (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) und einem darauf liegendem Filterpapier (Hettich Filterkarte Ø 12,4mm, Tuttlingen, Deutschland) bestückt, beschriftet und von 1-4 nummeriert. Die Aussparung des Faserpapiers für die Zellsuspension betrug im Durchmesser 12,4 mm, was einer Fläche von 120 mm<sup>2</sup> entspricht. Objektträger und Faserpapier wurden mittels passender Cytospin-Winkelkammer fixiert. Die Zellsuspension wurde nun mittels Pipette zu je 200 µl auf die vier bereitgelegten Cytospins aufgeteilt und sofort nach dem Auftragen in der Zentrifuge (Hettich Zentrifuge Universal, Tuttlingen, Deutschland) bei Raumtemperatur und 500 U/min für 15 min auf den Objektträger zentrifugiert. Dies war erforderlich, um eine verfrühte Absorption der Flüssigkeit durch das Faserpapier und damit eine Ansammlung der Zellen am Rand zu verhindern. Auf ein Abbremsen der Zentrifuge wurde verzichtet, um möglichst große Homogenität bei der Verteilung des Zellmaterials auf dem Objektträger zu erreichen. Durch das relativ lange Ausrotieren konnte außerdem eine vollständige Absorption der PBS-Lösung durch das Faserpapier gewährleistet werden. Dies erwies sich als äußerst wichtig, da andernfalls Kristallbildungen stattgefunden hätten, die die anschließende Zellbeurteilung erheblich erschwert oder sogar unmöglich gemacht hätten.

Im Anschluss wurden die Objektträger unter dem Abzug für 1 h luftgetrocknet. Darauf folgte eine Fixierung für 10 min in Azeton und wiederum eine Lufttrocknung für weitere 10 min. Nun wurden die Präparate bis zur weiteren Verarbeitung sorgfältig in Aluminiumfolie eingewickelt, beschriftet und bei -25 °C im Gefrierschrank gelagert.

#### 2.2.4 Weiterführende Diagnostik

Gab es in der Allergie-Diagnostik eines Patienten einen Hinweis auf eine Allergie, wie beispielsweise einen positiven SX1-Test, so wurde in einer zweiten Sitzung ein Prick-Test zur genaueren Bestimmung der vorliegenden Sensibilisierung vorgenommen. Hierbei wurde für jedes zu testende Allergen jeweils ein Tropfen einer Allergenlösung (Alk-Abelló, Hørsholm, Denmark) auf ein vorher gekennzeichnetes Hautareal aufgetragen. Die Lösung enthielt eine genau standardisierte Allergenextrakt-Konzentration. Zusätzlich zu den zu testenden Allergenen wurde jeweils ein Tropfen Histamin und allergenfreie Träger-Lösung aufgebracht. Diese dienten als Positiv- bzw. Negativkontrolle. Nach dem Auftragen der zu testenden Substanzen wurde mit Hilfe einer sterilen Lanzette (Alk-Abelló, Hørsholm, Denmark) durch den Tropfen der jeweiligen Allergenlösung in die Oberhaut eingestochen. Damit sollte sichergestellt werden, dass das Allergen mit Zellen des Immunsystems in Kontakt kommt. Nach einer Einwirkzeit von etwa 20 min war das Ergebnis anhand der Quaddelgrößen ablesbar.

Der Test wurde nach dem Standard der HNO-Klinik durchgeführt, der später durch die GA<sup>2</sup>LEN-Studie (Heinzerling et al., 2009) bzw. durch die deutsche Leitlinie (Rueff et al., 2010) veröffentlicht wurde. So lag ein positives Ergebnis vor, wenn eine Quaddelgröße von 3 mm Durchmesser erreicht wurde. War eine Quaddel oval, so wurde der Durchschnittswert der beiden senkrecht zueinander stehenden Durchmesser genommen. Außerdem war ein positives Ergebnis von Histamin und ein negatives der Trägerlösung Voraussetzung für die Validität des gesamten Tests.

### 2.3 Immunzytochemische Aufarbeitung der Cytobrush-Präparate

Zur Färbung der Cytospin-Präparate wurden diese bei Raumtemperatur 30 min. lang aufgetaut. Die Raumtemperatur lag idealerweise bei 24 °C und durfte 25 °C nicht übersteigen. Diese Raumtemperatur blieb bis zum Fertigstellen des Präparates konstant. Um ein Austrocknen der Präparate während der verschiedenen Inkubationsschritte zu verhindern, wurden alle immunhistochemischen Färbeprozesse in feuchten Kammern durchgeführt.

Bevor mit der immunhistochemischen Aufarbeitung begonnen werden konnte, war es notwendig einige Lösungen vorab vorzubereiten, um während der Aufarbeitung die erforderlichen Inkubationszeiten einhalten zu können (Tabelle 02).

Lösung	Herstellung
Paraformaldehyd-Lösung (Herstellung am Vortag)	Auflösen von 8 g Paraformaldehyd-Pulver in 100 ml destilliertem Wasser unter Erwärmung für 20 min mittels Rührgerät. Die Lösung durfte dabei nicht zum Kochen gebracht werden. In die entstandene trübe Lösung wurde im Anschluss mit Natronlauge (5 N) titriert, bis eine klare Lösung entstanden war. Hinzu kamen 100 ml einer doppelt konzentrierten PBS-Lösung (0,02 molar). Diese wurde im Anschluss abfiltriert und zur Reifung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.
PBS-Lösung (0,01 molar)	Siehe Tabelle 01
PBS-Brij-Lösung	Brij-Stammlösung (35 %) wurde mittels PBS-Lösung auf 0,1 % verdünnt. (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
PBS-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung = Peroxidase Blocking	Herstellung aus 200 ml PBS-Lösung und 2 ml 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
Avidin-PBS-Lösung, Biotin-PBS-Lösung	Verfügbar als industrielle Blocking-Reagenzien. (Dako, Carpinteria, USA)

Normales Pferdeserum	1:20 Verdünnung mit PBS-Lösung (Dako, Carpinteria, USA)
Avidin-Biotin-Complex-Peroxidase	Gebrauchsfertiges Kit, bestehend aus den 2 Lösungen Avidin und Biotin (jeweils 0,1 % in Tri-HCl-Puffer mit 0,015 mol/l Natriumazid) (Dako, Carpinteria, USA). Das Ansetzen erfolgte erst kurz vor Gebrauch der Lösung. Die Lösung wurde mit PBS-Lösung 1:100 verdünnt
Amino-Ethyl-Carbazole-Lösung (AEC-Lösung)	Herstellung mittels einer 20 mg 3-Amino-9-Ethyl-Carbazole Tablette, die in 10 ml Dimethylsulfoxid für 30 min aufgelöst wurde. Die entstandene Lösung wurde mit 0,1 molarer Natriumacetat-Puffer-Lösung (pH 5.5) auf 100 ml aufgefüllt und anschließend filtriert. Durch die Zugabe von 150 µl 30%-iger H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung erhielt man schließlich die aktivierte AEC-Färbelösung. (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)

Tabelle 02: Die Herstellung der verwendeten Lösungen und ihre Zusammensetzung.

Dem Färbeprozesses lag ein bekanntes Schema zu Grunde (Hsu, Raine & Fanger, 1981a) und verlief wie folgt: Begonnen wurde der Färbeprozess mit einem initialen Azetonbad für 5 min, um die Granulozytengranula zu fixieren und sie so vor dem Auswaschen zu schützen. Hierauf folgte ein erneutes Lufttrocknen der Präparate. Die getrockneten Objektträger kamen nun für 5 min in ein Paraformaldehyd-Bad, um die Zellmorphologie möglichst gut zu erhalten. Dies dient der Vernetzung bzw. der Fixierung der Epitope und ermöglicht so eine bessere Strukturhaltung ohne die Epitope zu maskieren.

Auf das Paraformaldehyd-Bad folgten zwei Bäder für je 10 min in PBS-Lösung. Dieser Schritt dient der Pufferung des pH-Wertes und der Spülung, um Kreuzreaktionen der einzelnen Reagenzien zu verhindern. Im Anschluss wurden die Objektträger mit PBS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung bedeckt. Dies dient der Elimination von endogener Peroxidase. Diese kommt natürlicherweise in vielen Gewebeformen vor und würde ohne Deaktivierung zu einer gänzlich unspezifischen Färbung führen. Nach 6 min Einwirkzeit folgten wiederum zwei 10-minütige Waschgänge in PBS-Lösung.

Antikörper (AK)	Beschreibung/Hersteller
Erst-Antikörper: AA1	Monoclonaler Maus Anti-Human Mastzell Tryptase Antikörper IgG <sub>1</sub> (Dako, Glostrup, Denmark), verwendete Verdünnung 1:1000
Erst-Antikörper: ECP	Monoclonaler Maus Anti-Human Eosinophil Cationic Protein (ECP) Antikörper IgG <sub>1</sub> (Pharmacia&Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Schweden), verwendete Verdünnung 1:500
verwendeter Brückenantikörper (BAK) (Verwendung für ECP und AA1)	biotinylierter Pferd Anti-Maus IgG (Heavy + Light chain), (Vector, Burlingame, USA), verwendete Verdünnung 1:200

Tabelle 03: Die verwendeten Antikörper der Einzelfärbung und ihre Verdünnung

Nun folgte die Benetzung mittels 200 µl normales Pferdeserum. Das Normalserum richtet sich dabei nach dem zweiten Antikörper. Es muss also dem Tier entsprechen in dem der BAK produziert bzw. welchem er entnommen wurde (Pferd). Das Normalserum dient der Absättigung bzw. Abdeckung von vorhandenen Gewebeproteinen, die für den BAK potentielle Bindungsstellen darstellen könnten. Dieser Vorgang ist deshalb sehr wichtig, weil ohne diesen Schritt unspezifische Strukturen angefärbt würden. Es entstünde eine Hintergrundfärbung oder eine unspezifische Einfärbung anderer Strukturen. Gleichzeitig senkt das Normalserum die Oberflächenspannung. Hierdurch ist es möglich, den nachfolgenden Antikörper in einer definierten Menge zu applizieren. Diese Methode - mit standardisierten Mengen auf definierten Flächen bei festgelegter Zeit - gewährleistet eine gute Reproduzierbarkeit unter zuvor genannten Bedingungen. Nach einer Einwirkzeit von 30 min wurde das Normalserum abgeklopft. Im Anschluss folgte nun der Avidin- und Biotin-Block. Hierzu wurden die Präparate für 10 min mit 200 µl Avidin-PBS-Lösung bedeckt. Der direkt folgende Biotin-Block mit Biotin-PBS-Lösung wurde analog zum Avidin-Block durchgeführt. Ein erneutes Bad in PBS-Lösung für 10 min beendete diesen Arbeitsschritt.

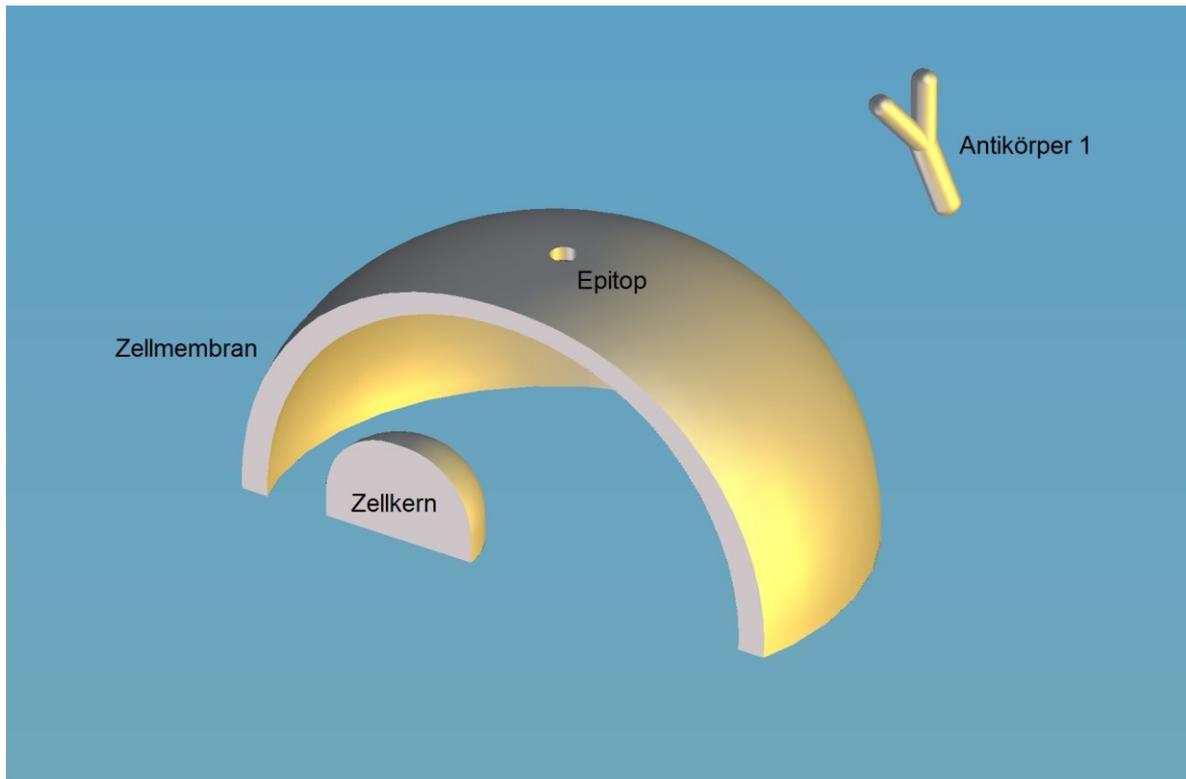


Abbildung 02: Der Primärantikörper und das entsprechende Epitop auf der Zellmembran.

Nun folgte die Applikation des ersten Antikörpers. Dieser richtet sich spezifisch gegen vorhandene Epitope der Zellen. Somit kann diese Reaktion als eine Antigen-Antikörper-Reaktion angesehen werden (Abbildung 02). Verwendet wurden hierfür die Antikörper AA1 und ECP, jeweils spezifisch für Mastzellen bzw. eosinophile Granulozyten (Tabelle 03). Die applizierte Menge war in beiden Fällen 80  $\mu\text{l}$  auf 2,5  $\text{cm}^2$  Fläche. Die Verweildauer betrug 60 min. Im Anschluss folgten 2 Bäder in Brij-Lösung für 10 min.

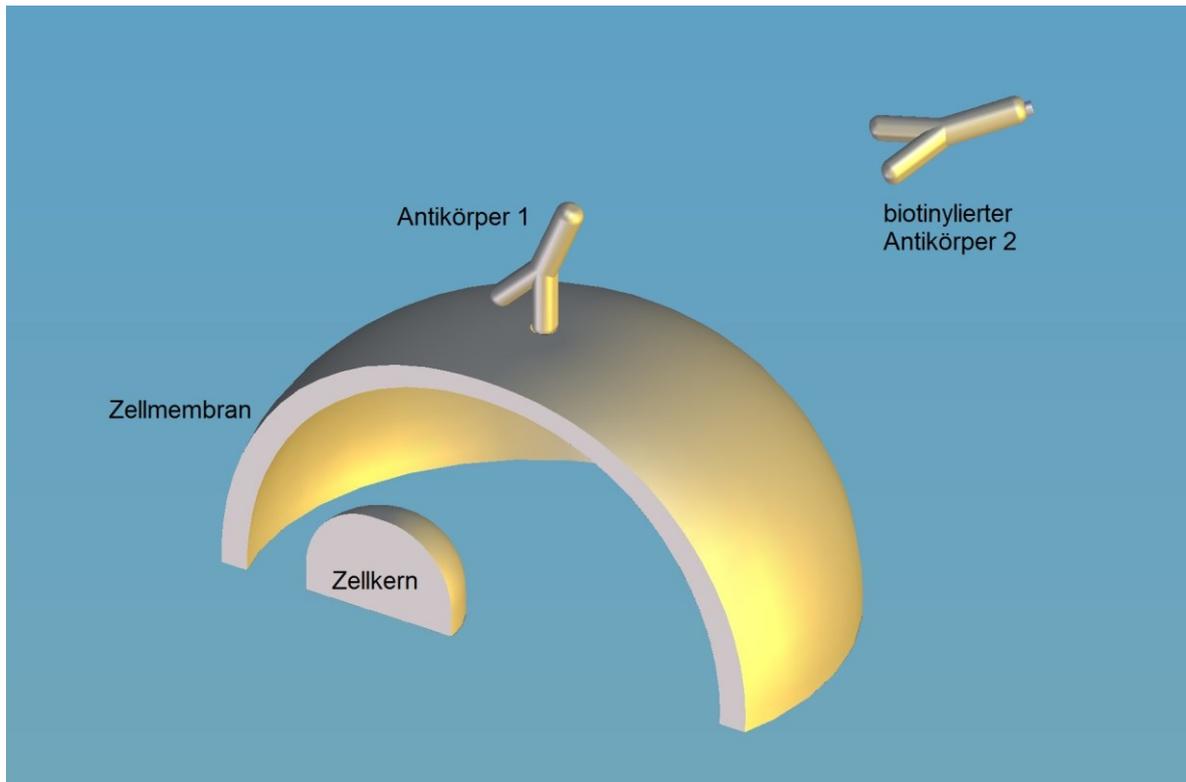


Abbildung 03: Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet an das Epitop des Primärantikörpers.

Im nächsten Schritt erfolgte die Applikation des Brückenantikörpers (BAK entspricht dem 2. Antikörper). Die Brückenantikörper sind als Kit vom Hersteller bereits fertig vorgegeben und biotinyliert. Er bindet nun an den zuerst applizierten Antikörper und bildet einen Antikörper-Antikörper-Komplex (Abbildung 03 und 04). Auch vom BAK wurden 80 µl aufgetragen. Dieser verblieb für 30 Minuten dort. Es folgten abermals 2 Bäder in Brij-Lösung für 10 min. Im Anschluss wurde mit Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase (ABC-Po) inkubiert. 80 µl wurden für 30 min aufgetragen. Bei dieser Methode richtet sich der Komplex gegen den biotinylierten BAK. Hierbei nutzt man die starke Affinität von Avidin gegenüber Biotin (Hsu, Raine & Fanger, 1981b). Die ABC-PO fungiert dabei als Bindeglied zwischen dem BAK und dem anschließend applizierten AEC-Farbstoff (Abbildung 05).

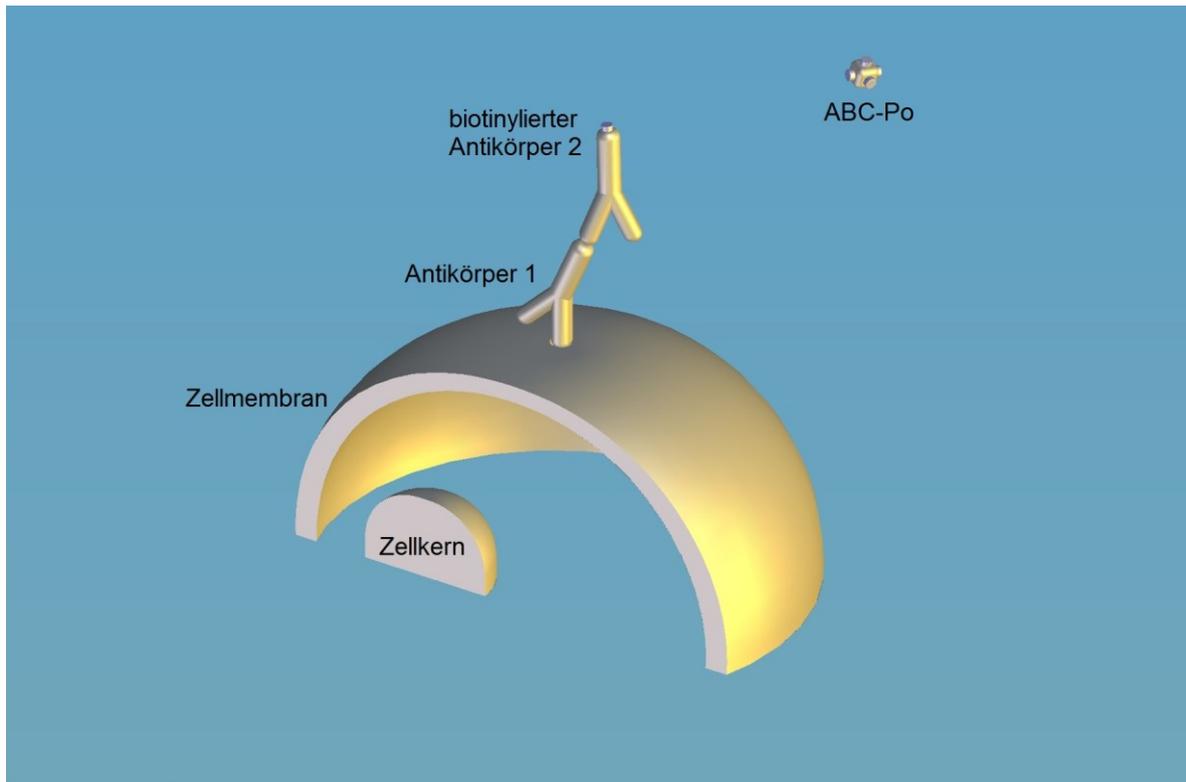


Abbildung 04: Nach Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper bildet die Avidin-gebundene Peroxidase mit dem Biotin des Sekundärantikörpers einen Komplex.

Bevor der Färbeprozess erfolgen konnte, wurden ein weiteres Mal 2 Bäder in Brij-Lösung für 10 min durchgeführt.

Nächster Schritt war die Applikation von 80 µl AEC-Lösung. Um eine Bindung mit der ABC-Po einzugehen, waren 10 min Verweildauer ausreichend (Abbildung 05 und 06). Das in der AEC-Lösung enthaltene Wasserstoffperoxid (dient als Katalysator) ist essenziell für die Farbgebung, da erst durch die Peroxidasereaktion die Färbung auftritt. Erneut folgte ein Bad in Brij-Lösung für 5 min und anschließend für die gleiche Zeit eine Spülung unter fließendem Leitungswasser.

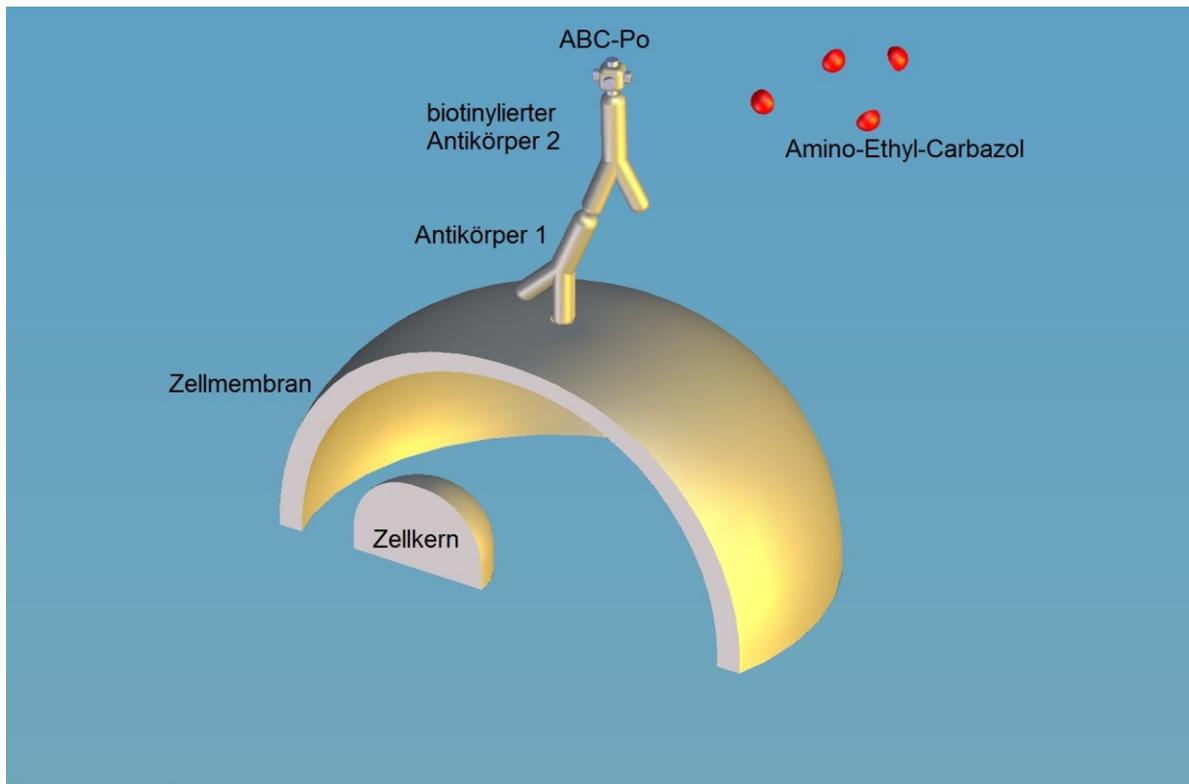


Abbildung 05: AEC-Lösung wird für die Farbreaktion zugesetzt.

Eine 1-2-minütige Gegenfärbung des Zellkerns mit Mayer's Hämalaunlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) sorgte nun für einen besseren Kontrast und eine bessere Beurteilbarkeit. Die Dauer dieser Prozedur kann etwas variiert werden, um die Intensität der Färbung zu steuern und somit einen möglichst guten Kontrast zu erreichen.

Die verwendete Lösung ist als Fertiglösung verfügbar. An die Gegenfärbung schloss sich ein 15-minütiges Bad unter fließendem Leitungswasser an, was dem Bläuen diente (Farbänderung in Richtung blau).

Zuletzt wurden die Präparate für 1 min. in destilliertem Wasser gespült. Die Färbung war hiermit abgeschlossen und konnte unter dem Mikroskop geprüft werden.

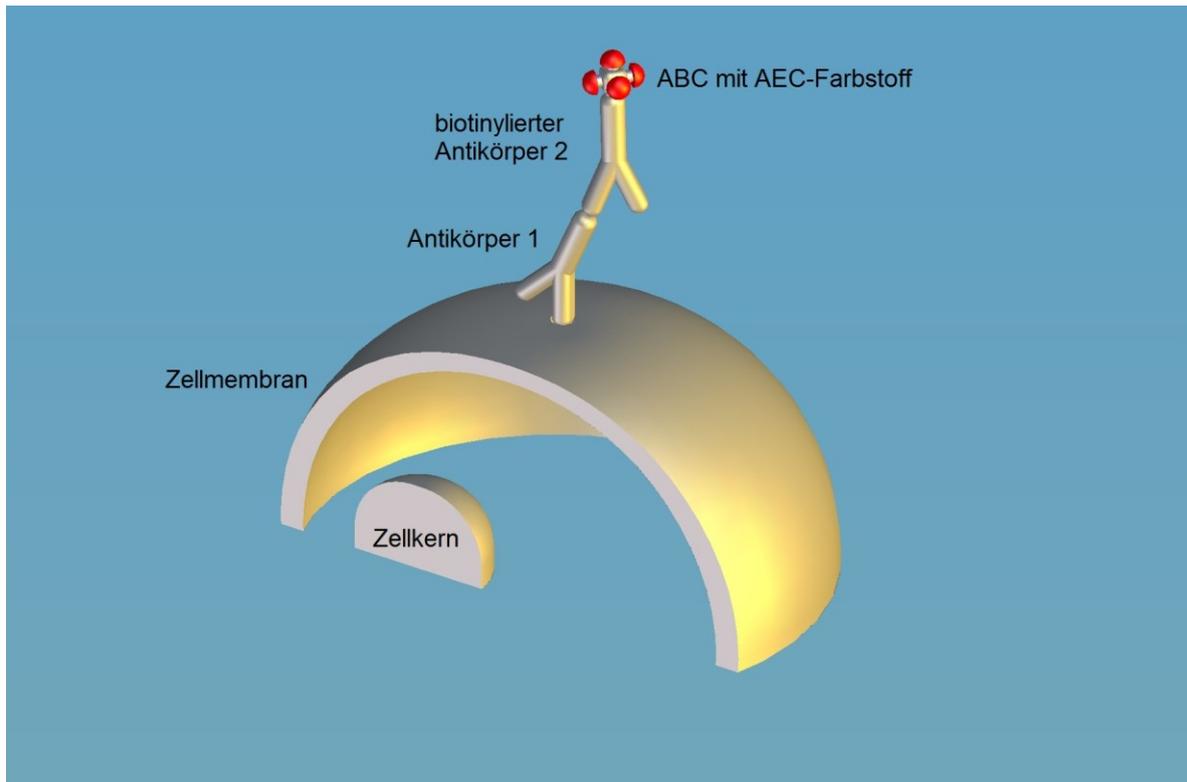


Abbildung 06: Durch die Peroxidseereaktion kommt es Farbumschlag des AEC-Farbstoffs.

Es folgte nur noch das Eindeckeln mit Kaiser's Glyceringelatine (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und Glasdeckel (Menzel-Gläser 24 x 32 mm, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland). Nach dem Aushärten waren die Präparate bereit zum Auswerten und Archivieren.

## 2.4 Immunzytochemische Doppelfärbung

Zusätzlich zur in Teil 2.3 beschriebenen Färbung wurde eine immunhistochemische Doppelfärbung angefertigt. Ähnlich dem zuvor beschriebenen Verfahren wurden anhand zweier aufeinander folgender Färbeprozesse zwei Epitope farblich unterschiedlich markiert (Chen, X., Cho & Yang, 2010). Da es sich bei den Nasenbrush-Präparaten neben der dominierenden Epithelzellpopulation hauptsächlich um neutrophile und eosinophile Granulozyten handelte, zielte diese Färbung auf die eindeutige Unterscheidung dieser beiden Granulozytenpopulationen ab.

Antikörper (AK)	Beschreibung/Hersteller
AK1: ECP	Monoklonaler Maus Anti-Human Eosinophil Cationic Protein (ECP) Antikörper IgG <sub>1</sub> (Pharmacia&Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Schweden), verwendete Verdünnung 1:500
AK2: neutrophile Elastase	Polyklonaler Kaninchen Anti-Human neutrophile Elastase Antikörper (Abcam, Cambridge, USA), verwendete Verdünnung 1:200
Brückenantikörper 1 (BAK1):	Biotinylierter Pferd Anti-Maus IgG (Heavy + Light chain), (Vector, Burlingame, USA), verwendete Verdünnung 1:200
Detektionsantikörper 1	Streptavidin Alexa Fluor 488 verwendete Verdünnung 1:200
Detektionsantikörper 2 (beinhaltet BAK2):	Alexa Fluor® 647 Ziege Anti-Kaninchen IgG (Heavy + Light chain) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA), verwendete Verdünnung 1:500

Tabelle 04: Liste der verwendeten Antikörper der immunhistochemischen Doppelfärbung

Durch den Einsatz spezifischer Antikörper von unterschiedlichen Wirten kann eine Kreuzreaktion verhindert werden. Die anschließende andersartige Farbgebung ermöglicht eine gezielte Unterscheidung der beiden Granulozytenpopulationen.

Begonnen wurde, wie auch bei der Einfachfärbung, mit dem langsamen Auftauen bei Zimmertemperatur für 30 min. Ebenso folgten die Schritte der Fixierung mit Azeton für 5 min und die Paraformaldehyd Applikation für 5 min. Auch die Schritte des 2-fachen Waschens in PBS-Lösung für 10 min ist bekannt. Die Eliminierung von endogenem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist nicht notwendig, da keine Peroxidase verwendet wird. Es folgte der Avidin-Block der Blocking-Reagenz für 10 min und unmittelbar anschließend analog hierzu der Biotin-Block in gleicher Dauer. Beide Lösungen wurden zu je 200 µl aufgetragen.

Das weitere Procedere war die Applikation des Normalserums (normales Pferdeserum) in einer Verdünnung von 1:20 mit PBS-Lösung. Nach 30 min wurde dieses abgeklopft. Als erster Antikörper (AK1) kam ECP zum Einsatz (siehe Tabelle 04). Dieser entsprach dem gleichen Antikörper wie dem der Einfachfärbung. Wieder wurden 80 µl für 60 min auf dem Präparat belassen. Es folgten zwei Waschgänge in Brij-Lösung für je 10 min. und im Anschluss der erste Brückenantikörper (BAK1). Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:200 für 30 min aufgetragen, bevor wiederum zwei je 10-minütige Waschgänge in Brij-Lösung den Vorgang beendeten. Anschließend wurde mit dem Detektionsantikörper Streptavidin Alexa Fluor 488, in 1:200 Verdünnung (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) für 30 min gefärbt. Die Applikation des Fluoreszenzfarbstoffs erfolgte in der Dunkelkammer. Nach dem darauf folgenden Waschen in PBS-Lösung war der erste Färbeprozess für ECP beendet. Unmittelbar darauf begann nun das Verfahren für die neutrophile Elastase als Marker für neutrophile Granulozyten. Zunächst wurden 200 µl Ziegenserum 1:20 verdünnt aufgetragen. Nach der erforderlichen Einwirkzeit von 30 min wurde dieses abgeklopft und 80 µl des neutrophilen Elastase Antikörpers (AK2) in einer Verdünnung von 1:200 für 60 min aufgetragen. Wie bereits bei den oben beschriebenen Schritten folgten 2 Waschgänge in Brij-Lösung für je 10 min.

Im weiteren Verlauf wurde nun der Detektionsantikörper 2 verwendet, welcher den Brückenantikörper (BAK2) und den fluoreszierenden Farbstoff als Fertiglösung (Direkt-Konjugat) vereint. 80 µl von diesem wurde in einer Verdünnung von 1:500

für 30 min wiederum in einer Dunkelkammer aufgetragen. Zwei Waschgänge in Brij-Lösung von je 10 min Dauer sowie eine Konservierung mit 100 µl des Eindeckmittels Vectashield w/DAPI, H-1200 (Vector, Burlingame, USA) beendeten den Vorgang. Für eine optimale Farbgebung war es notwendig, das Eindeckmittel, das bereits den Farbstoff für die Zellkernfärbung (DAPI) enthält, in der Dunkelkammer zu applizieren und über Nacht bei 4 °C dunkel zu lagern. In dieser Zeit konnte der Farbstoff in den Zellkern ziehen und dort vorhandene DNA-Bestandteile blau färben. Die Färbeprozedur war damit abgeschlossen.

## **2.5 Auswertung der Cytobrush-Präparate**

Die Auswertung der Präparate in Einfachfärbung erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Zeiss Standard L5, Jena, Deutschland). Dabei wurden pro Patient jeweils zwei immunhistochemisch gefärbte Cytospins ausgewertet, von denen je eines nach anti-human ECP und ein zweites nach anti-human Mastzell-Tryptase entsprechend obiger Anleitung gefärbt worden war.

Der Auszählung ging eine Beurteilung des Gesamtpräparates und der Zellmorphologie mit einem 20-fach vergrößernden Objektiv voraus. Außerdem war das Mikroskop mit einem 10-fach vergrößernden Okular incl. Gitteraufteilung bestückt. Dies ermöglichte es ein Gesichtsfeld in übersichtlichen quadratischen Kammern, und zwar in 10x10 kleinen bzw. 5x5 großen Feldern, untersuchen zu können. Insgesamt ergab sich daraus eine 200-fache Vergrößerung.

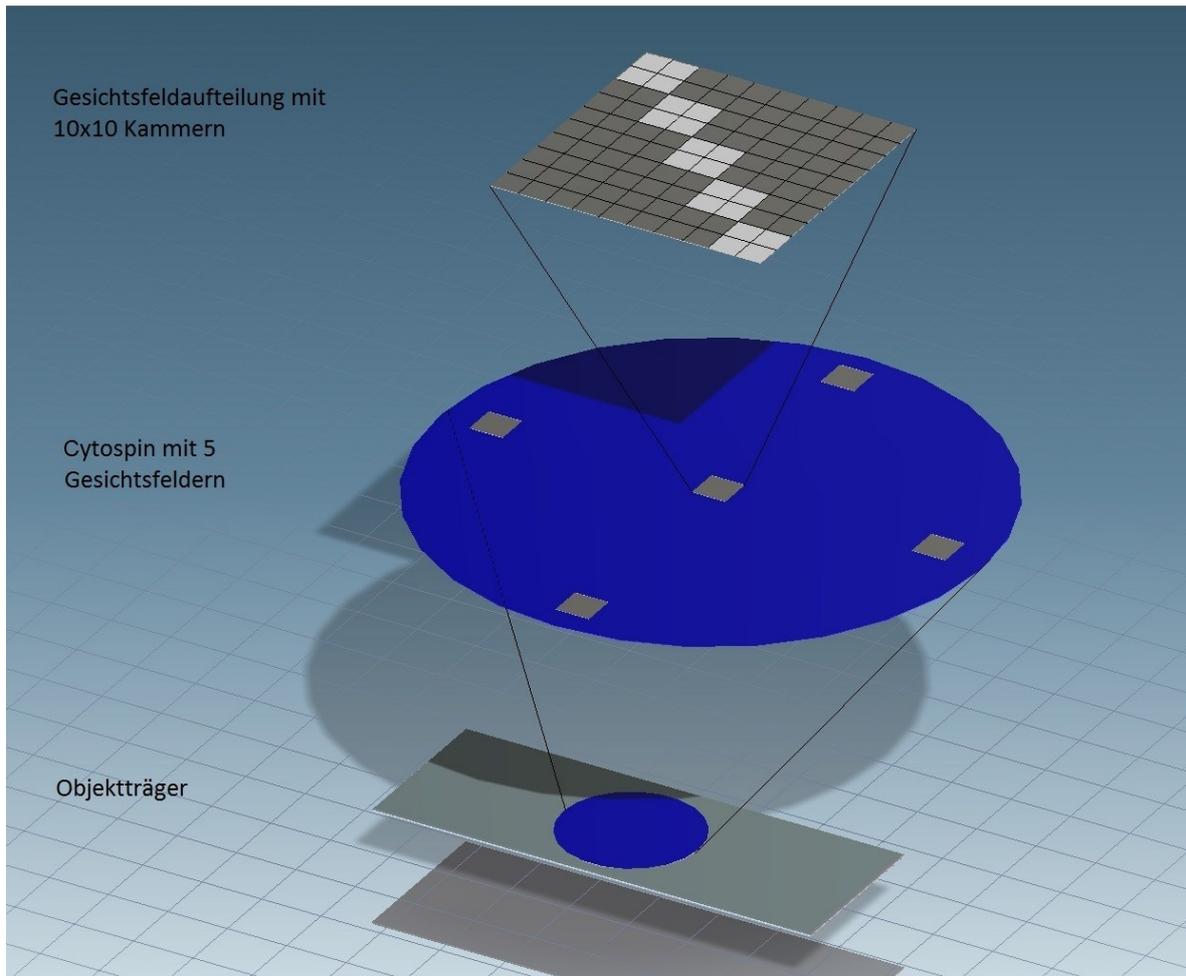


Abbildung 07: Graphische Darstellung der Gesichtsfeldanordnung und der Auswertung

Die ausgezählte Fläche unter der oben erwähnten Vergrößerung betrug damit  $1 \text{ mm}^2$ . Da der gesamte Cytospin eine Fläche von  $120 \text{ mm}^2$  aufwies und die Zellverteilung des Cytospins durch die Rotation der Zentrifuge nicht absolut homogen war, wurden zur Auswertung 5 dieser Gesichtsfelder ausgezählt. Um einen realistischen Durchschnitt und eine aussagekräftige Gesamtzellzahl zu bekommen, wurden sie auf 0, 3, 6 und 9 Uhr sowie zentral gelegt (Abbildung 07). Hierdurch war gewährleistet, dass dünn und dicht besiedelte Gebiete des Cytospins gleichermaßen berücksichtigt wurden.

Die Auszählung positiv gefärbter Mastzellen bzw. eosinophiler Granulozyten erfolgte pro Gesichtsfeld in dem gesamten Gitter, also in allen  $10 \times 10$  Quadraten des Gitternetzes. Für die Gesamtzellzahl hingegen wurden aufgrund der oft enormen Anzahl nur die 5 großen diagonalen Felder ausgezählt. Diese verminderte Anzahl an ausgezählten Feldern wurde später rechnerisch

ausgeglichen. Die Gesamtzellzahl und die Anzahl positiv gefärbter Zellen wurde unter dem Mikroskop mit Hilfe von manuellen Zählrohren ermittelt.

Die Präparate der Doppelfärbung wurden mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops (Leica TCS SP2 mit Objektiv 63 blue, Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Germany) ausgewertet. Eine quantitative Auszählung der immunhistochemischen Färbung erfolgte hier nicht. Vielmehr lag das Augenmerk auf der spezifischen simultanen Anfärbung von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten in ein und demselben Präparat.

## **2.6 Statistik**

Die Patientendaten (Alter und Geschlecht) sowie die Werte der erhobenen Blutuntersuchung, des Nasensekrets und die Auszählung der Cytospins wurden mittels Excel-Tabelle archiviert. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 11.0. Dabei galten p-Werte  $<0,05$  als signifikant. Signifikanzen sind in den Graphiken mit Symbolen (\*, \*\*, \*\*\*) gekennzeichnet, wobei den verschiedenen p-Werten durchwegs jeweils ein Symbol fest zugeordnet wurde. So wurden p-Werten  $<0,05$  als signifikant bezeichnet und mit (\*), p-Werte  $<0,01$  als hoch signifikant mit (\*\*) und p-Werte  $<0,001$  als höchst signifikant und mit (\*\*\*) gekennzeichnet. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels der Holm-Sidak Methode. Für die Korrelationen wurde das Pearson-Produkt verwendet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Alters- und Geschlechterverteilung

In die Studie wurden insgesamt 120 Patienten aufgenommen und in folgende Gruppen aufgeteilt: Allergie, CRS, Polyposis und Kontrolle. Die Allergie- und Kontrollgruppe waren dabei zahlenmäßig am stärksten mit jeweils 34 Probanden. Die Gruppe Polyposis-Gruppe war mit 25 am schwächsten vertreten, die CRS-Gruppe lag mit 27 knapp darüber (Tabelle 05). Die Gruppenstärken der einzelnen Auswertungen schwanken aufgrund sog. 'Ausreißer'. Diese weisen Werte auf, die Außerhalb von 2 Standardabweichungen liegen ( $\pm 2$  SD) und wurden bei der entsprechenden Auswertung der entsprechenden Gruppe nicht berücksichtigt.

	Allergie	CRS	Polyposis	Kontrolle	Gesamt
Anzahl (n)	34	27	25	34	120
Anteil (%)	28,3	22,5	20,9	28,3	100

Tabelle 05: Anzahl der Patienten in den einzelnen Gruppen

Die Alters- und Geschlechterverteilung kann Tabelle 06 entnommen werden. Die Gruppe der Allergiker wies dabei das geringste Durchschnittsalter mit 31 Jahren auf, die der Polyposis das höchste mit 46 Jahren. Die beiden Gruppen CRS und Kontrolle lagen mit durchschnittlich 39 und 35 Jahren im Mittelfeld.

Die Geschlechterverteilung erwies sich als sehr ausgeglichen. Insgesamt war das männliche Geschlecht dem weiblichen zahlenmäßig mit nur zwei Probanden überlegen. Auch innerhalb der Gruppen war die Geschlechterverteilung ausgewogen.

		Allergie	CRS	Polyposis	Kontrolle	Gesamt
Alter [Jahre]	MW	31	39	46	35	37
	SD	$\pm 11$	$\pm 17$	$\pm 14$	$\pm 14$	$\pm 15$
Geschlechterverteilung (m/w)		17/17	15/12	14/11	15/19	61/59

Tabelle 06: Mittleres Alter und die Geschlechterverteilung der einzelnen Gruppen

## 3.2 Systemische in-vitro Parameter

### 3.2.1 Eosinophile Granulozyten im Blut

Im venösen Vollblut wurden die eosinophilen Granulozyten bestimmt. Der Normbereich des Labors für diesen Wert lag zwischen 80 und 350 Eosinophilen pro  $\mu\text{l}$ . Die Anzahl der eosinophilen Granulozyten ist mit  $310 \pm 226/\mu\text{l}$  Blut in der Polyposis-Gruppe am höchsten, gefolgt von der Allergie-Gruppe mit  $177 \pm 104/\mu\text{l}$  und der Kontrollgruppe mit  $159 \pm 108/\mu\text{l}$ . Der niedrigste Wert wurde in der CRS-Gruppe gefunden. Hier waren  $139 \pm 89/\mu\text{l}$  eosinophile Granulozyten zu finden. Damit gab es signifikante Unterschiede zwischen der Polyposis-Gruppe und der CRS- bzw. Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ). Auch gegenüber der Allergie-Gruppe war ein signifikanter Unterschied festzustellen ( $p < 0,01$ ). Zwischen den drei anderen Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 08, Tabelle 07 & 08).

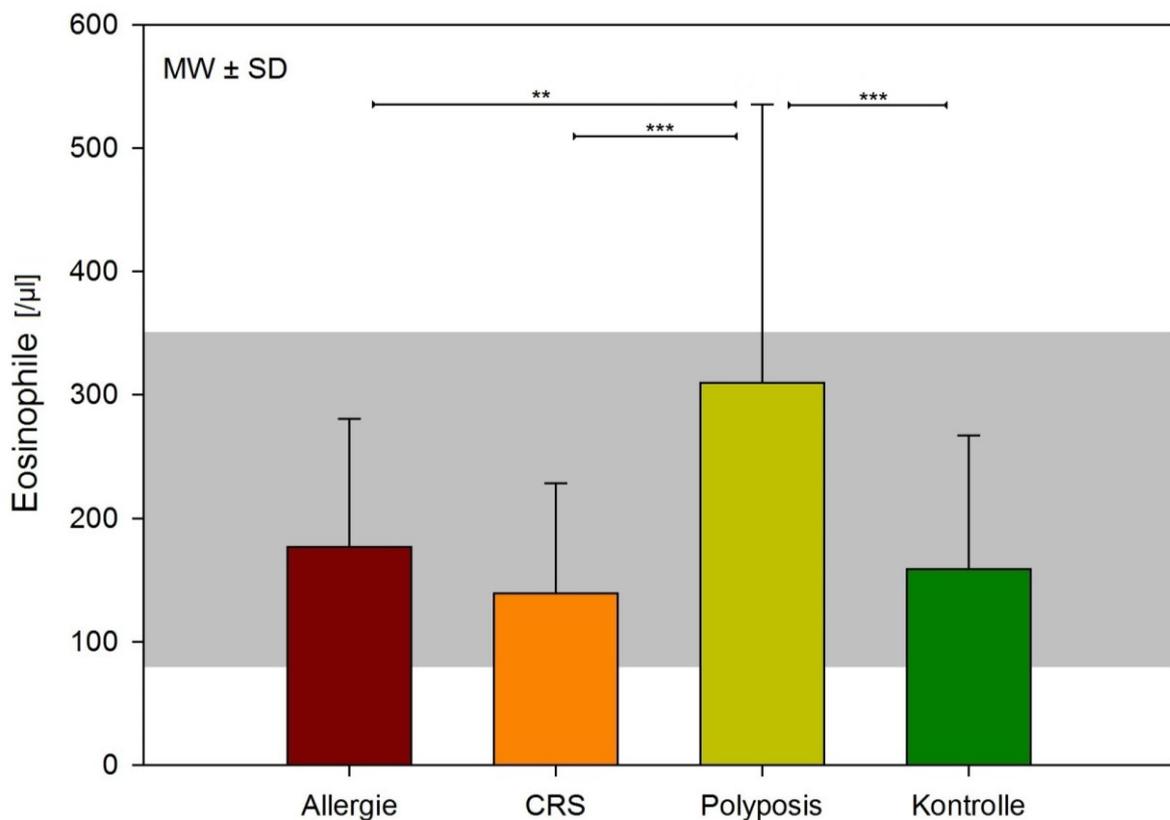


Abbildung 08: Anzahl eosinophiler Granulozyten/ $\mu\text{l}$  Blut in den verschiedenen Gruppen.

Normbereich grau hinterlegt. Signifikanzen: (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$

Gruppe	Anzahl [n]	MW [ $\bar{x}$ ]	SD [ $\sigma$ ]
Allergie	26	177	104
CRS	25	139	89
Polyposis	24	310	226
Kontrolle	29	159	108

Tabelle 07: Gruppenstärken und Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Blut

Vergleich	Differenz der MW	Signifikanz [p]
Polyposis vs. CRS	170,8	<0,001
Polyposis vs. Kontrolle	151,0	<0,001
Polyposis vs. Allergie	133,5	<0,01
Allergie vs. CRS	37,3	n.s.
Kontrolle vs. CRS	19,8	n.s.
Allergie vs. Kontrolle	17,6	n.s.

Tabelle 08: Vergleich der Gruppen bezüglich der eosinophilen Granulozyten im Blut

### 3.2.2 Gesamt IgE im Serum

Aus dem Serum wurde das Gesamt-IgE ermittelt. Der Norm-Grenzwert des Labors lag hier bei 100 U/ml. Die Auswertung des Gesamt-IgE zeigte die höchsten Werte bei der Allergie-Gruppe. Hier wurden im Schnitt  $181 \pm 228$  U/ml gemessen. Auch die Polyposis-Gruppe war im Schnitt mit etwa  $129 \pm 133$  U/ml erhöht. Die CRS-Gruppe sowie die Kontrollgruppe waren mit Werten von  $77 \pm 111$  U/ml und  $40 \pm 38$  U/ml deutlich niedriger (Tabelle 09 & 10). Somit gab es signifikante Unterschiede der Allergie-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ( $p=0,001$ ) sowie der CRS-Gruppe ( $p<0,05$ ) (Abbildung 09). Zwischen den übrigen Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

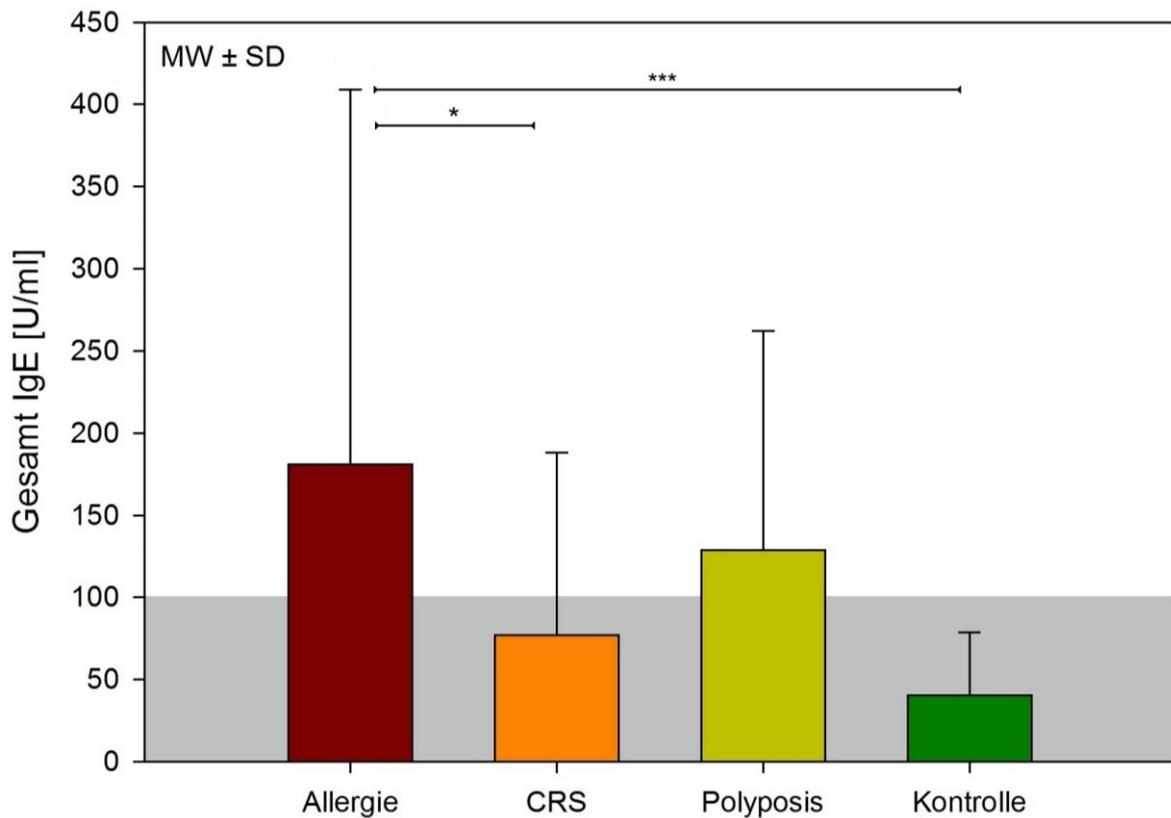


Abbildung 09: Gesamt-IgE der einzelnen Gruppen, Normbereich grau hinterlegt,

Signifikanzen: (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$

Gruppe	Anzahl [n]	MW [x̄]	SD [σ]
Allergie	32	181	228
CRS	26	77	111
Polyposis	24	129	133
Kontrolle	32	40	38

Tabelle 09: Gruppenstärken und Gesamt-IgE im Serum

Vergleich	Differenz der Mittelwerte	Signifikanz [p]
Allergie vs. Kontrolle	140,8	<0,001
Allergie vs. CRS	104,0	<0,05
Polyposis vs. Kontrolle	88,5	n.s.
CRS vs. Kontrolle	36,7	n.s.
Polyposis vs. CRS	51,8	n.s.
Allergie vs. Polyposis	52,2	n.s.

Tabelle 10: Vergleich der Gruppen bezüglich des Gesamt-IgE

### 3.3 Lokale in-vitro Parameter

#### 3.3.1 ECP im Nasensekret

Aus dem gewonnenen Nasensekret erfolgte die Bestimmung des ECP. Der Norm-Grenzwert des Labors lag hier bei 100 ng/ml (Kramer, Burow, Pfrogner & Rasp, 2004). Für die Polyposis-Gruppe wurde ein Wert von  $368 \pm 362$  ng/ml ermittelt, der mit Abstand höchste Wert der Gruppen. Auch die Allergie-Gruppe wies einen leicht erhöhten Mittelwert auf mit  $122 \pm 183$  ng/ml (Tabelle 11). Deutlich unterhalb dieser Grenze lagen die Mittelwerte der CRS-Gruppe ( $77 \pm 100$  ng/ml) und der Kontrollgruppe ( $28 \pm 33$  ng/ml). Damit zeigten sich deutlich signifikante Unterschiede der Polyposis-Gruppe gegenüber den übrigen Gruppen ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 10). Keine Signifikanzen waren hingegen zwischen der CRS-, Allergie- und Kontrollgruppe festzustellen (Tabelle 12).

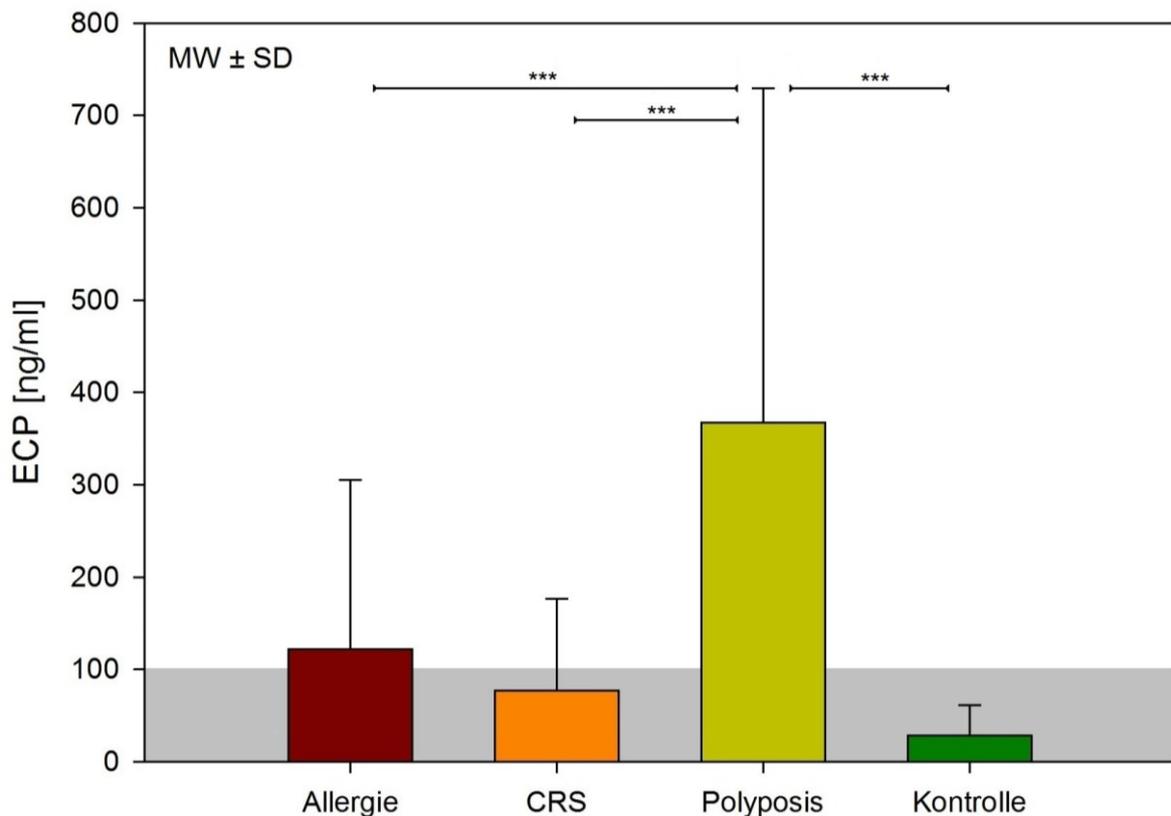


Abbildung 10: Mittlere ECP-Konzentrationen im Nasensekret der verschiedenen Gruppen, Normbereich grau hinterlegt. Signifikanzen: (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$

Gruppe	Anzahl [n]	MW [ $\bar{x}$ ]	SD [ $\sigma$ ]
Allergie	30	122	183
CRS	21	77	100
Polyposis	24	368	362
Kontrolle	29	28	33

Tabelle 11: Gruppenstärken und ECP-Konzentration im Nasensekret

Vergleich	Differenz der Mittelwerte	Signifikanz [p]
Polyposis vs. Kontrolle	339,1	<0,001
Polyposis vs. CRS	290,6	<0,001
Polyposis vs. Allergie	245,6	<0,001
Allergie vs. Kontrolle	93,6	n.s.
Allergie vs. CRS	45,0	n.s.
CRS vs. Kontrolle	48,6	n.s.

Tabelle 12: Vergleich der Gruppen bezüglich der ECP-Konzentration im Nasensekret

### 3.3.2 Tryptase im Nasensekret

Neben der ECP-Konzentration wurde im gewonnenen Nasensekret auch die Tryptase-Konzentration bestimmt. Der Norm-Grenzwert des Labors betrug 20 ng/ml (Kramer et al., 2004). Die Tryptase im Nasensekret war mit durchschnittlich  $32 \pm 35$  ng/ml in der Allergie-Gruppe am höchsten (Tabelle 13). Die Polyposis-Gruppe zeigte im Mittel einen Wert von  $20 \pm 18$  ng/ml, was genau dem vorgegebenen Norm-Grenzwert des Labors entsprach. Die CRS-Gruppe und die Kontrollgruppe lagen beide mit  $11 \pm 15$  ng/ml bzw.  $11 \pm 12$  ng/ml deutlich niedriger. Damit ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der Allergie- und der Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ) bzw. der CRS-Gruppe ( $p < 0,01$ ) (Abbildung 11). Ein Vergleich mit der Polyposis-Gruppe ergab keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 14). Auch die übrigen Gruppen untereinander wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

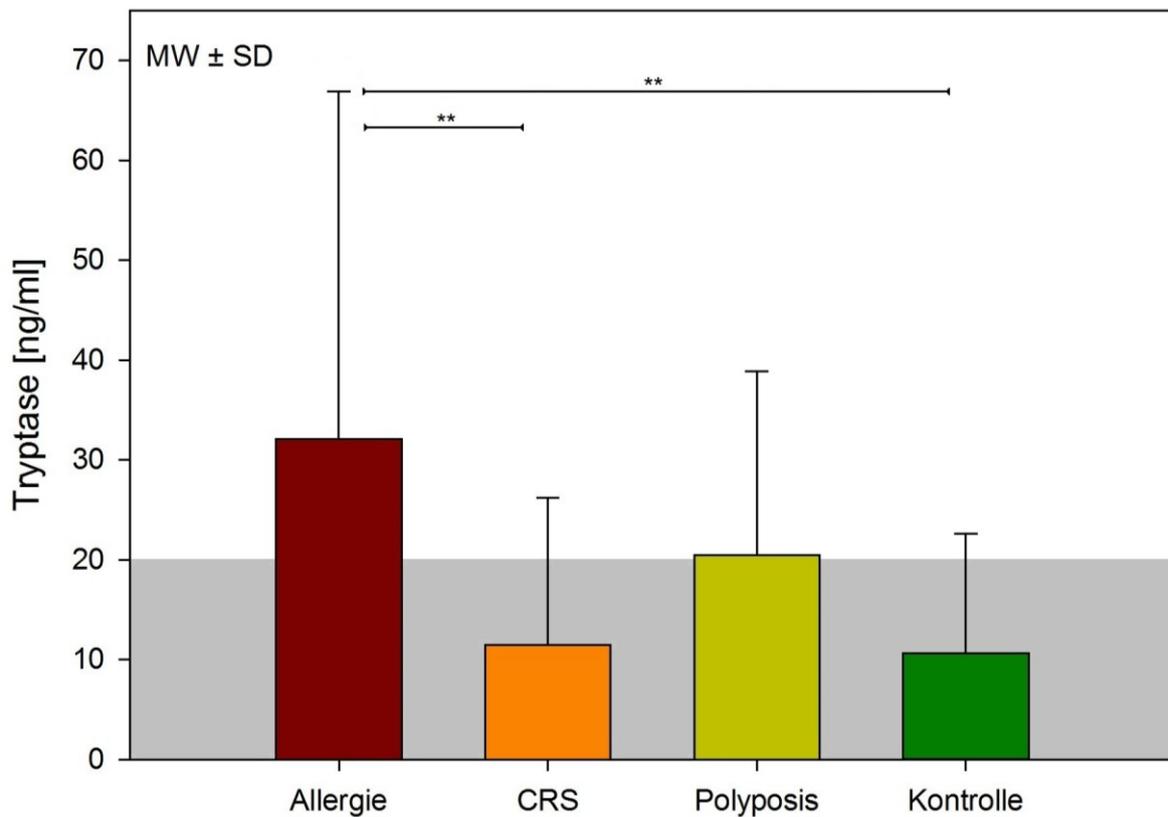


Abbildung 11: Mittlere Tryptase-Konzentration im Nasensekret der einzelnen Gruppen, Normbereich ist grau hinterlegt. Signifikanzen: (\*) p<0,05; (\*\*) p<0,01; (\*\*\*) p<0,001

Gruppe	Anzahl [n]	MW [ $\bar{x}$ ]	SD [ $\sigma$ ]
Allergie	31	32	35
CRS	22	11	15
Polyposis	22	20	18
Kontrolle	30	11	12

Tabelle 13: Gruppenstärken und Tryptase-Konzentration im Nasensekret

Vergleich	Differenz der Mittelwerte	Signifikanz [p]
Allergie vs. Kontrolle	21,5	<0,01
Allergie vs. CRS	20,6	<0,01
Allergie vs. Polyposis	11,7	n.s.
Polyposis vs. Kontrolle	9,8	n.s.
Polyposis vs. CRS	9,0	n.s.
CRS vs. Kontrolle	0,9	n.s.

Tabelle 14: Vergleich der Gruppen bezüglich der Tryptase-Konzentration im Nasensekret

### 3.4 Immunzytochemische Einzelfärbung

#### 3.4.1 Eosinophile Granulozyten im Cytobrush

Die Auszählung der immunzytochemischen Präparate nach ECP ergaben die mit Abstand höchsten Werte in der Polyposis-Gruppe. Hier waren im Durchschnitt  $1979 \pm 3703$  eosinophile Granulozyten pro 100.000 Zellen vorhanden. In der Allergie-Gruppe waren im Mittel noch  $135 \pm 277$  eosinophile Granulozyten zu finden, während in der CRS-Gruppe nur noch  $66 \pm 135$  gezählt werden konnten (Tabelle 15). Damit lag die CRS-Gruppe nur knapp über der Kontrollgruppe mit  $62 \pm 139$  eosinophilen Granulozyten pro 100.000 Zellen. Signifikant erhöht war damit die Anzahl eosinophiler Granulozyten der Polyposis-Gruppe gegenüber den drei anderen Gruppen ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 12). Zwischen der Allergie-, der CRS- und der Kontrollgruppe waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar (Tabelle 16).

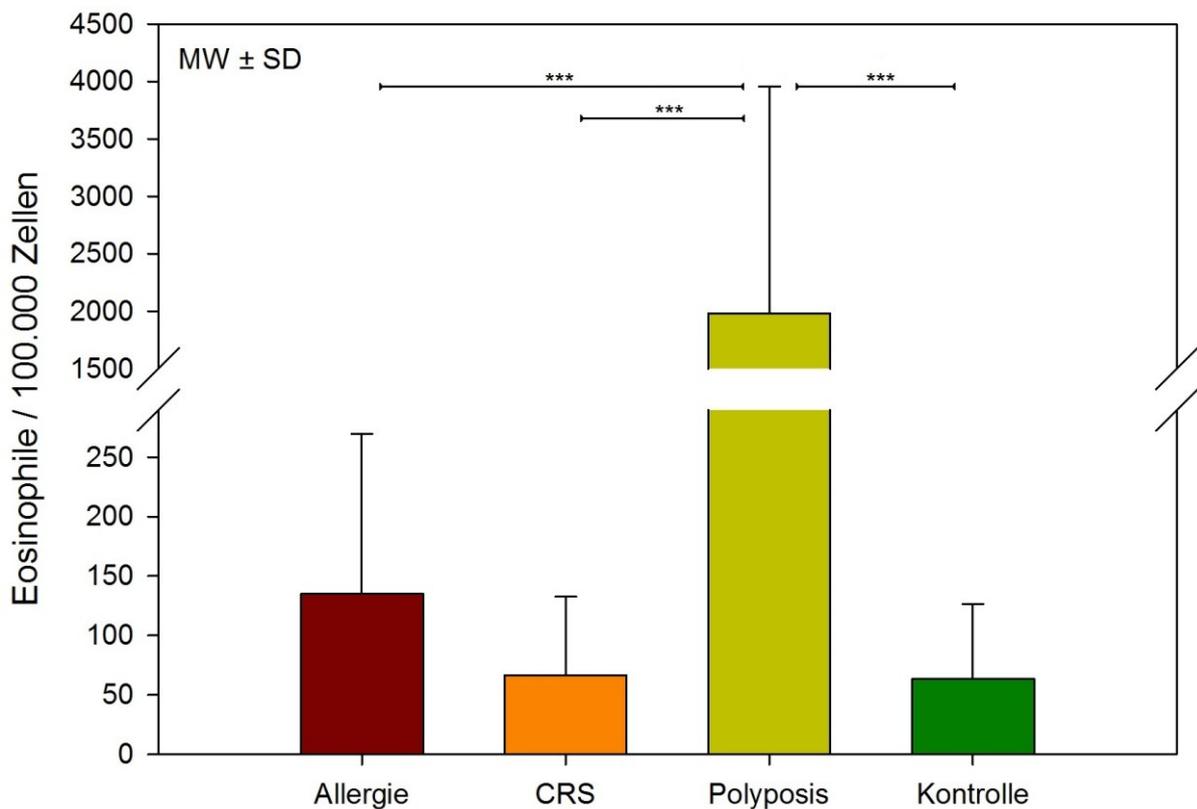


Abbildung 12: Anzahl der nach ECP gefärbten eosinophilen Granulozyten der einzelnen Gruppen,

Signifikanzen: (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$

Gruppe	Anzahl [n]	MW [ $\bar{x}$ ]	SD [ $\sigma$ ]
Allergie	32	135	277
CRS	26	66	135
Polyposis	24	1979	3703
Kontrolle	33	62	139

Tabelle 15: Gruppenstärken und Anzahl eosinophiler Granulozyten im Cytospin

Vergleich	Differenz der Mittelwerte	Signifikanz [p]
Polyposis vs. Kontrolle	1915,9	<0,001
Polyposis vs. Allergie	1844,2	<0,001
Polyposis vs. CRS	1912,9	<0,001
Allergie vs. CRS	68,7	n.s.
CRS vs. Kontrolle	3,1	n.s.
Allergie vs. Kontrolle	71,7	n.s.

Tabelle 16: Vergleich der Gruppen bezüglich der Anzahl eosinophiler Granulozyten im Cytospin

Neben der quantitativen Auswertung war auch die qualitative Bewertung der Präparate von großer Bedeutung, da hiermit die Spezifität der Färbung überprüft wurde. Diese erfolgte direkt im Anschluss an den Färbeprozess unter dem Mikroskop und zwar durch Prüfung der Spezifität der positiv markierten Zellen anhand ihrer Morphologie. Dies war auch für die exemplarischen Doppelfärbungen von grosser Bedeutung. Die Anzahl der positiv markierten Zellen in einem Präparat wurde mittels einer einfachen semi-quantitativ Skala beschrieben und dient lediglich der Demonstration. Diese reichte von 0 (negativ) bis +++ (sehr stark positiv) (Abbildung 13). Eine weitere Auswertung dieser Daten erfolgte nicht, da die Präparate einzeln nach oben genanntem Schema ausgezählt wurden (vgl. 2.5).

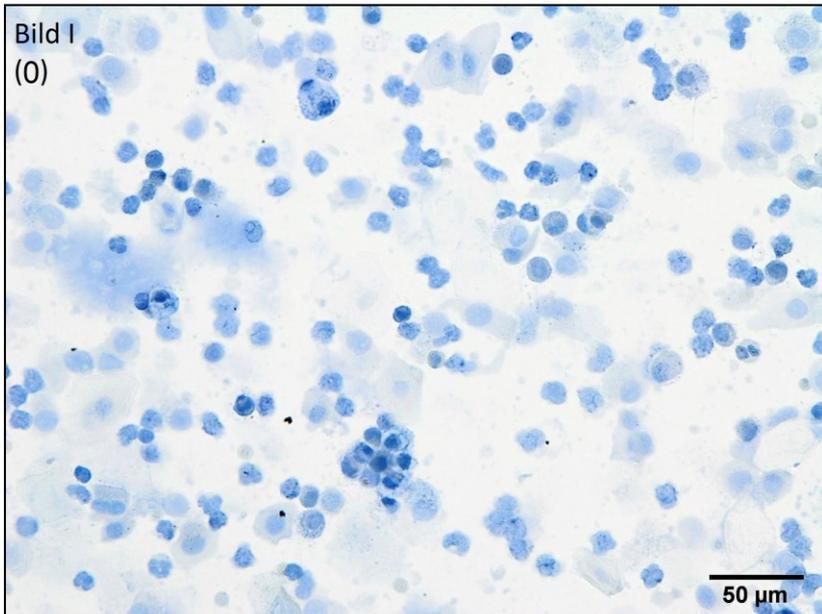


Abbildung 13:  
Cytospins gefärbt nach ECP  
(Vergrößerung: 200x)

Bild I: (negativer Befund):  
morphologisch gut  
erhaltene Epithelzellen  
(schwach blau gefärbtes  
Zytoplasma, stark  
gefärbter Zellkern)  
allerdings ohne eosinophile  
Granulozyten.

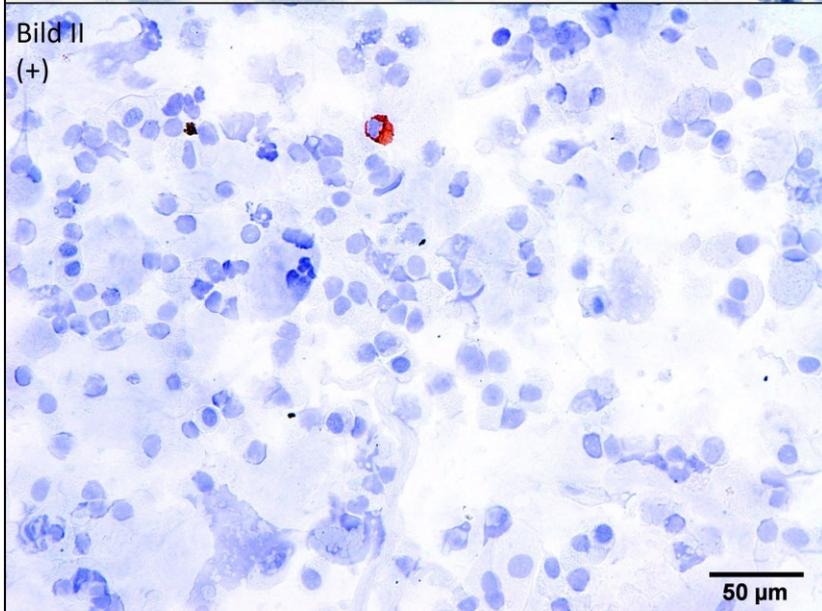


Bild II: (schwach positiver  
Befund):  
ein einzelner eosinophiler  
Granulozyt umgeben von  
zahlreichen Epithelzellen

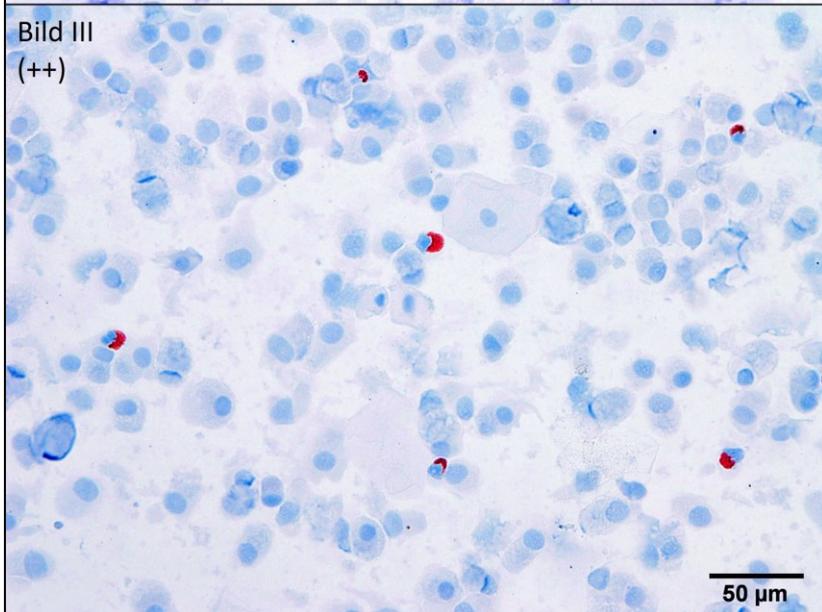


Bild III: (positiver Befund):  
mehrere eosinophile  
Granulozyten innerhalb  
eines Gesichtsfeldes er-  
kennbar, umgeben von  
Epithelzellen

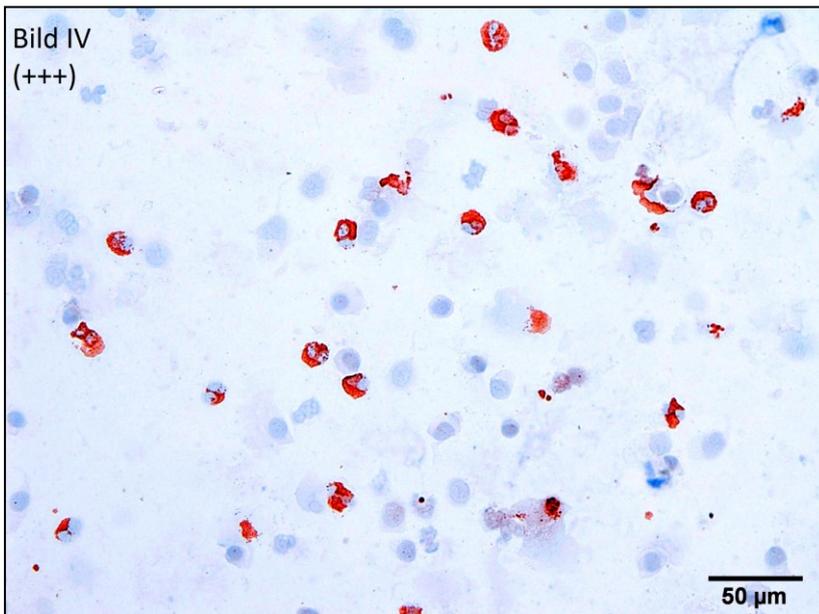


Bild IV: (stark positiver Befund):  
zahlreiche eosinophile Granulozyten innerhalb eines Gesichtsfeldes. Die zahlreichen Granula im Zytoplasma sind deutlich zu erkennen.

### 3.4.2 Mastzellen im Cytobrush

Die Auswertung der Mastzellen wurde analog zu den eosinophilen Granulozyten durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei der Polyposis-Gruppe abermals der höchste Wert mit durchschnittlich  $413 \pm 1317$  Mastzellen pro 100.000 Zellen, gefolgt von der Allergie-Gruppe mit  $36 \pm 68$  positiven Zellen (Tabelle 17). Die Anzahl von Mastzellen war in der CRS- und Kontrollgruppe mit durchschnittlich  $8 \pm 16$  bzw.  $8 \pm 15$  positiven Zellen pro 100.000 Zellen deutlich niedriger und nahezu identisch (Abbildung 14). Aufgrund der hohen Standardabweichung war trotz der hohen Anzahl an Mastzellen in der Polyposis-Gruppe keine Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe oder der CRS-Gruppe feststellbar (Tabelle 18). Auch die Unterschiede zwischen den übrigen Gruppen untereinander zeigten keine Signifikanzen.

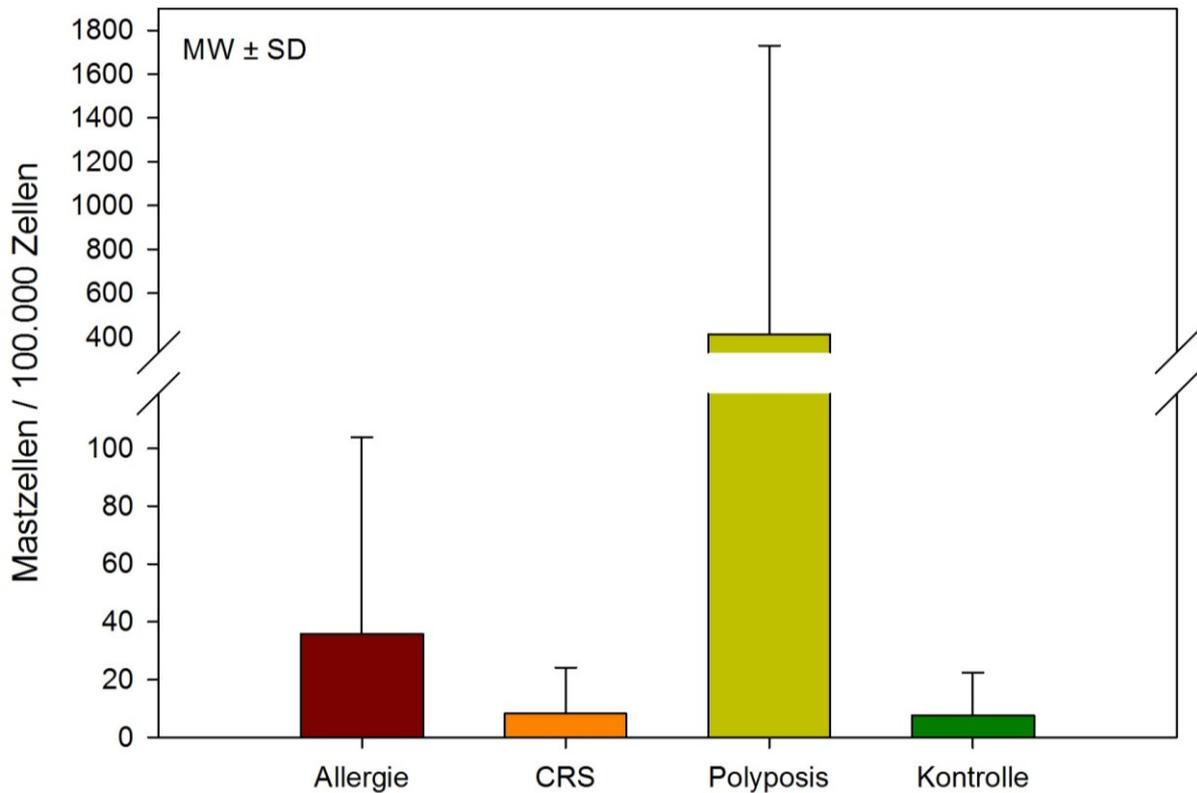


Abbildung 14: Anzahl der nach Tryptase gefärbten Mastzellen der einzelnen Gruppen; es fanden sich keine signifikanten Unterschiede

Gruppe	Anzahl [n]	MW [x̄]	SD [σ]
Allergie	32	36	68
CRS	25	8	16
Polyposis	23	413	1317
Kontrolle	33	8	15

Tabelle 17: Gruppenstärken und Anzahl der Mastzellen im Cytospin

Vergleich	Differenz der Mittelwerte	Signifikanz [p]
Polyposis vs. Kontrolle	405,4	n.s.
Polyposis vs. Allergie	377,2	n.s.
Polyposis vs. CRS	404,9	n.s.
Allergie vs. CRS	27,7	n.s.
Allergie vs. Kontrolle	28,2	n.s.
CRS vs. Kontrolle	0,5	n.s.

Tabelle 18: Vergleich der Gruppen bezüglich der Anzahl an Mastzellen im Cytospin

Analog zur Auswertung der eosinophilen Granulozyten erfolgte auch bei der Auswertung der Mastzellen eine Prüfung der Spezifität. Außerdem wurde, wie schon zuvor, die Anzahl positiver Zellen semi-quantitativ erfasst und mittels der gleichen Skala von 0 (negativ) bis +++ (sehr stark positiv) beschrieben (Abbildung 15).

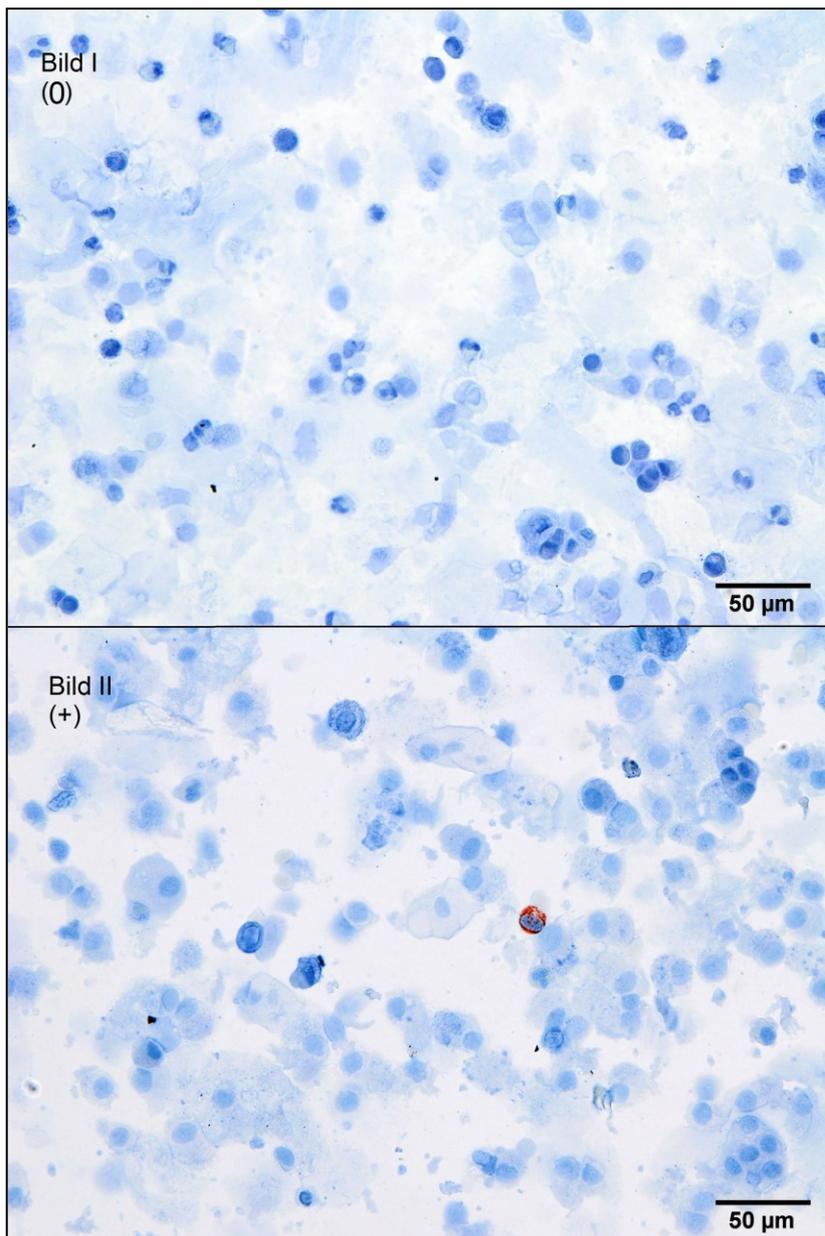


Abbildung 15: Cytospins gefärbt nach Tryptase (Vergrößerung: 200x)

Bild I: (negativer Befund):

Die morphologisch gut erhaltenen Epithelzellen sind gut zu erkennen. Mastzellen sind hier nicht nachweisbar.

Bild II: (schwach positiver Befund):

Eine einzelne Mastzelle ist zu erkennen. Die gefärbten Granula sind deutlich zu erkennen.

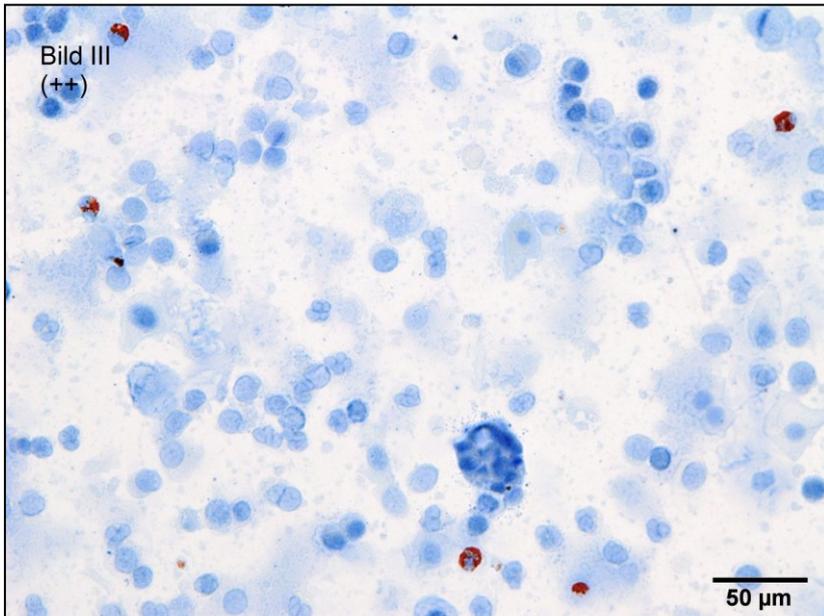


Bild III: (positiver Befund):  
Mehrere Mastzellen sind innerhalb eines Gesichtsfeldes erkennbar.

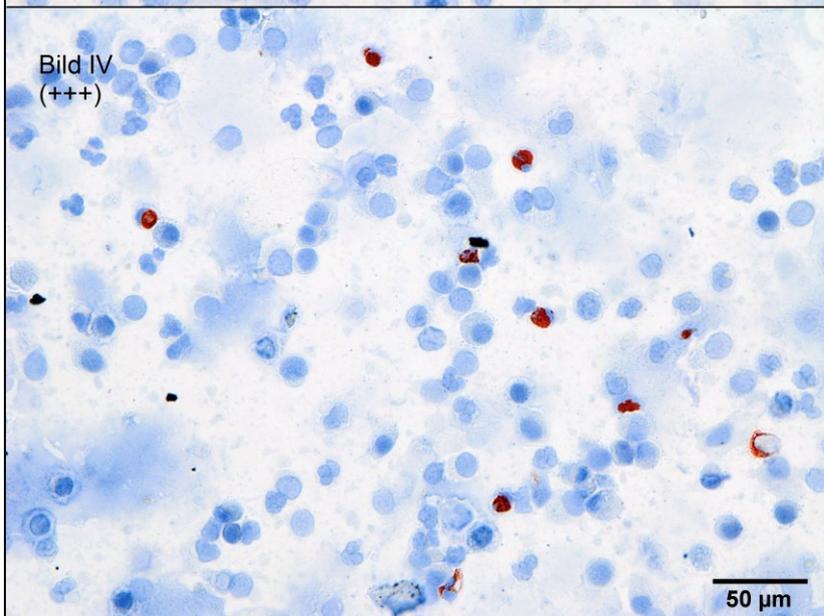


Bild IV: (stark positiver Befund):  
Hier sind zahlreiche Mastzellen innerhalb eines Gesichtsfeldes zu erkennen.

### 3.5. Korrelationen

Bei der weiteren Auswertung der Daten wurden die gemessenen Werte untereinander verglichen. Dabei wurden die Werte kumulativ und damit unabhängig von der Gruppeneinteilung zueinander betrachtet. Hierbei waren einige signifikante Korrelationen, wie zwischen dem Gesamt-IgE und der Anzahl eosinophiler Granulozyten im Blut festzustellen ( $p < 0,05$ ). Des Weiteren waren signifikante Unterschiede zwischen den eosinophilen Granulozyten im Blut und den gemessenen ECP-Werten im Nasensekret ( $p < 0,05$ ) sowie der Anzahl eosinophiler Granulozyten der Cytospins ( $p < 0,01$ ) erkennbar. Ebenso war dies bei den ECP-Werten im Nasensekret und den eosinophilen Granulozyten des Cytospins der Fall ( $p < 0,01$ ). Der Korrelationskoeffizient bewegte sich bei allen genannten Gruppen zwischen 0,215 und 0,310. Diese Werte lassen daher nur bedingt den Rückschluss einer Korrelation zu. Der deutlichste Zusammenhang bestand zwischen den eosinophilen Granulozyten aus Blut und Cytospin. Hier war der höchste Korrelationskoeffizient ( $r = 0,310$ ) bei niedrigstem  $p$  zu finden (Tabelle 19).

Ein Zusammenhang zwischen der gemessenen Tryptase aus der Nasenwatte und den Mastzellen des Cytospins oder auch dem Gesamt-IgE konnte nicht gefunden werden (Tabelle 20).

		Eosinophile im Blut	ECP der Nasenwatte	Eosinophile im Cytospin
IgE	r	0,215	0,152	0,0215
	p	<0,05	n.s.	n.s.
Eosinophile im Blut	r	-	0,228	0,310
	p	-	<0,05	<0,01
ECP der Nasenwatte	r	-	-	0,287
	p	-	-	<0,01

Tabelle 19: Korrelation der Werte IgE, ECP, eosinophiler Granulozyten im Blut und im Cytospin  
Korrelationskoeffizient [r] (max. Wert für lineare pos. Korrelation +1; max. Wert für lineare neg. Korrelation -1); Signifikanz-Wert [p] (Signifikanz bei  $p < 0,05$ )

		Tryptase	Mastzellen Cytospin
IgE	r	-0,0162	-0,0542
	p	n.s.	n.s.
Tryptase	r	-	0,00317
	p		n.s.

Tabelle 20: Korrelation der Werte IgE, Tryptase und der Mastzellen im Cytospin

Korrelationskoeffizient [r] (max. Wert für lineare pos. Korrelation +1; max. Wert für lineare neg. Korrelation -1); Signifikanz-Wert [p] (Signifikanz bei  $p < 0,05$ )

### 3.6 Immunzytochemische Doppelfärbung

In der Literatur finden sich Hinweise, dass auch in neutrophilen Granulozyten ECP gefunden wurde (Abu-Ghazaleh et al., 1992; Bystrom et al., 2002; Sur et al., 1998). Aufgrund dieser Tatsache erschien eine Unterscheidung genau dieser beiden Zellpopulationen als wichtig, um neutrophile Granulozyten als potentielle Quelle des ECP auszuschließen. Daher lag bei der Auswertung der Doppelfärbung das Augenmerk auf der Spezifität der Färbung. Bewusst wurde bei der Doppelfärbung der gleiche Antikörper (ECP) und dasselbe Verfahren wie bei der Einzelfärbung verwendet. Bei der Doppelfärbung musste allerdings auf einen anderen Farbstoff (Fluoreszenzfarbstoff) zurückgegriffen werden. Dieser färbte unter dem Fluoreszenzmikroskop die durch Antikörper markierten eosinophilen Granulozyten grün. Der zweite Fluoreszenzfarbstoff markierte im gleichen Präparat die neutrophilen Granulozyten rot. Diese waren zuvor, wie oben beschrieben, durch den entsprechenden Antikörper gegen neutrophile Elastase, einen spezifischen Marker für neutrophile Granulozyten, markiert worden (Lammers, van de Kerkhof, Schalwijk & Mier, 1986; Venge, 1994). Da sich die beiden Farben nicht gleichzeitig an ein und derselben Zelle befanden, konnten die beiden Granulozytenpopulationen eindeutig unterschieden werden. Um dies zu verdeutlichen wurden die einzelnen Farbtöne auch in der Auswertung separat und akkumuliert dargestellt. Damit konnte verhindert werden, dass eine schwache Färbung durch einen anderen, stärkeren Farbton überlagert und somit übersehen

wird. Die zusätzliche Kernfärbung diente dem besseren Kontrast und der besseren Visualisierung aller enthaltenen Zellen. Hierdurch wurden auch die Kerne der zahlreich vorhandenen Epithelzellen sichtbar. Erst zum Schluss wurden die Einzelbilder überlagert. Das jeweilige Bild im rechten unteren Quadranten entspricht somit der Summe der geschossenen Einzelaufnahmen (Abbildungen 16 bis 20). Zusätzlich wurde eine Gewebeprobe einer unteren Nasenmuschel als Referenz analysiert.

Die Ergebnisse dieser Studie geben somit keinen Hinweis darauf, dass ECP auch in neutrophilen Granulozyten vorkommen könnte. Die Färbemethoden nach ECP und Elastase stellen damit spezifische Verfahren dar, um die einzelnen Granulozytenpopulationen zuverlässig zu unterscheiden.

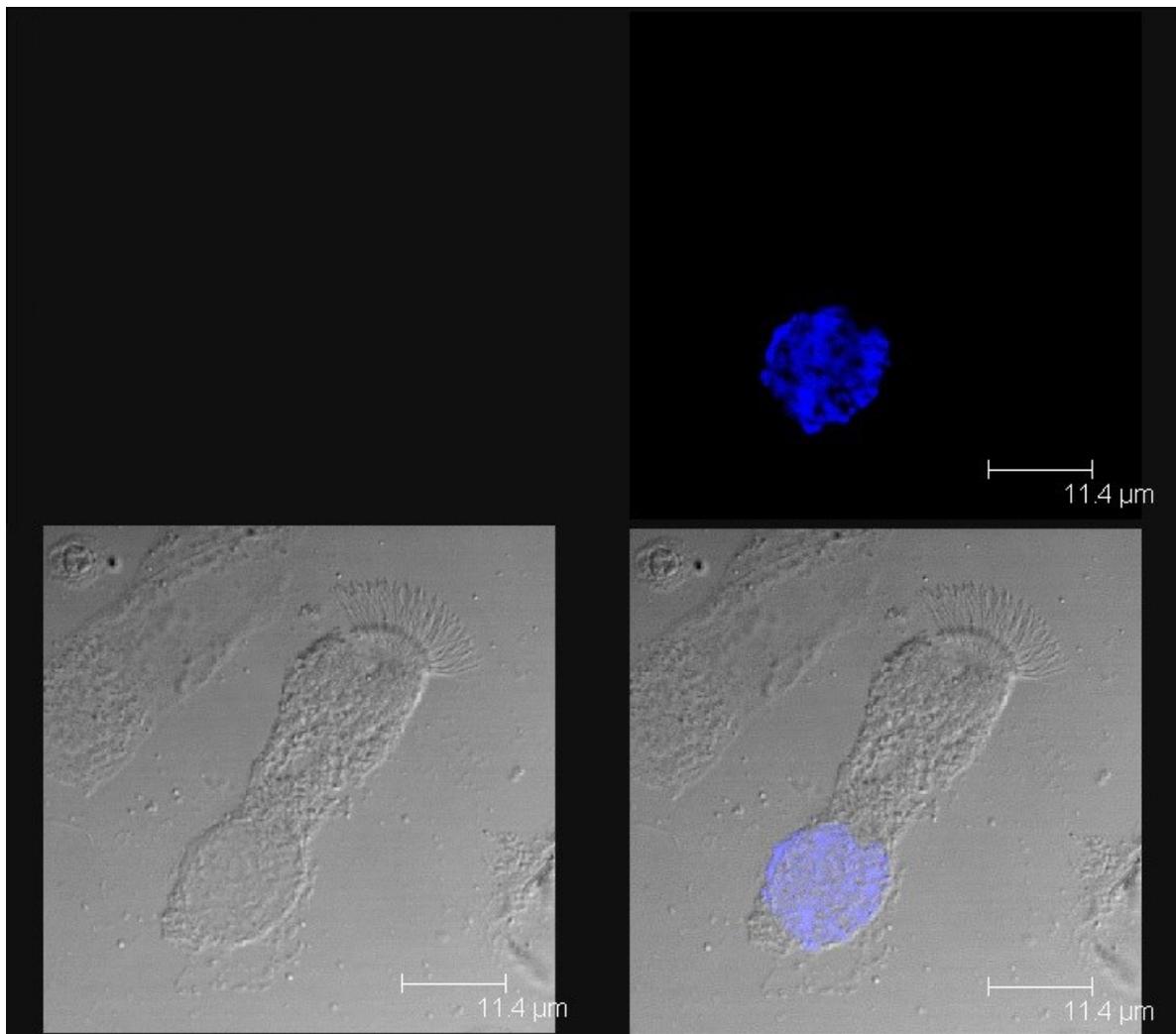


Abbildung 16 : Fimmerepithelzelle aus einem Nasenbrush-Präparat. Die Kernfärbung ist blau dargestellt. Ein Nachweis von ECP (grün) oder neutrophiler Elastase (rot) ist nicht zu finden.

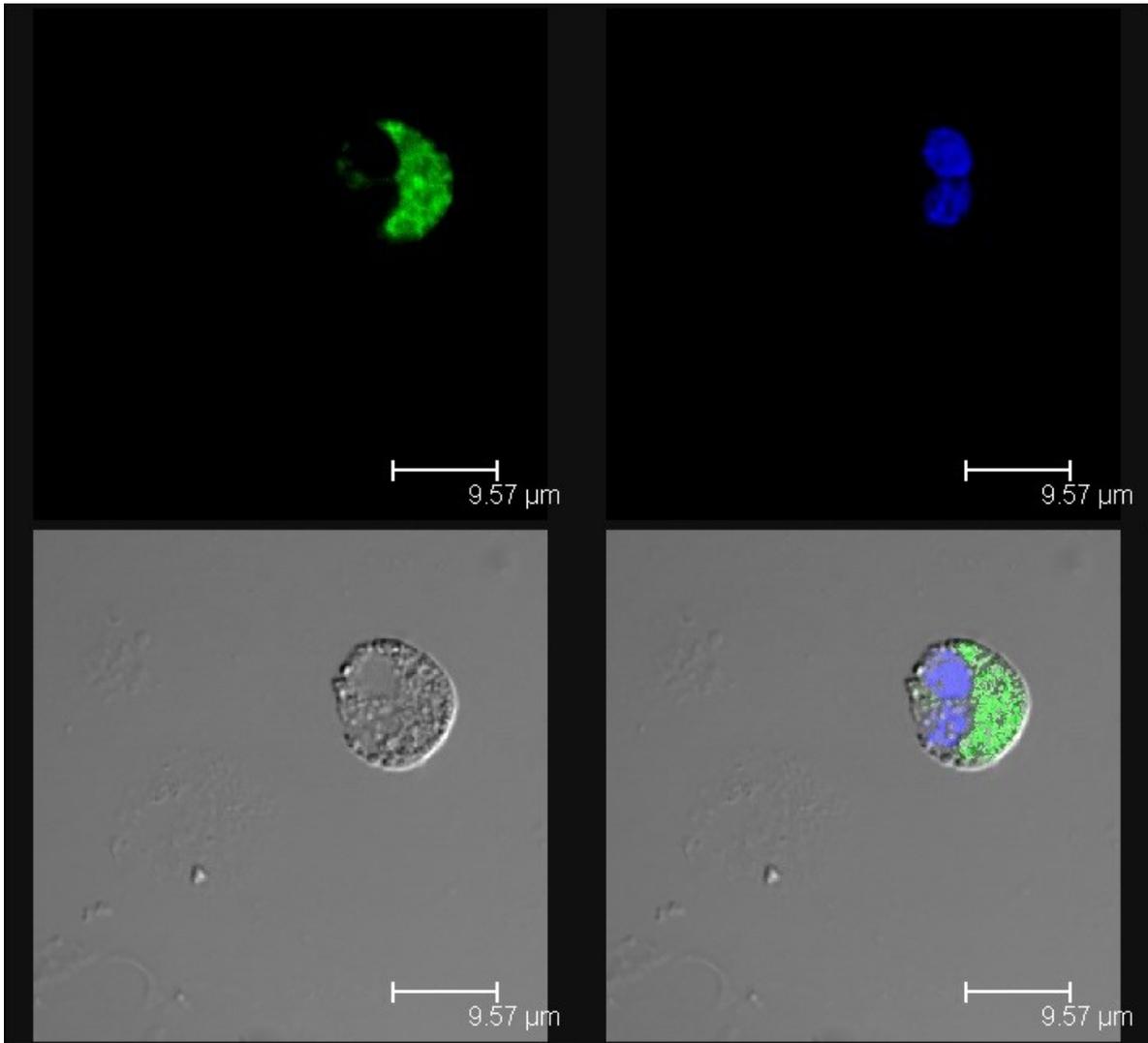


Abbildung 17: Dargestellt ist ein eosinophiler Granulozyt aus einem Cytobrush-Präparat. Die Granula sind grün gefärbt, der Kern ist blau dargestellt

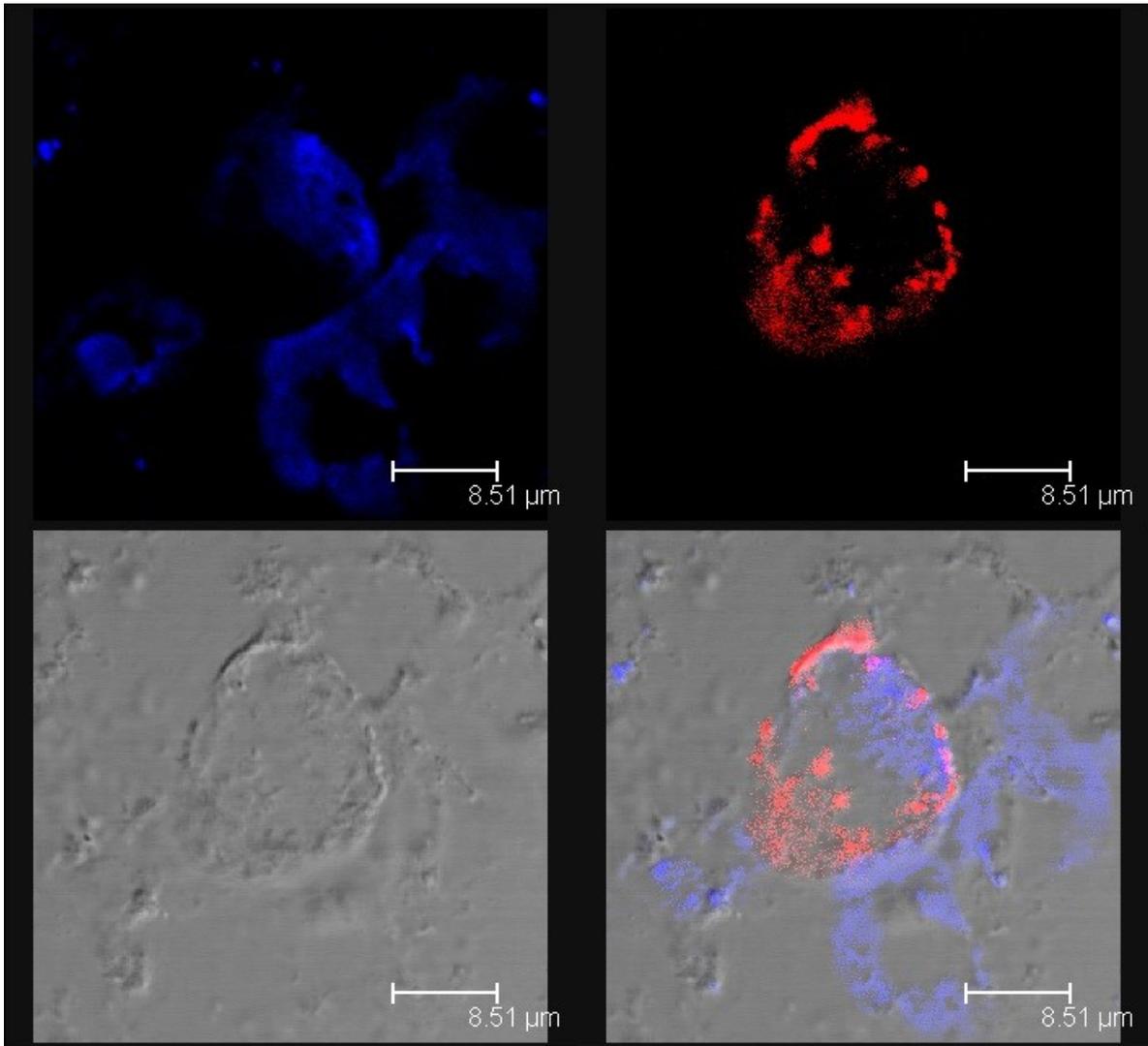


Abbildung 18: Dargestellt ist ein neutrophiler Granulozyt aus einem Cytobrush-Präparat. Im Zytoplasma ist der Bereich der Granula rot gefärbt.

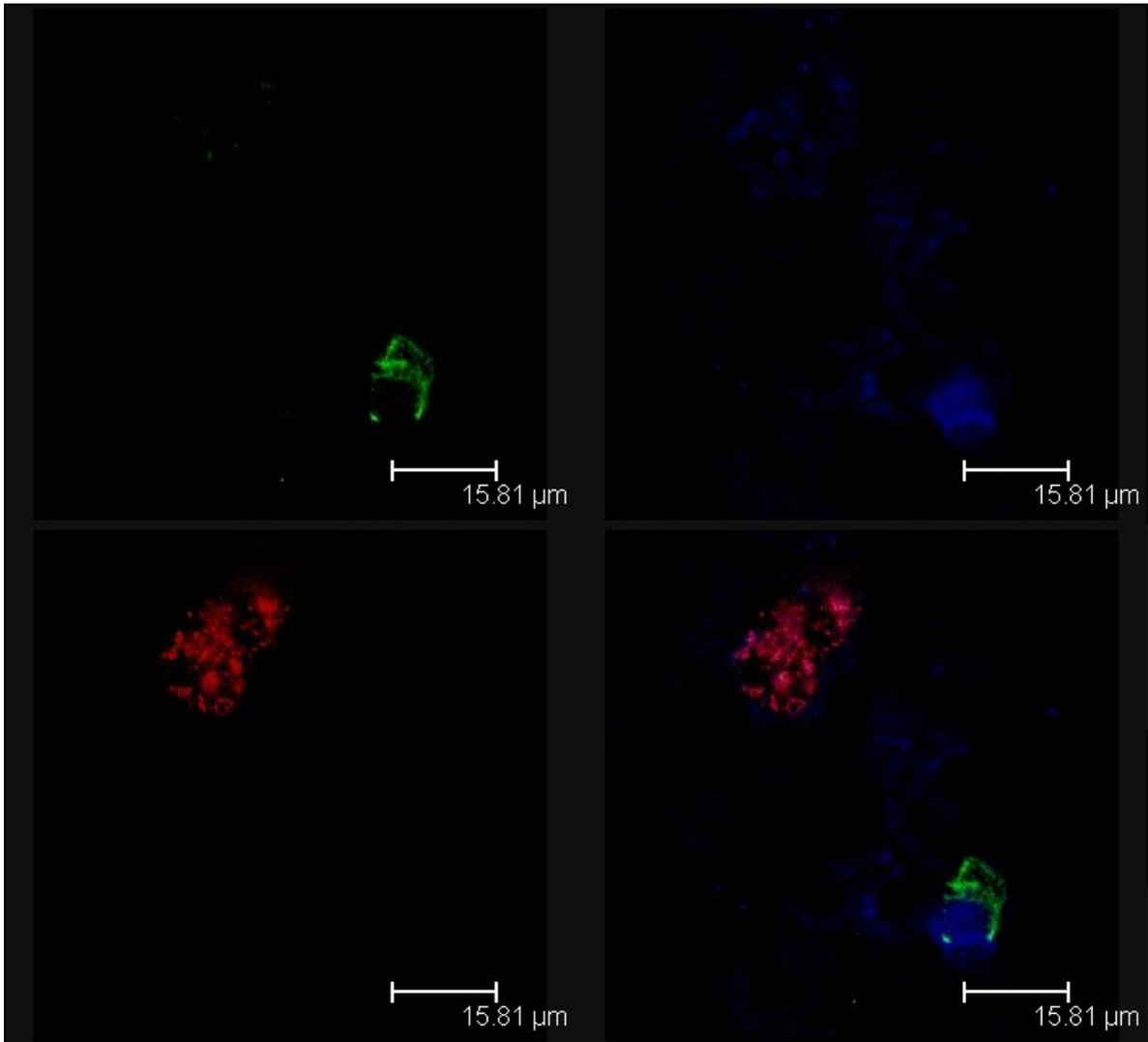


Abbildung 19: Dargestellt sind sowohl ein eosinophiler (grün, Bild oben links) als auch ein neutrophiler Granulozyt (rot, Bild unten links) aus einem Cytobrush-Präparat. Die Farben markieren, wie schon oben beschrieben, die Granula im Zytoplasma. Die Kerne sind blau dargestellt (Bild oben rechts). Da die Farben der markierten Zellen nicht ineinander übergehen sondern klar voneinander abgrenzbar sind, lassen sich die neutrophilen von den eosinophilen Granulozyten eindeutig voneinander unterscheiden  
(Das Bild unten rechts stellt die Summe der drei Einzelbilder dar).

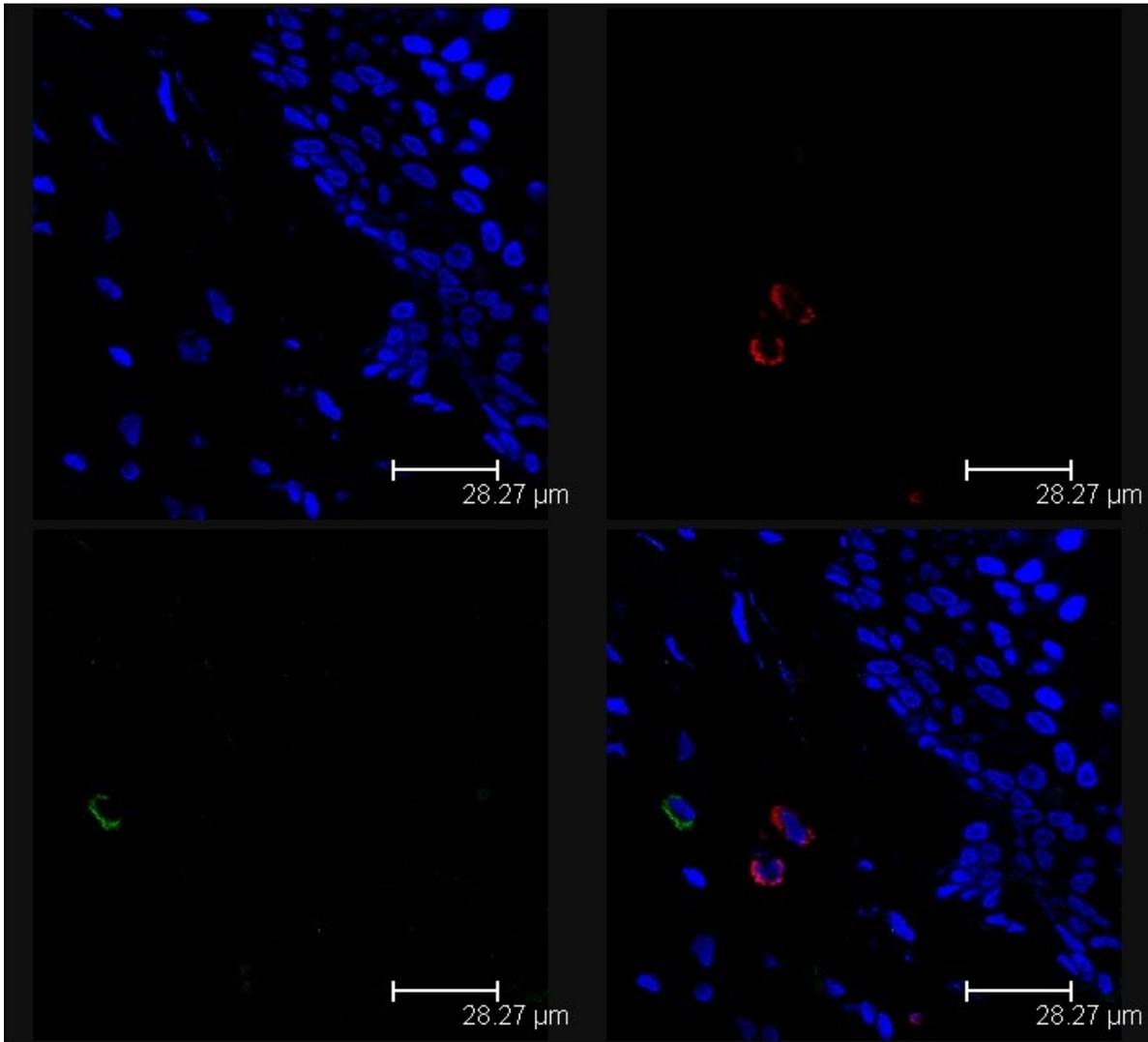


Abbildung 20: Abgebildet ist der Ausschnitt eines Nasenmuschelepithels. Der Gewebeschnitt wurde derselben Färbeprozedur unterzogen wie die Cytobrush-Präparate. Die zahlreichen blau markierten Zellkerne in der jeweils rechten oberen Ecke bilden die Epithelschicht der Nasenmuschel ab. Darunter gelegen (im linken unteren Bereich der vier Bilder) finden sich drei Granulozyten, von denen zwei neutrophile (rot) und einer eosinophile (grün) Granula aufweisen. Eine Vermengung der beiden Farbmarkierungen ist auch hier nicht erkennbar, wodurch die markierten Zellen den jeweiligen Granulozytenpopulationen eindeutig zugeordnet werden konnten.



## **4. Diskussion**

Chronische nasale Erkrankungen sind ein häufiges Krankheitsbild in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Einen großen Anteil daran haben die in dieser Studie behandelten Gruppen. Sie sind deshalb oft Grund für Arztkonsultationen. Die Ursachen einiger Krankheiten und deren möglicher Zusammenhang mit anderen Erkrankungen sind dabei vielfach noch ungeklärt. In der Diagnostik gibt es deshalb oft viele unterschiedliche Ansätze. Neben der Bestimmung von systemischen Parametern stehen besonders die lokalen krankheitsbezogenen Parameter im Fokus der Aufmerksamkeit, da man sich von diesen eine genauere Diagnostik erhofft.

### **4.1 Diskussion der Methodik**

#### **4.1.1 Gruppeneinteilung**

Wie oben beschrieben, gingen der Gruppeneinteilung eine eingehende HNO-ärztliche Untersuchung sowie eine gründliche Beurteilung der Laborergebnisse anhand der klinisch relevantesten Befunde voraus. Die klinisch dominierende Erkrankung ließ sich anhand des Fragebogens mit den vorherrschenden Symptomen identifizieren. Entscheidend für die Eingruppierung war aber letztendlich das Gesamtbild aus Symptomen und Untersuchungsergebnissen.

Da die Einteilung in die beschriebenen vier Gruppen erfolgte und keine zusätzlichen Parameter bestimmt wurden, konnte allerdings bei der Interpretation keine Rücksicht auf eventuell vorhandene systemische Erkrankungen genommen werden. Mögliche systemische Erkrankungen könnten aber somit die Ergebnisse beeinflusst haben. So zeigen eine ganze Reihe von Erkrankungen ebenfalls eine erhöhte eosinophile Granulozytenanzahl, wie beispielsweise latente Infektionen oder gestörte Interaktionen mit anderen Immunzellen (Kita, 2011).

Neben dem eventuellen gleichzeitigen Auftreten von nicht diagnostizierten Krankheiten bzw. Anomalien waren auch simultane Erkrankungen aus mehreren Gruppen möglich. Dementsprechend wurde beispielsweise bei hochgradiger

Polyposis nasi und einer simultanen schwach ausgeprägten saisonalen Allergie der Proband der Polyposis-Gruppe zugeordnet. Zusätzlich zeigten Prick-Tests bei allen betroffenen Allergikern deren spezifische Sensibilisierungen. Hierdurch konnten die Probanden hinsichtlich ihrer Allergie in perenniale und saisonale Allergiker unterteilt werden. Dies war bei der Auswertung der Ergebnisse sehr wichtig, da sich die Studie über einen längeren Zeitraum erstreckte. Somit wurden z.B. saisonale Allergiker nicht zwangsläufig der Allergie-Gruppe zugeordnet, wenn sie deutlich außerhalb der Expositionszeit getestet worden waren. Auf diese Weise sollten falsche Gruppenzuordnungen vermieden werden. Auch Stoop et al. kamen zu der Erkenntnis, dass simultane Erkrankungen zu stark erhöhten Messergebnissen führen können. Die genannte Studie bezog sich dabei auf allergisches Asthma und COPD in Verbindung mit Polyposis nasi. Daher muss davon ausgegangen werden, dass auch andere Krankheitsbilder die Anzahl eosinophiler Granulozyten beeinflussen können.

Auch innerhalb einer Gruppe war die Krankheits- und Symptomausprägung nicht homogen. Sowohl der Grad als auch die Dauer der Erkrankung konnte deutlich schwanken. So wurden beispielsweise Patienten mit Polyposis nasi unabhängig vom Grad der Erkrankung gleichermaßen in die Polyposis-Gruppe aufgenommen, sofern es sich um die dominierende Erkrankung handelte. Auch in der Erkrankungsdauer waren deutlich Unterschiede festzustellen. In der Allergie-Gruppe befanden sich damit sowohl saisonale als auch perenniale Allergiker gleichermaßen. Eine weitere Unterteilung der Gruppen in beispielsweise perenniale und saisonale Allergiker oder Polyposis Grad 1-2 versus Grad 3-4 erschien aufgrund der zu geringen Fallzahl als nicht sinnvoll. Ebenso galt dies für Patienten mit simultanen Erkrankungen aus mehreren Gruppen, wie z.B. Polyposis nasi und Allergie oder CRS und Polyposis.

#### 4.1.2 Materialgewinnung

Um die Messergebnisse später miteinander vergleichen zu können, war eine exakt durchgeführte Materialgewinnung von großer Wichtigkeit. Bei der Nasenwatte war sowohl die Größe als auch die genaue Lokalisation des Watteröllchens entscheidend. Ein zu groß gedrehtes Watteröllchen hätte aus dem mittleren Nasengang in den Bereich des Nasenvorhofs und bis an die untere Nasenmuschel geragt. Die Nasenwatte hätte dann möglicherweise auch Sekret aus dem unteren Bereich der Nasenhöhle aufsaugen können. Da hier der Ductus nasolacimalis in die Nasenhaupthöhle mündet, wäre dadurch die Konzentration von ECP und Tryptase verdünnt worden, was zu falschen, nämlich zu niedrigen Ergebnissen geführt hätte. Da bei sämtlichen Probanden ausschließlich eine untersuchende Person die Nasenwatte einlegte, war ein hoher Grad an Standardisierung bzw. eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet. Auch beim Sammeln von Schleimhautzellen mittels Cytobrush war auf eine exakte Ausführung zu achten. Der Brush sollte in demselben Bereich erfolgen wie das Sammeln des Nasensekrets. Auch wenn der Brush unter direkter Sicht erfolgte, begann durch akzidentelles Berühren weiter anterior gelegener Schleimhaut das Sammeln von Zellen mitunter schon vor dem Zielbereich - wenn auch nur in geringem Ausmaß. Aufgrund von anatomischen Engstellen, wie beispielsweise bei starken Nasenseptumdeviationen, konnte ein vollständig berührungsfreies Einführen des Cytobrush bis an die gewünschte Stelle an der mittleren Nasenmuschel nicht immer gewährleistet werden. Somit ist wahrscheinlich, dass sich an einigen Cytobrushs auch eine geringe Anzahl von Zellen aus dem Nasenvorhof und/oder des vorderen Nasenseptums befinden. Auch wurden aufgrund der Größe des Cytobrushs nicht nur Zellen vom angepeilten Zielbereich der mittleren Nasenmuschel gewonnen, sondern zwangsläufig auch Zellen vom gegenüberliegenden Septum und vom Rücken der unteren Nasenmuschel. Um diese Fehlerquelle möglichst klein zu halten, wurde auch der Cytobrush immer von derselben Person durchgeführt. Die genaue Lokalisation der Probenentnahme im Bereich der mittleren Nasenmuschel ist wichtig, um später sinnvolle Referenzwerte zu bekommen. So belegen diverse Studien, dass die Konzentration eosinophiler Granulozyten eines Patienten im Bereich der mittleren Nasenmuschel höher ist als

beispielsweise an der unteren Nasenmuschel (Bernstein, Gorfien, Noble & Yankaskas, 1997; Jahnsen, Haraldsen, Aanesen, Hays & Brandtzaeg, 1995; Stoop, van der Heijden, Biewenga & van der Baan, 1993). Bernstein et al. untersuchten und verglichen verschiedene Regionen von Schleimhautbiopsien an 16 Patienten, die sich einer FESS unterzogen hatten. Keiner der Probanden wurde mit systemischen oder lokalen Glukokortikoiden behandelt, allerdings befanden sich unter den Probanden 4 Allergiker, die durch einen Prick-Test bestätigt wurden. Die Schleimhautproben wurden mittels Hämatoxylin-Eosin und einer 'vital new red stain for Eos'-Technik (Duffy, 1993) gefärbt und unter dem Lichtmikroskop (400-fache Vergrößerung) ausgewertet. Die drei Entnahmeorte der Biopsien waren dabei genau festgelegt: 1,5 cm dorsal der unteren Nasenmuschelspitze, mittlerer Abschnitt der mittleren Muschel und ein Polyp von der lateralen Nasenwand bzw. der mittleren Nasenmuschel. Die Ergebnisse zeigten eine stetige Zunahme an eosinophilen Granulozyten in den Schleimhautbiopsien: ausgehend von der unteren Nasenmuschel mit nur vereinzelten eosinophilen Granulozyten über die mittlere Nasenmuschel mit einer deutlich größeren Anzahl positiver Zellen - allerdings weniger als 50 pro Gesichtsfeld - bis zur höchsten Konzentration an eosinophilen Granulozyten im Polypengewebe. Hier waren die eosinophilen Granulozyten der vorherrschende Immunzell-Typus, der allerdings stark degranuliert vorlag. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Studie von Jahnsen et al., die 15 Patienten mit Polyposis nasi untersuchte. Hier waren allerdings topische Glukokortikoide (7 Patienten) und Antihistaminika (2 Patienten) kein Ausschlusskriterium. Analog zu der Studie von Bernstein et al. wurden aber auch hier Schleimhautbiopsien von der unteren und mittleren Nasenmuschel sowie von Nasenpolypen genommen. Hier kam eine komplexe Dreifachfärbung von Leukozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten zur Anwendung. Die Ergebnisse zeigten eine nur sehr gering erhöhte Anzahl von eosinophilen Granulozyten in der Schleimhaut der mittleren gegenüber der unteren Nasenmuschel. Ein signifikanter Anstieg der eosinophilen Granulozytenanzahl war allerdings auch hier im Polypengewebe festgestellt worden. Etwas weiterführender und mit detaillierteren Ergebnissen ist eine Studie von Stoop et al., die 46 an Polyposis nasi erkrankte Patienten sowie 10 Kontrollen untersuchte. Topische Glukokortikoide waren hier ein Ausschlusskriterium. Die Patienten hatten neben

einer Polyposis nasi auch andere Erkrankungen wie Allergien (35%), COPD (24%) oder Asthma (22%). Fast zwei Drittel der Patienten wiesen außerdem eine erhöhte Anzahl eosinophiler Granulozyten in der Blutprobe auf. Wie bei den beiden vorher genannten Studien waren auch hier Schleimhautbiopsien von der unteren und mittleren Nasenmuschel sowie Polypengewebe Gegenstand der Untersuchung. Zusätzliche Biopsien zur Verlaufskontrolle wurden noch nach 6 und 12 Monaten entnommen. Die Anfärbung eosinophiler Granulozyten erfolgte mit drei unterschiedlichen Antikörpern, von denen einer spezifisch nur aktivierte eosinophile Granulozyten markierte. Die Ergebnisse aller untersuchten Biopsien zeigten einen Anstieg eosinophiler Granulozyten von unterer zu mittlerer Nasenmuschel und zu Polypengewebe. Interessanterweise konnten im Gegensatz zu der Patientengruppe bei der Kontrollgruppe keine aktivierten eosinophilen Granulozyten in den Nasenmuschelbiopsien nachgewiesen werden. Insgesamt waren bei der letztgenannten Gruppe auch signifikant weniger eosinophile Granulozyten nachweisbar. Auffallend war auch das Ergebnis, dass die Biopsien der unteren Nasenmuschelschleimhaut keine Unterschiede zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe aufwiesen. Ebenso wenig war ein Unterschied zwischen mittlerer und unterer Nasenmuschelbiopsie innerhalb der Kontrollgruppe feststellbar. All diese Ergebnisse unterstützen die These, dass dem Entnahmeort von Zellproben oder Biopsien entscheidende Bedeutung zukommt. Vor allem wird hierdurch aber deutlich, dass die zur Probengewinnung vielfach verwendete untere Nasenmuschel kaum relevante Ergebnisse bezüglich der eosinophilen Inflammation liefern kann. Das Nichtbeachten dieser Beobachtungen bezüglich der Probengewinnung wurde auch bereits von anderen Autoren kritisiert (Rinia et al., 2007). Trotz nahezu gleichartiger Probengewinnung und grundsätzlich übereinstimmender Ergebnisse in Bezug auf die eosinophilen Granulozyten der drei beschriebenen Studien müssen diese differenziert betrachtet werden. So war z.B. bei Jahnsen et al. der Gebrauch topischer Glukokortikoide kein Ausschlusskriterium. Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass dies im Zusammenhang mit der nur gering erhöhten Anzahl eosinophiler Granulozyten im Bereich der mittleren gegenüber der unteren Nasenmuschel steht. Demgegenüber wurde in selbiger Studie darauf geachtet, keinen Allergiker in der entsprechenden Pollensaison in die Studie aufzunehmen. Diese Tatsache wurde bei Bernstein et

al. und Stoop et al. zwar nicht außer Acht gelassen, doch waren Allergiker kein Ausschlusskriterium. Dabei konnte gerade in zuletzt genannter Studie gezeigt werden, dass z.B. Patienten mit Asthma oder einer COPD eine signifikant höhere Anzahl an eosinophilen Granulozyten in Polypen aufwiesen.

Eine andere Studie konnte zeigen, dass das Gewebe, von dem aus Nasenpolypen gewachsen waren, sogar eine höhere Anzahl von eosinophilen Granulozyten aufwies als die Nasenpolypen selbst (Larsen et al., 1998). Diese Studie bezog ihre Gewebeproben aus Leichenpräparaten. Insgesamt wurden dabei 350 Leichen auf Nasenpolypen untersucht. Bei 24 hiervon fanden sich Nasenpolypen, die zusammen mit einer angrenzenden Schleimhautprobe entnommen wurden. Es erfolgte sowohl eine Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) zum Nachweis von eosinophilen Granulozyten als auch eine Naphtol-AS-D-Chloracetat Färbung zum Nachweis von Mastzellen. Es fand eine semiquantitative Auswertung unter dem Lichtmikroskop statt. Angaben über Begleiterkrankungen oder Medikamenteneinnahmen wurden nicht gemacht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten aber, dass erhöhte Zahlen von eosinophilen Granulozyten in der Region von Nasenpolypen zu finden sind. Bezüglich der Mastzellen und neutrophilen Granulozyten konnten keine Unterschiede zu den Kontrollen oder dem Polypengewebe festgestellt werden. Da diese Studie auf Leichenpräparaten beruhte, ist fraglich, inwiefern die Ergebnisse auf andere Studien übertragbar sind und ob die Leichenpräparate eine repräsentative Gruppe darstellen. Außerdem muss davon ausgegangen werden, dass es aufgrund der unspezifischen Färbetechnik und der ausschließlich semiquantitativen Auswertung zu größeren Abweichungen bei den Ergebnissen kommen kann. Trotzdem wird auch aus dieser Studie deutlich, dass der Lokalisation des entnommenen Materials entscheidende Bedeutung zukommt.

Im Gegensatz zu den eben beschriebenen Studien, untersuchte eine andere Studie 16 ausschließlich auf Lieschgras allergische Patienten (Varney et al., 1992). Jegliche Medikation oder frühere Hyposensibilisierung wurde ausgeschlossen. Bei allen Patienten fand eine nasale Provokation durch ein allergen-getränktes Filterpapier auf der unteren Nasenmuschel statt. Analog hierzu wurde auf der anderen Nasenseite ein Filterpapier mit einer Kontrolllösung appliziert. Beide Filterpapiere verblieben dort für 10 min. Nach 24 Std. wurden von den beiden

Applikationsorten Schleimhautbiopsien entnommen und nach MBP immunhistochemisch für eosinophile Granulozyten gefärbt. MBP kann, je nach verwendetem Antikörper, als spezifischer Marker für eosinophile Granulozyten verwendet werden (Plager et al., 2006). Die Auswertung von Varney et al. erbrachte auf der Nasenseite, an der mit Allergenlösung provoziert wurde, signifikant erhöhte eosinophile Granulozytenzahlen im Vergleich zur Kontrollseite. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass auch eine allergische Rhinitis die Anzahl eosinophiler Granulozyten beeinflussen kann. Unter normalen Bedingungen wäre ein homogener und großflächiger Allergenkontakt auf der Schleimhaut realistisch. Unklar bleibt allerdings, inwiefern, ähnlich der Polyposis nasi, auch die allergische Rhinitis zu einer regional unterschiedlichen eosinophilen Granulozytenansammlung führen kann.

In unserer vorliegenden Studie war neben der erwähnten Lokalisation des Brush auch die aktuelle Konstitution der Schleimhaut des Patienten ausschlaggebend für Qualität und Quantität des gesammelten Materials. Bei starker Sekretproduktion wurden die Nylonborsten des Brush schnell mit Schleim verlegt und die Zellausbeute sank deutlich. Durch Schneuzen konnte der Patient selbst teilweise Abhilfe schaffen oder aber der Untersuchende beseitigte überschüssiges Sekret vor der Durchführung des Cytobrush durch Absaugen. Um in jedem Fall brauchbare Zellmengen mittels Cytobrush zu sammeln, wurde der Brush, wie oben beschrieben, immer auf beiden Seiten der Nase durchgeführt. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass immer ausreichend Zellen gewonnen wurden.

Ein weiteres Problem bestand bei Patienten mit atropher oder sehr trockener Nasenschleimhaut. Hier konnte mit dem Brush zwar leicht eine sehr große Menge an Zellmaterial gewonnen werden, doch gab es hierdurch auch ein größeres Verletzungsrisiko der Schleimhaut. Daher musste der Brush mit großer Vorsicht durchgeführt werden, um eine Kontamination des Zellmaterials mit Blut zu verhindern. Außerdem war die Spitze des Cytobrush selbst eine potentielle Gefahrenquelle. Diesem Risiko wurde mit der Auswahl des Cytobrush GT Plus mit einer stumpfen Kunststoffkugel an der Spitze entgegengesteuert (Abbildung 01).

Ein versehentliches Einstechen in die Schleimhaut konnte hierdurch verhindert werden.

Die gesamte Methodik ist ausschlaggebend für die Menge und Art der gewonnenen Zellen. Dies muss später bei der Beurteilung der einzelnen Zellpopulationen und vor allem beim Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher Studien berücksichtigt werden. Aufgrund der Tatsache, dass die verschiedenen Vertreter der Immunzellen nicht homogen in der Schleimhaut verteilt sind, sondern vielmehr eine bevorzugte Lokalisation an bzw. im Gewebe haben, besitzt jedes Zellgewinnungsverfahren gewissermaßen ein eigenes Profil. Die in dieser Studie vielfach genannten eosinophilen Granulozyten befinden sich dabei vorwiegend im Bereich der Basalmembran (Lamina propria) (Bernstein et al., 1997) bzw. subepithelial in der Nähe von kleinen Gefäßen und Drüsen (Stoop et al., 1993; Varney et al., 1992). Damit stimmen diese drei Autoren bezüglich der Lokalisation dieser Immunzellen überein. Noch etwas detaillierteren Aufschluss gibt eine andere Quelle (Heppt, 1995). Auch hier wird die obere Schicht der Submukosa als bevorzugter Ort von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen genannt, wohingegen neutrophile Granulozyten an der Epitheloberfläche dominieren und sich dadurch vermehrt im Nasensekret befinden. Dies wird auch anhand der jeweils einzeln beschriebenen Zellgewinnungsmethoden deutlich. Demzufolge haben Schnetzpräparate und Präparate mittels Lavage beide einen sehr hohen Anteil an immunologischen Zellen. Die neutrophilen Granulozyten haben hierbei mit über 75% den größten Anteil an der Gesamtzellzahl. Die Zellgewinnungsverfahren mittels Kürette und Cytobrush haben ein gänzlich anderes Profil. Hier bilden die Zellen des Epithels den Hauptanteil mit ca. 80-90 %. Auch wenn die beiden erstgenannten Verfahren eine deutlich höhere Anzahl an immunologischen Zellen fördern, ist dies trotzdem nicht unbedingt von Vorteil, da hier hauptsächlich die im Nasensekret vorhandenen neutrophilen Granulozyten gewonnen werden, nicht aber die im Gewebe befindlichen eosinophilen Granulozyten und Mastzellen. Außerdem findet sich hierbei auch ein hohes Maß an Staubpartikeln und Zellen in morphologisch schlechtem Zustand. Darüber hinaus lässt sich der Entnahmeort nicht festlegen, dem, wie oben beschrieben, eine entscheidende Bedeutung zukommt. Das Verfahren mittels Cytobrush bietet gegenüber dem der Kürette den Vorteil einer höheren Zellausbeute bei gleichzeitig

höherem Anteil an immunologischen Zellen. Außerdem ist das Verletzungsrisiko der Schleimhaut mit den weichen Nylonborsten des Cytobrush sehr gering und für den Patienten am wenigsten invasiv. Der Cytobrush stellte damit für die Ziele dieser Studie das bestmögliche Zellgewinnungsverfahren dar, weswegen dieser Methode der Vorzug gegeben wurde.

#### 4.1.3 Zytologische Färbemethoden

Es gibt unzählige verschiedene Färbemethoden, die alle mehr oder weniger auf den Nachweis bestimmter Zellpopulationen ausgelegt sind. Bei dem Zellmaterial, das mittels Brush gesammelt wurde, handelt es sich um sehr heterogenes Material. Teilweise befindet sich dieses Material nicht mehr in optimalem Zustand, da der Brush hauptsächlich an der Oberfläche erfolgt und damit die älteren Zellen sowie totes Zellmaterial gleichermaßen aufsammelt. Außerdem handelt es sich nicht um zusammenhängendes Gewebe, sondern um einzelne Zellen und stellt damit sehr empfindliches Material dar. Darauf musste bei der Färbung Rücksicht genommen werden, um die Zellstrukturen möglichst zu erhalten. Weit verbreitete Färbemethoden sind die Färbungen nach May-Grünwald-Giemsa (MGG) und Hämatoxilin-Eosin (HE). Beide Methoden liefern bei überschaubarem Aufwand gute Ergebnisse zur Zellbeurteilung. In Vorversuchen wurden diese beiden Methoden in Erwägung gezogen und getestet. Epithelzellen waren damit gut darstellbar und anhand ihrer Morphologie auch gut gegen andere Zellpopulationen abgrenzbar. Die Farbunterschiede der einzelnen Granulozytenpopulationen waren an unserem Zellmaterial allerdings oft nur minimal. Auch die Morphologie der verschiedenen Granulozyten ließ keine eindeutige Unterscheidung zu. Damit war eine zweifelsfreie und eindeutige Unterscheidung der verschiedenen Granulozytenpopulationen nicht möglich. In der Literatur finden sich aber durchaus Autoren, die Färbungen nach May-Grünwald-Giemsa und Hämatoxilin-Eosin bzw. Methylenblau-Eosin zum Auswerten für ausreichend erachteten und diese daher auch in Studien verwendeten (Braun, H. et al., 2003; Sood, 2005; Zhang, Liu, Han & Zhang, 2011). Diese Ansicht konnten wir nicht teilen, weshalb wir, wie oben beschrieben, stattdessen eine

immunzytochemische Färbung angefertigt haben, um eosinophile Granulozyten eindeutig identifizieren und zählen zu können. Die zusätzlich angefertigte immunzytochemische Doppelfärbung nach ECP und neutrophiler Elastase machte deutlich, dass die durchgeführte Einzelfärbung spezifisch nur eosinophile Granulozyten anfärbt. Somit war eine sichere Unterscheidung der beiden Granulozytenpopulationen möglich. Einige Untersuchungen bezweifeln allerdings die alleinige strikte Zuweisung von ECP zu eosinophilen Granulozyten. So gibt es Hinweise, dass auch neutrophile Granulozyten ECP enthalten können (Monteseirin et al., 2007; Venge, 1994). Auch wenn dies nicht primär Gegenstand dieser Studie war, so konnte für diese These kein Hinweis gefunden werden. Wir fanden keine Zellen, die sowohl neutrophile Elastase- als auch ECP-positiv waren.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

Eosinophile Granulozyten werden schon seit längerer Zeit mit einigen Erkrankungsbildern in Verbindung gebracht. Neben systemischen Erkrankungen wie Parasitenbefall sind unter anderem allergische Erkrankungen und die Polyposis nasi von einer Eosinophilie gekennzeichnet. Auch in dieser Studie konnte gezeigt werden, dass v.a. die Polyposis nasi mit einer deutlich erhöhten Anzahl von eosinophilen Granulozyten im Blut einhergeht (Abbildung 08). Obwohl sich diese Erkrankung nur auf einen kleinen Teil des menschlichen Körpers beschränkt, war trotzdem eine signifikant erhöhte Anzahl eosinophiler Granulozyten im Blut feststellbar. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen anderer Studien überein und sind damit eine vielfach belegte Feststellung (Bryson, Tasca & Rowe-Jones, 2003; Kramer et al., 2004; Wong, 1992). Stoop et al. konnte zudem zeigen, dass bei Patienten mit einer erhöhten Anzahl eosinophiler Granulozyten im Blut und Rezidiv-Polyposis die Anzahl aktivierter eosinophiler Granulozyten im Polypengewebe signifikant erhöht ist - gegenüber Patienten mit Blut-Normwerten. Auch in der Allergie-Gruppe war eine erhöhte Anzahl eosinophiler Granulozyten gegenüber der Kontrollgruppe feststellbar. Anders als in vergleichbaren Studien (Beppu et al., 1994; Chen, S. T. et al., 2006; Di Lorenzo et al., 1997) konnte in unserer Studie allerdings kein signifikanter Unterschied

gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass in unserer Allergie-Gruppe nicht zwischen perennialer und saisonaler Allergie unterschieden wurde. Da die Anzahl der eosinophilen Granulozyten von dem Grad der vorliegenden Entzündung abhängt (Amperayani & Kuravi, 2011), sind bei saisonalen Allergikern deutliche jahreszeitliche Schwankungen zu erwarten. Aufgrund des sich täglich ändernden Pollenfluges, der eng mit den örtlichen Wetterbedingungen zusammenhängt, kann es somit zu stark unterschiedlich ausgeprägten Entzündungsreaktionen kommen. Somit waren auch Allergiker in dieser Gruppe vertreten, die eine verhältnismäßig niedrige Anzahl an eosinophilen Granulozyten im Blut aufwiesen. Dies könnte in dieser Gruppe zu einem niedrigeren Mittelwert und gleichzeitig zu größeren Differenzen der einzelnen Messwerte führen. Bezüglich der Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der CRS-Gruppe wäre, wie schon in anderen Studien gezeigt, eine gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte Anzahl zu erwarten gewesen (Braun, H. et al., 2003; Bryson et al., 2003; Kaliner, M. A. et al., 1997). Dies konnten unsere Ergebnisse nicht zeigen. Ein möglicher Grund hierfür könnte die genaue Unterteilung des Patientenguts in die zwei Gruppen Polyposis bzw. CRS sein, da bei HNO-ärztlichen Untersuchung besonders auf die Existenz von Nasenpolypen geachtet wurde.

Ein anderes Ergebnis erbrachte die Auswertung der Gesamt IgE-Werte im Serum. Hier zeigte sich der höchste Wert in der Allergiker-Gruppe. Er war gegenüber der CRS- und der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Erhöhte IgE-Werte bei Allergikern konnten auch schon in anderen Studien nachgewiesen werden (Chen, S. T. et al., 2006; Kramer et al., 2004; Zhang et al., 2011). Diese Erkenntnis beruht vor allem auf der anfangs erwähnten IgE-vermittelten Entzündungsreaktion durch die jeweiligen Allergene. Ebenso konnten erhöhte IgE-Werte bei Polyposis nasi gezeigt werden (Gevaert et al., 2005; Kramer et al., 2004). Diese Ergebnisse entsprechen im Prinzip auch den Resultaten unserer Studie. Darüber hinaus konnten Chen et al. ähnliche Ergebnisse bei der Korrelation der IgE-Werte zu anderen Parametern feststellen. So gab es dort ebenfalls eine moderate Korrelation zwischen Gesamt-IgE und den eosinophilen Granulozyten im Blut. Weiterhin konnten Korrelationen zwischen einigen anderen Markern gezeigt werden, wie z.B. dem Gesamt-IgE und der Anzahl von eosinophilen Granulozyten

der Nasenschleimhaut. Inwiefern die Ergebnisse dieser Studie mit den unseren vergleichbar sind, ist fraglich, da das Patientengut in genannter Studie Kinder im Alter von 2 bis 12 Jahren waren und die Methodik der lokalen Zellgewinnung auf einem Abstrich beruhte. Da das Gesamt-IgE einen systemischen Parameter darstellt, kann dieser auch einer ganzen Reihe von Einflussfaktoren unterliegen. Ein Überblick von möglichen Einflussgrößen wurde von Omenaas et al. beschrieben (Omenaas, Bakke, Elsayed, Hanoa & Gulsvik, 1994). Demzufolge deuten verschiedene Studien darauf hin, dass Alter, Rasse, Geschlecht, Zigarettenrauch, Allergene, berufliche Exposition und auch Erbfaktoren Einfluss auf das Gesamt-IgE haben können. Daher sollten, wie von Omenaas et al. beschrieben, Gesamt-IgE-Werte bei der Diagnostik allergischer Erkrankungen nicht isoliert betrachtet werden.

Ebenso sind die Marker eosinophiler Granulozyten und Mastzellen, das ECP und die Tryptase, bereits seit längerem Gegenstand intensiver Forschung. Seit ihrer Entdeckung erhoffte man sich genauere Informationen über die ablaufende Immunreaktion in dem betroffenen Gewebe zu finden. Auch in unserer Studie konnte gezeigt werden, dass ECP als zuverlässiger Marker sowohl zum Anfärben von Geweben und Zellen mittels Immunhistochemie als auch zu diagnostischen Zwecken im Nasensekret erfolgreich dienen kann. Doch obwohl die Graphiken des ECP im Nasensekret und der eosinophilen Granulozyten im Cytospin ähnliche Verteilungsmuster aufweisen, kann trotzdem anhand der statistischen Werte nur bedingt von einer Korrelation gesprochen werden. In der Literatur gibt es allerdings Hinweise, dass ECP und eosinophile Granulozyten korrelieren können. Beppu et al. konnten zeigen, dass die ECP-Werte sowohl mit der Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Cytobrush als auch mit den eosinophilen Granulozyten im Blut korrelierten (Beppu et al., 1994). Der Zusammenhang dieser Größen ist dabei aber durchaus umstritten, da das Exprimieren von ECP auch entscheidend vom Aktivierungszustand der eosinophilen Granulozyten abhängt. Wie bereits oben erwähnt, konnte dies von Stoop et al. nachgewiesen werden, da hier an ein und demselben Gewebe eines Probanden drei verschiedene Antikörper zum Nachweis von eosinophilen Granulozyten verwendet wurden. Zwischen den verwendeten Nachweismethoden war ein deutlicher Unterschied in Bezug auf die Anzahl positiv markierter Zellen erkennbar. Dies ergibt folgende Problematik: Erstens muss bei

einem Vergleich verschiedener Studienergebnisse auf die verwendete Nachweismethodik geachtet werden bzw. welche eosinophile Granulozytenpopulation nachgewiesen wurde (aktiviert oder nicht aktiviert) und zweitens stellt sich die Frage, welche Granulozytenpopulation entscheidend für die Diagnostik ist. Stoop et al. empfehlen eine Bestimmung der aktivierten eosinophilen Granulozyten, da nach deren Meinung nur diese an der aktuellen Entzündungsreaktion beteiligt sind. Diese Schlussfolgerung wurde aus den Ergebnissen der Kontrollgruppe gezogen, weil hier zwar eosinophile Granulozyten nachweisbar waren, nicht aber in aktiviertem Zustand. Die Ursache einer solchen Aktivierung kann dabei z.B. sowohl eine Allergie als auch eine banale Infektion sein (Kampe et al., 2011).

Uneinheitlich sind dagegen die Ergebnisse einiger Studien bezüglich der Lokalisation und Ausbreitung der eosinophilen Granulozyten bei atopischen Erkrankungen. So wird in der Literatur beschrieben, dass sich bei alleiniger allergischer Rhinitis auch erhöhte eosinophile Granulozytenzahlen in Sputum finden lassen (Alvarez et al., 2000). In dieser Studie wurden insgesamt 46 Patienten untersucht, die entweder an allergischem Asthma oder an einer allergischen Rhinitis litten. Beide Patientengruppen wiesen dabei eine isolierte Sensibilisierung gegenüber Hausstaubmilben (*D. pteronyssinus*) auf. Zehn zusätzliche nicht-sensibilisierte Probanden dienten als Kontrolle. Alle 56 Probanden wurden mit einem Metacholin-Test auf bronchiale Hyperreagibilität untersucht. Darüber hinaus fand die Bestimmung einer ganzen Reihe von Markern statt. Darunter waren unter anderem: ECP, Tryptase und eosinophile Granulozyten im Sputum sowie ECP und eosinophilen Granulozyten im Blut. Die Auswertung ergab die höchsten Werte von eosinophilen Granulozyten in Blut und Sputum in der Asthma-Gruppe, gefolgt von der Allergie-Gruppe und der Kontroll-Gruppe. Dabei korrelierten diese beiden Größen untereinander und mit dem ECP im Blut in der jeweiligen Gruppe. Die ECP-Werte aus Sputum korrelierten dabei nur in der Asthma-Gruppe mit der darin bestimmten Anzahl eosinophiler Granulozyten, nicht aber in der Allergie-Gruppe. Das Vorhandensein von vermehrten eosinophilen Granulozyteninfiltraten in der Bronchialschleimhaut bei Allergikern gilt als gesichert und wird hier mehrfach belegt. Alvarez et al. vermuten, dass diese Diskrepanz der Korrelation zwischen den Gruppen auf die verminderte Aktivität von

eosinophilen Granulozyten in den unteren Atemwegen bei Allergikern zurückzuführen ist.

Umgekehrt gibt es ebenso Berichte, dass eosinophile Infiltrate in der Nasenschleimhaut bei Patienten mit Asthma aber ohne nasale Beschwerden gefunden wurden (Gaga et al., 2000). In dieser Studie wurden 17 Patienten mit allergischem Asthma untersucht, von denen 9 simultan an einer allergischen Rhinitis litten. Als Kontrolle dienten 10 Patienten ohne atopische Erkrankung. Ausschlusskriterien waren Zigarettenrauch, orale oder lokale Medikation (Ausnahme waren  $\beta_2$ -Agonisten) sowie eine Infektion der oberen Atemwege innerhalb der letzten 4 Wochen. Die Bestimmung der eosinophilen Granulozyten erfolgte mittels einer immunhistochemischen Färbung von Schleimhautbiopsien des unteren Nasenganges und aus den Hauptbronchien. Es fanden sich in der Nasenschleimhaut signifikant höhere eosinophile Granulozytenzahlen bei allen Patienten mit allergischem Asthma gegenüber der Kontroll-Gruppe. Es machte dabei nur einen geringen Unterschied, ob die Patienten an allergischer Rhinitis litten oder nicht. Allerdings konnte bei Patienten mit allergischem Asthma ein deutlicher Zusammenhang bezüglich der eosinophilen Inflammation zwischen der Nasen- und Bronchialschleimhaut gefunden werden. Beide Studien zeigen damit, dass sich sowohl das allergische Asthma als auch die allergische Rhinitis nicht nur auf eine bestimmte Region des Respirationstraktes beziehen. Vielmehr sollten daher, wie auch Gaga et al. beschreiben, die beiden genannten Erkrankungen einheitlich klassifiziert und behandelt werden, da der obere und untere Respirationstrakt eine zusammenhängende Einheit darstellen. Somit kann zwischen der Lokalisation der eosinophilen Granulozyten und einem bestimmten atopischen Erkrankungsbild nur schwer ein direkter Zusammenhang hergestellt werden. Aufgrund der ähnlichen zellulären Immunantwort bei allergischem Asthma und allergischer Rhinitis wandern pro-inflammatorische Zellen auch in andere Gewebsregionen ein, was ebenfalls das Bild einer One-Airway-Disease befürwortet (Borish, 2003). In unserer Studie konnte, wie oben bei den Ergebnissen bereits beschrieben, nur bedingt ein Zusammenhang von ECP aus Nasensekret und der lokal vorhandenen Anzahl von eosinophilen Granulozyten der Nasenschleimhaut gezeigt werden. Ebenso ließen unsere Werte aus dem Blut nur bedingt Rückschlüsse auf lokale Parameter zu, wobei die eosinophilen

Granulozyten aus dem Blut noch am besten mit der lokalen Eosinophilenanzahl der Nasenschleimhaut korrelierten. Einen deutlicheren Zusammenhang konnten dagegen andere Studien zeigen. Hier korrelierte die erhöhte Anzahl eosinophiler Granulozyten im Blut mit dem ECP aus lokal gewonnenem Material (Beppu et al., 1994; Kampe, Stalenheim, Janson, Stolt & Carlson, 2007). Wegen der Vielzahl unterschiedlicher Ergebnisse und Studien und den nur teilweise bekannten Einflussgrößen sollte deshalb die Bestimmung des ECP wie auch die Gewebseosinophilie nur als Indiz für eine vorliegende Erkrankung gewertet werden (Braunstahl, 2005).

Neben dem vielfach erwähnten ECP gilt auch die eosinophile Peroxidase (EPO) als spezifischer Marker für eosinophile Granulozyten (Venge, 1994). Der weitaus meistgenutzte ist dabei jedoch ECP. Doch gerade die Spezifität von ECP ist immer wieder Gegenstand von Diskussionen. Wie oben bereits erwähnt, wird in der Literatur von einigen Autoren das Vorkommen von ECP als nicht spezifisch für eosinophile Granulozyten angesehen. So sollen vor allem auch neutrophile Granulozyten ECP enthalten können und auch in der Lage sein, vorhandenes ECP aufzunehmen (Abu-Ghazaleh et al., 1992; Bystrom et al., 2002; Monteseirin & Vega, 2008; Sur et al., 1998). Die beiden Studien von Abu-Ghazaleh et al. und Bystrom et al. arbeiteten mit neutrophilen Granulozyten aus dem Blut, welche bis auf 99% bzw. 100% angereichert wurden. In beiden Fällen konnte ECP in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Bystrom et al. verwendeten bei diesem Experiment neutrophile Granulozyten mit einem Reinheitsgrad von 100%. Die Konzentration von ECP bezifferten sie auf  $123 \text{ ng}/10^6$  Zellen, was etwa 1% der mittleren Konzentration von eosinophilen Granulozyten ( $13,5 \text{ } \mu\text{g}/10^6$  Zellen) entspricht. Analog hierzu zeigten die lichtmikroskopischen Nachweise der immunzytochemischen Färbung extrem schwach angefärbte neutrophile Granulozyten.

Neben der Erkenntnis, dass neutrophile Granulozyten geringe Mengen von ECP enthalten können, belegt eine andere Studie auch eine Eigensynthese von ECP in dieser Zellpopulation. Eine Synthese war allerdings erst nach erfolgtem 'Priming' möglich (Monteseirin et al., 2007). Der Nachweis dieser Eigensynthese erfolgte dabei an Zellkulturen aus hochgereinigten neutrophilen Granulozyten von Patienten mit allergischem Asthma. Die Zellkulturen wurden dabei einem Antigen,

auf das der Patient sensibilisiert war, oder dem Platelet-Activating-Factor (PAF) ausgesetzt. Dieser als 'Priming' bezeichnete Vorgang bewirkte eine Aktivierung der Zelllinie. Der anschließende Nachweis von ECP in der Zellkultur erfolgte mittels ELISA-Technik. Auch wenn die Ergebnisse dieser Studie eine Synthese in neutrophilen Granulozyten belegen, muss hinterfragt werden, inwiefern dieses Studienmodell realistischen in-vivo Bedingungen gerecht wird. Die hochgereinigten neutrophilen Granulozyten wurden dabei direkt künstlichen Stimulationsfaktoren in Konzentrationen ausgesetzt, wie sie in der Natur sehr wahrscheinlich nicht vorkommen. Ein ECP Nachweis war außerdem erst nach 3 bis 18-stündigem Priming feststellbar, wohingegen eosinophile Granulozyten bereits nach 20-30 minütigem Priming ECP freisetzen (Simon et al., 2000). Die verschiedenen Granulozytenpopulationen reagierten zudem jeweils nur auf bestimmte Priming-Reagenzien, darunter fand sich allerdings kein Reagenz, mit dem beide Granulozytenpopulationen gleichzeitig stimuliert werden konnten (Monteseirin et al., 2007).

Trotz dieser Studie kann man bei ECP von einem spezifischen Marker für eosinophile Granulozyten ausgehen, da das von Abu-Ghazaleh et al. und Bystrom et al. in neutrophilen Granulozyten nachgewiesene ECP nur von diesen aufgenommen wurde. Damit stellen diese Zellen eine Art 'Puffer' oder 'Reservoir' für ECP dar. Nur nach einer Zellstimulation konnte laut Bystrom et al. ECP auch wieder sezerniert werden. Bei einer Bestimmung von ECP würde dieses ECP zwar mitbestimmt, allerdings entstammt dieses ursprünglich ebenfalls eosinophilen Granulozyten. Darüber hinaus sind die beschriebenen Konzentrationen so gering, dass diese die Ergebnisse kaum beeinflussen dürften. Die von Monteseirin et al. erwähnte Möglichkeit der ECP-Produktion war außerdem nur nach mehrstündiger Zellstimulation in einer Zellkultur möglich. Vor diesem Hintergrund und aufgrund unserer eindeutigen Ergebnisse der Doppelfärbung erscheinen neutrophile Granulozyten als 'falsch positiv' in unserer Auswertung als sehr unwahrscheinlich.

Ähnlich dem Vergleich von ECP zu eosinophilen Granulozyten wurde mit Tryptase und Mastzellen verfahren. In unserer Studie konnten allerdings keine Zusammenhänge zwischen den Tryptase-Werten des Nasensekrets und der Anzahl lokaler Mastzellen in der Schleimhaut gefunden werden. Ebenso wenig war zwischen den Werten des Gesamt-IgE und der Tryptase eine Korrelation

feststellbar. Auch wenn in unserer Studie keine Korrelation zwischen diesen Größen hergestellt werden konnte, gilt die Tryptase im Nasensekret trotzdem als sehr hilfreicher Marker zur Diagnostik der allergischen Rhinitis (Church & Levi-Schaffer, 1997; Di Lorenzo et al., 1997; Rasp & Hochstrasser, 1993). Di Lorenzo et al. konnten zeigen, dass die Symptomenstärke der Patienten sowohl mit der Tryptase- als auch mit der ECP-Konzentration des Nasensekrets korreliert. 20 saisonale Pollenallergiker ohne weitere Allergien und 10 nicht-allergische Probanden zur Kontrolle wurden hierbei untersucht. Systemische und topische Glukokortikoide sowie Antihistaminika waren ein Ausschlusskriterium. Mittels Jet-Vernebler wurde NaCl-Lösung in die Nase eingebracht und anschließend aufgefangen, woraus im Anschluss die Konzentrationen von Tryptase und ECP ermittelt wurden. Es fielen erstaunlich konstant niedrige Werte bei den Kontrollpatienten und bei den Allergikern außerhalb der Pollensaison auf. Dies traf gleichermaßen für ECP und Tryptase zu. Ein deutlicher Anstieg war nur bei der Allergiker-Gruppe während der Pollensaison zu beobachten. Dies führt zu der Erkenntnis, dass Tryptase, aber auch ECP als Marker zum Diagnostizieren einer vorliegenden allergischen Erkrankung hilfreiche Hinweise bieten können.

Bei einer anderen chronischen nasalen Erkrankung, der Polyposis nasi, fielen bei unserer Auswertung außerdem stark erhöhte Mastzellzahlen auf, welche ebenfalls nicht mit den Tryptase-Werten korrelierten. In der Literatur werden ähnliche Ergebnisse beschrieben. Es wurde beispielsweise eine deutlich erhöhte Anzahl an allerdings stark degranulierten Mastzellen beobachtet. (Drake-Lee, Barker, et al., 1984; Mygind, 1999). Drake-Lee et al. untersuchten elektronenmikroskopisch Polypengewebe von 6 Patienten. Hierunter waren sowohl Patienten mit simultanen atopischen Erkrankungen als auch Patienten, die nur an einer Polyposis nasi erkrankt waren. Antihistaminika oder andere Medikamente zur intranasalen Applikation wurden nicht verabreicht. Die Polypenentnahme erfolgte unter lokaler Anästhesie. Nach dem Waschen in NaCl-Lösung und einer 4-stündigen Fixierung in Karnovsky's-Lösung fand eine schrittweise Dehydrierung in einer Ethanol-Reihe statt und schließlich eine Einbettung in Harz. Die Untersuchung der Gewebeschnitte zeigte eine Vielzahl von Mastzellen, wovon ein Großteil teilweise oder vollständig degranuliert war. Allerdings variierte dieser Zustand von Patient zu Patient. Mygind et al. erwähnten in ihrer Publikation sehr

hohe Tryptase-Werte in Polypengewebe. Die dort gemessenen Konzentrationen entsprachen ähnlich hohen Werten, wie sie auch in Pricklösungen zur positiv-Kontrolle verwendet werden. Aufgrund der stark variierenden Degranulation der Mastzellen von Patient zu Patient, aber auch innerhalb einer Gewebeprobe, sind viele Degranulationsfaktoren denkbar. Die Diskrepanz in unseren präsentierten Daten bezüglich der gemessenen Tryptase-Werte und der ermittelten Anzahl von Mastzellen könnte damit erklärt werden. Derzeit scheinen noch zu viele unbekannte Faktoren Einfluss auf den Degranulationszustand der Mastzellen zu haben. Auch wenn die Tryptase bei einzelnen Krankheitsbildern wie der allergischen Rhinitis offenbar gut zur Diagnostik herangezogen werden kann, ist dies anscheinend nicht unbedingt auf andere Krankheitsbilder übertragbar.

## 5. Zusammenfassung

Chronische nasale Erkrankungen wie die allergische Rhinitis, die chronische Rhinosinusitis (CRS) und die Polyposis nasi haben eine hohe Prävalenz in der westlichen Welt. Die allergische Rhinitis ist dabei eine der häufigsten chronischen Krankheitsbilder überhaupt. Bei Jugendlichen und Erwachsenen werden Prävalenzen von 15% bis 20% angegeben (Hermann-Kunz, 2000; Langen et al., 2013; Schlaud, 2007). Gleichmaßen werden auch bei der CRS hohe Fallzahlen beobachtet. 2,5 Millionen chronische und 6 Millionen akute Rhinosinuitiden sowie 220.000 Fälle einer Polyposis nasi wurden innerhalb eines Jahres festgestellt (Quelle: IMS HEALTH 2001, Frankfurt).

Allen drei Erkrankungen gemein ist eine z.T. deutlich erhöhte Anzahl von eosinophilen Granulozyten bzw. erhöhte Werte von eosinophilem kationischen Protein (ECP), einem Marker für aktivierte eosinophile Granulozyten. Ebenso können erhöhte Mastzellenzahlen bzw. erhöhte Werte an Tryptase als Marker für aktivierte Mastzellen gefunden werden. Die genaue Rolle dieser erhöhten Zellzahlen bzw. Marker und der zugrundeliegende pathophysiologische Mechanismus ist hierbei jedoch weiterhin unklar.

Ziel dieser Studie war es, mittels ausgewählter Messverfahren sowohl systemische als auch lokale Parameter miteinander zu vergleichen und damit deren Aussagekraft hinsichtlich der differentialdiagnostischen Einordnung der zugrundeliegenden Erkrankung zu bestimmen.

Untersucht wurden 120 Patienten, die an einer der drei genannten chronischen nasalen Erkrankungen litten oder als Kontrolle dienten. Die Gruppenstärken waren wie folgt: 34 'Allergie', 27 'CRS', 25 'Polyposis' und 34 'Kontrolle'. Von jedem Individuum wurde eine Zellprobe mittel Cytobrush von der mittleren Nasenmuschel, Nasensekret mit Hilfe eines Watteröllchens aus dem mittleren Nasengang und eine venöse Blutprobe entnommen. Die Zellproben wurden mittels Cytospintechnik aufgearbeitet, immunzytochemisch nach ECP bzw. Tryptase gefärbt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Aus dem Nasensekret wurde die Konzentration von ECP und Tryptase bestimmt. Im Blut wurden das Gesamt-IgE und die Anzahl eosinophiler Granulozyten gemessen. Zusätzlich wurde an einigen Zytopins eine immunzytochemische Doppelfärbung

nach ECP und simultan nach neutrophiler Elastase durchgeführt. Dies diente dem Ausschluss von ECP in neutrophilen Granulozyten und bestätigte damit die Spezifität der verwendeten Immunzytochemie.

Die Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) der Polyposis-Gruppe (MW  $368 \pm 362$ ) gegenüber den übrigen Gruppen (Kontrolle: MW  $28 \pm 33$ ) in der gemessenen ECP-Konzentration im Nasensekret und der eosinophilen Granulozyten im Cytospin (MW  $1979 \pm 3706$  vs. Kontrolle MW  $62 \pm 139$ ) sowie im Blut (MW  $310 \pm 226$  vs. Kontrolle MW  $159 \pm 108$ ). Die Allergie-Gruppe wies signifikant erhöhte Werte ( $p < 0,01$ ) der Tryptase im Nasensekret (MW  $32 \pm 35$ ) gegenüber der CRS- (MW  $11 \pm 15$ ) sowie Kontroll-Gruppe (MW  $11 \pm 12$ ) und des Gesamt-IgE's im Serum (MW  $181 \pm 228$ ) gegenüber der CRS- (MW  $77 \pm 111$ ;  $p < 0,05$ ) und Kontrollgruppe (MW  $40 \pm 38$ ;  $p < 0,001$ ) auf. Bei der Auswertung der Mastzellen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Schwache Korrelationen bestanden zwischen ECP im Nasensekret und eosinophilen Granulozyten im Blut ( $p < 0,05$ ) sowie den Eosinophilen im Cytospin ( $p < 0,01$ ).

Eine grundsätzliche Problematik ergibt sich bei der Diagnostik von lokalen Erkrankungen der Nase durch die Kombination der komplexen zellulären Vorgänge mit den verschiedenen Möglichkeiten der Materialgewinnung und Auswertung. Da die zellulären Zusammenhänge in-vivo noch nicht vollständig erforscht sind, gibt es derzeit noch zu viele unbekannte Größen und deren Einfluss ist nur schwer abschätzbar. Immunologisch aktive Zellen wie eosinophile Granulozyten, Lymphozyten und Mastzellen verweilen zudem nicht direkt an der Oberfläche der Schleimhaut. Vielmehr sind sie hauptsächlich innerhalb der Mukosa und damit in tieferen Schichten aufzufinden. Zudem konzentriert sich deren Vorkommen teilweise auf einen nur kleinen Teil der Nasenhöhle, wie beispielsweise die Polypen. Der akkuraten Probengewinnung kommt dadurch entscheidende Bedeutung zu. In der vorliegenden Studie wurde versucht, die Aspekte einer exakten Zellgewinnung einzuhalten und mittels der gewählten immunzytochemischen Färbung eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität zu erreichen.

Unterschiedliche Studiendesigns und die nicht vollständig geklärten zellulären Zusammenhänge bei der Immunantwort der oberen Atemwege erschweren eine Standardisierung und damit die Vergleichbarkeit von Studienergebnissen. Unsere

Ergebnisse zeigen, dass die Bestimmung von ECP und Tryptase im Nasensekret einfacher und für den Patienten schonender zu bewerkstelligen ist als eine zytologische Untersuchung. Die gemessenen Werte spiegeln die zellulären pathophysiologischen Aspekte zuverlässig wieder und können damit bei der differentialdiagnostischen Einordnung der zugrundeliegenden Erkrankungen hilfreich sein. Weiterführende Forschung ist jedoch nötig, um die immunologischen Abläufe bei chronischen Erkrankungen der Nase besser verstehen zu können.



## 6. Abkürzungsverzeichnis:

A.	-	Arteria
ABC-Po	-	Avidin-Biotin-Complex-Peroxidase
AEC	-	Amino-Ethyl-Carbazol
AK	-	Antikörper
ASS	-	Azetylsalizylsäure
BAK	-	Brückenantikörper
CF	-	Zystische Fibrose
CRS	-	Chronische Rhinosinusitis
COPD	-	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CT	-	Computer Tomograph
D.	-	Dermatophagoides
ECP	-	Eosinophilic Cathionic Protein
EDN	-	Eosinophil Derived Neurotoxin
EDTA	-	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	-	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPO	-	Eosinophile Peroxidase
EPX	-	Eosinophile Protein X
FEIA	-	Floureszenz Enzym Immuno Assay
FESS	-	Functional Endoscopic Sinus Surgery
GM-CSF	-	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GRO- $\alpha$	-	Growth-Related Oncogene $\alpha$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	Wasserstoffperoxid
HE	-	Hämatoxilin-Eosin
HNO	-	Hals-Nasen-Ohren
IL-3	-	Interleukin-3
IL-4	-	Interleukin-4
IL-5	-	Interleukin-5
IgE	-	Immunglobulin E
MBP	-	Major Basic Protein
MGG	-	May-Grünwald-Giemsa

MW	-	Mittelwert
N.	-	Nervus
NP	-	nasal Polyposis
PAF	-	Platelet-Activating-Factor
PBS	-	Phosphate Buffered Saline
RANTES	-	Regulated Upon Activation Normal T-cell Expressed and presumably Secreted
SD	-	Standardabweichung
USA	-	United States of America
VCAM-1	-	Vascular Cell Adhesion Molecule 1

## 7. Literaturverzeichnis :

- Abu-Ghazaleh, R. I., Dunnette, S. L., Loegering, D. A., Checkel, J. L., Kita, H., Thomas, L. L. et al. (1992). Eosinophil granule proteins in peripheral blood granulocytes. *J Leukoc Biol*, 52(6), 611-618.
- Alvarez, M. J., Olaguibel, J. M., Garcia, B. E., Rodriguez, A., Tabar, A. I. & Urbiola, E. (2000). Airway inflammation in asthma and perennial allergic rhinitis. Relationship with nonspecific bronchial responsiveness and maximal airway narrowing. *Allergy*, 55(4), 355-362.
- Amperayani, S. & Kuravi, N. (2011). Correlation of nasal smear eosinophilia with class of allergic rhinitis. *Indian Pediatr*, 48(4), 329-330.
- Bachert, C. (2003). *Diagnose und Therapie der Sinusitis und Polyposis nas* Verfügbar unter: [http://dgaki.de/wp-content/uploads/2010/05/Leitlinie\\_SinusitisPolypen2003.pdf](http://dgaki.de/wp-content/uploads/2010/05/Leitlinie_SinusitisPolypen2003.pdf)
- Bachert, C., Gevaert, P., Holtappels, G., Cuvelier, C. & van Cauwenberge, P. (2000). Nasal polyposis: from cytokines to growth. *Am J Rhinol*, 14(5), 279-290.
- Bachert, C., Hormann, K., Mosges, R., Rasp, G., Riechelmann, H., Müller, R. et al. (2003). An update on the diagnosis and treatment of sinusitis and nasal polyposis. *Allergy*, 58(3), 176-191.
- Bachert, C., Wagenmann, M., Hauser, U. & Rudack, C. (1997). IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue. *J Allergy Clin Immunol*, 99(6 Pt 1), 837-842.
- Baraniuk, J. N. & Maibach, H. (2005). Pathophysiological classification of chronic rhinosinusitis. *Respir Res*, 6, 149.
- Behnecke, A., Mayr, S., Schick, B., Iro, H. & Raithel, M. (2008). Evaluation of ECP release from intact tissue biopsies from patients with nasal polyps. *Inflamm Res*, 57 Suppl 1, S65-66.
- Bentley, A. M., Jacobson, M. R., Cumberworth, V., Barkans, J. R., Moqbel, R., Schwartz, L. B. et al. (1992). Immunohistology of the nasal mucosa in seasonal allergic rhinitis: increases in activated eosinophils and epithelial mast cells. *J Allergy Clin Immunol*, 89(4), 877-883.
- Beppu, T., Ohta, N., Gon, S., Sakata, K., Inamura, K., Fukase, S. et al. (1994). Eosinophil and eosinophil cationic protein in allergic rhinitis. *Acta Otolaryngol Suppl*, 511, 221-223.

- Bernstein, J. M., Gorfien, J., Noble, B. & Yankaskas, J. R. (1997). Nasal polyposis: immunohistochemistry and bioelectrical findings (a hypothesis for the development of nasal polyps). *J Allergy Clin Immunol*, 99(2), 165-175.
- Bhattacharyya, N. (2005). Symptom and disease severity differences between nasal septal deviation and chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 133(2), 173-177.
- Boenninghaus. (2005). *HNO* (Bd. 12). Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Borish, L. (2003). Allergic rhinitis: systemic inflammation and implications for management. *J Allergy Clin Immunol*, 112(6), 1021-1031.
- Bousquet, J., Khaltaev, N., Cruz, A. A., Denburg, J., Fokkens, W. J., Togias, A. et al. (2008). Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*, 63 Suppl 86, 8-160.
- Bousquet, J., Van Cauwenberge, P. & Khaltaev, N. (2001). Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 108(5 Suppl), S147-334.
- Braun, H., Stammberger, H., Buzina, W., Freudenschuss, K., Lackner, A. & Beham, A. (2003). [Incidence and detection of fungi and eosinophilic granulocytes in chronic rhinosinusitis]. *Laryngorhinootologie*, 82(5), 330-340.
- Braun, T., Mack, B. & Kramer, M. F. (2011). Solitary chemosensory cells in the respiratory and vomeronasal epithelium of the human nose: a pilot study. *Rhinology*, 49(5), 507-512.
- Braunstahl, G. J. (2005). The unified immune system: respiratory tract-nasobronchial interaction mechanisms in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol*, 115(1), 142-148.
- Bryson, J. M., Tasca, R. A. & Rowe-Jones, J. M. (2003). Local and systemic eosinophilia in patients undergoing endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis with and without polyposis. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 28(1), 55-58.
- Bystrom, J., Garcia, R. C., Hakansson, L., Karawajczyk, M., Moberg, L., Soukka, J. et al. (2002). Eosinophil cationic protein is stored in, but not produced by, peripheral blood neutrophils. *Clin Exp Allergy*, 32(7), 1082-1091.
- Canakcioglu, S., Tahamiler, R., Saritzali, G., Alimoglu, Y., Isildak, H., Guvenc, M. G. et al. (2009). Evaluation of nasal cytology in subjects with chronic rhinitis: a 7-year study. *Am J Otolaryngol*, 30(5), 312-317.

- Chen, S. T., Sun, H. L., Lu, K. H., Lue, K. H. & Chou, M. C. (2006). Correlation of immunoglobulin E, eosinophil cationic protein, and eosinophil count with the severity of childhood perennial allergic rhinitis. *J Microbiol Immunol Infect*, 39(3), 212-218.
- Chen, X., Cho, D. B. & Yang, P. C. (2010). Double staining immunohistochemistry. *N Am J Med Sci*, 2(5), 241-245.
- Church, M. K. & Levi-Schaffer, F. (1997). The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol*, 99(2), 155-160.
- Coste, A., Rateau, J. G., Roudot-Thoraval, F., Chapelin, C., Gilain, L., Poron, F. et al. (1996). Increased epithelial cell proliferation in nasal polyps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 122(4), 432-436.
- Di Lorenzo, G., Mansueto, P., Melluso, M., Candore, G., Colombo, A., Pellitteri, M. E. et al. (1997). Allergic rhinitis to grass pollen: measurement of inflammatory mediators of mast cell and eosinophils in native nasal fluid lavage and in serum out of and during pollen season. *J Allergy Clin Immunol*, 100(6 Pt 1), 832-837.
- Dombrowicz, D. & Capron, M. (2001). Eosinophils, allergy and parasites. *Curr Opin Immunol*, 13(6), 716-720.
- Drake-Lee, A. B., Barker, T. H. & Thurley, K. W. (1984). Nasal polyps. Scanning electron microscopy and artifact. *J Laryngol Otol*, 98(3), 285-292.
- Drake-Lee, A. B., Lowe, D., Swanston, A. & Grace, A. (1984). Clinical profile and recurrence of nasal polyps. *J Laryngol Otol*, 98(8), 783-793.
- Duffy, J. P. (1993). Combined staining method for the demonstration of tissue eosinophils and mast cells. *J Histotechnology*, 16(2), 143-144.
- Eccles, R. (2000). Nasal airflow in health and disease. *Acta Otolaryngol*, 120(5), 580-595.
- Ehrlich, P. (1879). Ueber die spezifischen Granulationen des Blutes. *Archiv fuer Anatomie und Physiologie: Physiologische Abteilung*, 571-579.
- Fokkens, W., Lund, V. & Mullol, J. (2007a). EP3OS 2007: European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology*, 45(2), 97-101.
- Fokkens, W., Lund, V. & Mullol, J. (2007b). European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. *Rhinol Suppl*(20), 1-136.

- Gaga, M., Lambrou, P., Papageorgiou, N., Koulouris, N. G., Kosmas, E., Fragakis, S. et al. (2000). Eosinophils are a feature of upper and lower airway pathology in non-atopic asthma, irrespective of the presence of rhinitis. *Clin Exp Allergy*, 30(5), 663-669.
- Gell, P. G. H. & Coombs, R. R. A. (1963). *Clinical aspects of immunology*. Oxford,: Blackwell.
- Gevaert, P., Holtappels, G., Johansson, S. G., Cuvelier, C., Cauwenberge, P. & Bachert, C. (2005). Organization of secondary lymphoid tissue and local IgE formation to *Staphylococcus aureus* enterotoxins in nasal polyp tissue. *Allergy*, 60(1), 71-79.
- Gilbert, A. N. & Rosenwasser, A. M. (1987). Biological rhythmicity of nasal airway patency: a re-examination of the 'nasal cycle'. *Acta Otolaryngol*, 104(1-2), 180-186.
- Gosepath, J., Hoffmann, F., Schafer, D., Amedee, R. G. & Mann, W. J. (1999). Aspirin intolerance in patients with chronic sinusitis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 61(3), 146-150.
- Gruyter, d. (2004). *Pschyrembel* (Bd. 260). Berlin: Walther de Gruyther.
- Gwaltney, J. M., Jr., Phillips, C. D., Miller, R. D. & Riker, D. K. (1994). Computed tomographic study of the common cold. *N Engl J Med*, 330(1), 25-30.
- Hamilos, D. L., Leung, D. Y., Huston, D. P., Kamil, A., Wood, R. & Hamid, Q. (1998). GM-CSF, IL-5 and RANTES immunoreactivity and mRNA expression in chronic hyperplastic sinusitis with nasal polyposis (NP). *Clin Exp Allergy*, 28(9), 1145-1152.
- Hao, J., Pang, Y. T. & Wang, D. Y. (2006). Diffuse mucosal inflammation in nasal polyps and adjacent middle turbinate. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 134(2), 267-275.
- Hedman, J., Kaprio, J., Poussa, T. & Nieminen, M. M. (1999). Prevalence of asthma, aspirin intolerance, nasal polyposis and chronic obstructive pulmonary disease in a population-based study. *Int J Epidemiol*, 28(4), 717-722.
- Heinzerling, L. M., Burbach, G. J., Edenharter, G., Bachert, C., Bindeslev-Jensen, C., Bonini, S. et al. (2009). GA(2)LEN skin test study I: GA(2)LEN harmonization of skin prick testing: novel sensitization patterns for inhalant allergens in Europe. *Allergy*, 64(10), 1498-1506.

- Heppt, W. (1995). *Zytologie der Nasenschleimhaut, ein Leitfaden zur Rhinitisdiagnostik* (Bd. 1). Berlin: Springer Verlag.
- Hermann-Kunz, E. (1999). Incidence of allergic diseases in East and West Germany. *Gesundheitswesen*, 61 Spec No, S100-105.
- Hermann-Kunz, E. (2000). Allergische Krankheiten in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt*, 6.2000(43), 400-406.
- Hogan, S. P., Rosenberg, H. F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P. S., Lacy, P. et al. (2008). Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*, 38(5), 709-750.
- Hosemann, W., Gode, U. & Wagner, W. (1994). Epidemiology, pathophysiology of nasal polyposis, and spectrum of endonasal sinus surgery. *Am J Otolaryngol*, 15(2), 85-98.
- Hosemann, W., Kuhnel, T. & Pfeifer, M. (2000). Analgetika-Intoleranz und Polyposis nasi. *Laryngorhinootologie*, 79(1), 53-65.
- Hsu, S. M., Raine, L. & Fanger, H. (1981a). The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*, 75(6), 816-821.
- Hsu, S. M., Raine, L. & Fanger, H. (1981b). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29(4), 577-580.
- Jahnsen, F. L., Haraldsen, G., Aanesen, J. P., Haye, R. & Brandtzaeg, P. (1995). Eosinophil infiltration is related to increased expression of vascular cell adhesion molecule-1 in nasal polyps. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 12(6), 624-632.
- Jankowski, R., Bouchoua, F., Coffinet, L. & Vignaud, J. M. (2002). Clinical factors influencing the eosinophil infiltration of nasal polyps. *Rhinology*, 40(4), 173-178.
- Janson, C., Anto, J., Burney, P., Chinn, S., de Marco, R., Heinrich, J. et al. (2001). The European Community Respiratory Health Survey: what are the main results so far? European Community Respiratory Health Survey II. *Eur Respir J*, 18(3), 598-611.
- Kaldenbach, T., Schafer, D., Gosepath, J., Bittinger, F., Klimek, L. & Mann, W. J. (1999). Die Bedeutung eosinophiler Granulozyten in Beziehung zu Allergie

und Aspirin-Intoleranz bei Patienten mit Sinusitis polyposa. *Laryngorhinootologie*, 78(8), 429-434.

Kaliner, M. (1997). Allergy care in the next millennium: guidelines for the specialty. *J Allergy Clin Immunol*, 99(6 Pt 1), 729-734.

Kaliner, M. (1998). Medical management of sinusitis. *Am J Med Sci*, 316(1), 21-28.

Kaliner, M. A., Osguthorpe, J. D., Fireman, P., Anon, J., Georgitis, J., Davis, M. L. et al. (1997). Sinusitis: bench to bedside. Current findings, future directions. *J Allergy Clin Immunol*, 99(6 Pt 3), S829-848.

Kampe, M., Stalenheim, G., Janson, C., Stolt, I. & Carlson, M. (2007). Systemic and local eosinophil inflammation during the birch pollen season in allergic patients with predominant rhinitis or asthma. *Clin Mol Allergy*, 5, 4.

Kampe, M., Stolt, I., Lampinen, M., Janson, C., Stalenheim, G. & Carlson, M. (2011). Patients with allergic rhinitis and allergic asthma share the same pattern of eosinophil and neutrophil degranulation after allergen challenge. *Clin Mol Allergy*, 9(1), 3.

Karjalainen, J., Joki-Erkkila, V. P., Hulkkonen, J., Pessi, T., Nieminen, M. M., Aromaa, A. et al. (2003). The IL1A genotype is associated with nasal polyposis in asthmatic adults. *Allergy*, 58(5), 393-396.

Kayaba, H., Dombrowicz, D., Woerly, G., Papin, J. P., Loiseau, S. & Capron, M. (2001). Human eosinophils and human high affinity IgE receptor transgenic mouse eosinophils express low levels of high affinity IgE receptor, but release IL-10 upon receptor activation. *J Immunol*, 167(2), 995-1003.

Kayser, R. (1895). Die exakte Messung der Luftdurchgängigkeit der Nase. *Arch. Laryng. Rhinol.*, 8, 101.

Keith, P. K., Conway, M., Evans, S., Wong, D. A., Jordana, G., Pengelly, D. et al. (1994). Nasal polyps: effects of seasonal allergen exposure. *J Allergy Clin Immunol*, 93(3), 567-574.

Kita, H. (2011). Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunol Rev*, 242(1), 161-177.

Kramer, M. F., Burow, G., Pfrogner, E. & Rasp, G. (2004). In vitro diagnosis of chronic nasal inflammation. *Clin Exp Allergy*, 34(7), 1086-1092.

Kramer, M. F., Ostertag, P., Pfrogner, E. & Rasp, G. (2000). Nasal interleukin-5, immunoglobulin E, eosinophilic cationic protein, and soluble intercellular

- adhesion molecule-1 in chronic sinusitis, allergic rhinitis, and nasal polyposis. *Laryngoscope*, 110(6), 1056-1062.
- Kramer, M. F. & Rasp, G. (1999). Nasal polyposis: eosinophils and interleukin-5. *Allergy*, 54(7), 669-680.
- Kroegel, C. (1992). Immunologie des eosinophilen Granulozyten. *Pharmazie in unserer Zeit*, 21(2), 61-70.
- Kurth, B. M., Lange, C., Kamtsiuris, P. & Holling, H. (2009). [Health monitoring at the Robert Koch Institute. Status and perspectives]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 52(5), 557-570.
- Lammers, A. M., van de Kerkhof, P. C., Schalwijk, J. & Mier, P. D. (1986). Elastase, a marker for neutrophils in skin infiltrates. *Br J Dermatol*, 115(2), 181-186.
- Langen, U. (2012). [Classification of specific IgE antibodies in children with hay fever and other atopic diseases in Germany. Results of the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 55(3), 318-328.
- Langen, U., Schmitz, R. & Steppuhn, H. (2013). [Prevalence of allergic diseases in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 56(5-6), 698-706.
- Larsen, P. L., Tingsgaard, P. K., Harcourt, J., Sofsrud, G. & Tos, M. (1998). Nasal polyps and their relation to polyps/hypertrophic polypoid mucosa in the paranasal sinuses: a macro-, endo-, and microscopic study of autopsy materials. *Am J Rhinol*, 12(1), 45-51.
- Larsen, P. L. & Tos, M. (1991). Origin of nasal polyps. *Laryngoscope*, 101(3), 305-312.
- Larsen, P. L. & Tos, M. (2004). Origin of nasal polyps: an endoscopic autopsy study. *Laryngoscope*, 114(4), 710-719.
- Lund, V. J. (1995). Diagnosis and treatment of nasal polyps. *Bmj*, 311(7017), 1411-1414.
- Lund, V. J. & Kennedy, D. W. (1995). Quantification for staging sinusitis. The Staging and Therapy Group. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl*, 167, 17-21.

- May, A., Wagner, D., Langenbeck, U. & Weber, A. (2000). Familienuntersuchung bei Patienten mit ASS-Intoleranz und Rhinosinusitis. *Hno*, 48(9), 650-654.
- Meltzer, E. O., Hamilos, D. L., Hadley, J. A., Lanza, D. C., Marple, B. F., Nicklas, R. A. et al. (2004). Rhinosinusitis: establishing definitions for clinical research and patient care. *J Allergy Clin Immunol*, 114(6 Suppl), 155-212.
- Michaels, L. & Hellquist, H. B. (2001). *Ear, nose and throat histopathology* (Bd. 2): Springer-Verlag London Limited 2001.
- Monteseirin, J. & Vega, A. (2008). Eosinophil cationic protein is not only a distinctive eosinophil protein. *Thorax*, 63(2), 185; author reply 185.
- Monteseirin, J., Vega, A., Chacon, P., Camacho, M. J., El Bekay, R., Asturias, J. A. et al. (2007). Neutrophils as a novel source of eosinophil cationic protein in IgE-mediated processes. *J Immunol*, 179(4), 2634-2641.
- Munoz del Castillo, F., Jurado-Ramos, A., Fernandez-Conde, B. L., Soler, R., Barasona, M. J., Cantillo, E. et al. (2009). Allergic profile of nasal polyposis. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 19(2), 110-116.
- Mygind, N. (1990). Nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol*, 86(6 Pt 1), 827-829.
- Mygind, N. (1999). Advances in the medical treatment of nasal polyps. *Allergy*, 54 Suppl 53, 12-16.
- National Institute of Allergies and Infectious Diseases (2004). *The common cold*  
Verfügbar unter:  
[http://www.idph.state.ia.us/adper/common/pdf/abx/tab4\\_niaid\\_common\\_cold.pdf](http://www.idph.state.ia.us/adper/common/pdf/abx/tab4_niaid_common_cold.pdf)
- Nishino, T. (2000). Physiological and pathophysiological implications of upper airway reflexes in humans. *Jpn J Physiol*, 50(1), 3-14.
- Omenaas, E., Bakke, P., Elsayed, S., Hanoa, R. & Gulsvik, A. (1994). Total and specific serum IgE levels in adults: relationship to sex, age and environmental factors. *Clin Exp Allergy*, 24(6), 530-539.
- Pipkorn, U., Karlsson, G. & Enerback, L. (1988). A brush method to harvest cells from the nasal mucosa for microscopic and biochemical analysis. *J Immunol Methods*, 112(1), 37-42.
- Pirquet, C. v. (1906). Allergie. *Munchener Medizinische Wochenschrift*, 30, 1457-1458.

- Plager, D. A., Loegering, D. A., Checkel, J. L., Tang, J., Kephart, G. M., Caffes, P. L. et al. (2006). Major basic protein homolog (MBP2): a specific human eosinophil marker. *J Immunol*, 177(10), 7340-7345.
- Polzehl, D., Moeller, P., Riechelmann, H. & Perner, S. (2006). Distinct features of chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Allergy*, 61(11), 1275-1279.
- Putz R., P. R. (2000). *Sobotta, Atlas der Anatomie des Menschen* (Bd. 21). Jena: Urban & Fischer.
- Rasp, G. (1992). [Allergic rhinopathy: Magic Lite SQ Allergy Screen Inhalant and CAP-FEIA SX1--comparison of two allergen-specific screening tests in serum]. *Laryngorhinootologie*, 71(6), 298-301.
- Rasp, G. & Hochstrasser, K. (1993). Tryptase in nasal fluid is a useful marker of allergic rhinitis. *Allergy*, 48(2), 72-74.
- Rasp, G., Kramer, M. F., Ostertag, P. & Kastenbauer, E. (2000). Ein neues System zur Einteilung der Siebbeinpolyposis Einfluss einer kombinierten lokalen und systemischen Steroidtherapie. *Laryngorhinootologie*, 79(5), 266-272.
- Ray, N. F., Baraniuk, J. N., Thamer, M., Rinehart, C. S., Gergen, P. J., Kaliner, M. et al. (1999). Healthcare expenditures for sinusitis in 1996: contributions of asthma, rhinitis, and other airway disorders. *J Allergy Clin Immunol*, 103(3 Pt 1), 408-414.
- Reiß, M. (2009). *Facharztwissen HNO-Heilkunde* (Bd. 1). Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Rice, D. H. (2004). *Endoscopic paranasal sinus surgery* (Bd. 3). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Rinia, A. B., Kostamo, K., Ebbens, F. A., van Drunen, C. M. & Fokkens, W. J. (2007). Nasal polyposis: a cellular-based approach to answering questions. *Allergy*, 62(4), 348-358.
- Rudack, C., Sachse, F. & Alberty, J. (2004). Chronic rhinosinusitis--need for further classification? *Inflamm Res*, 53(3), 111-117.
- Rueff, F., Bergmann, K. C., Brockow, K., Fuchs, T., Grübl, A., Jung, K. et al. (2010). Leitlinie: Hauttests zur Diagnostik von allergischen Soforttypreaktionen. *Allergo Journal*(19), 402-415.
- Schiebler T., S. W. (2003). *Anatomie* (Bd. 8). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

- Schlaud, M. (2007). Allergische Erkrankungen. Ergebnisse aus dem Kinder- und Jugendgesundheitsurvey (KiGGS). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 50(5/6), 701-710.
- Settipane, G. A. (1986). Asthma, aspirin intolerance and nasal polyps. *N Engl Reg Allergy Proc*, 7(1), 32-37.
- Settipane, G. A. & Chafee, F. H. (1977). Nasal polyps in asthma and rhinitis. A review of 6,037 patients. *J Allergy Clin Immunol*, 59(1), 17-21.
- Shah, A. S., Ben-Shahar, Y., Moninger, T. O., Kline, J. N. & Welsh, M. J. (2009). Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science*, 325(5944), 1131-1134.
- Shwachman, H., Kulczycki, L. L., Mueller, H. L. & Flake, C. G. (1962). Nasal polyposis in patients with cystic fibrosis. *Pediatrics*, 30, 389-401.
- Simon, H. U., Weber, M., Becker, E., Zilberman, Y., Blaser, K. & Levi-Schaffer, F. (2000). Eosinophils maintain their capacity to signal and release eosinophil cationic protein upon repetitive stimulation with the same agonist. *J Immunol*, 165(7), 4069-4075.
- Simon, H. U., Yousefi, S., Schranz, C., Schapowal, A., Bachert, C. & Blaser, K. (1997). Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol*, 158(8), 3902-3908.
- Slavin, R. G., Spector, S. L., Bernstein, I. L., Kaliner, M. A., Kennedy, D. W., Virant, F. S. et al. (2005). The diagnosis and management of sinusitis: a practice parameter update. *J Allergy Clin Immunol*, 116(6 Suppl), S13-47.
- Songu, M. e. C., C. (2009). Sneezing reflex: facts and fiction. *Ther Adv Respir Dis*, 3(3), 131-141.
- Soni, A. (2008). Statistical Brief #204: Allergic Rhinitis: Trends in use and expenditures, 2000 and 2005.
- Sood, A. (2005). Diagnostic Significance of Nasal Eosinophilia in Allergic Rhinitis. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery*, 57(1), 13-16.
- Stammberger, H. (1999). Surgical treatment of nasal polyps: past, present, and future. *Allergy*, 54 Suppl 53, 7-11.
- Stammberger, H. & Posawetz, W. (1990). Functional endoscopic sinus surgery. Concept, indications and results of the Messerklinger technique. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 247(2), 63-76.

- Stewart, M. G. & Johnson, R. F. (2004). Chronic sinusitis: symptoms versus CT scan findings. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 12(1), 27-29.
- Stone, K. D., Prussin, C. & Metcalfe, D. D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), S73-80.
- Stoop, A. E., van der Heijden, H. A., Biewenga, J. & van der Baan, S. (1993). Eosinophils in nasal polyps and nasal mucosa: an immunohistochemical study. *J Allergy Clin Immunol*, 91(2), 616-622.
- Sur, S., Glitz, D. G., Kita, H., Kujawa, S. M., Peterson, E. A., Weiler, D. A. et al. (1998). Localization of eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein in neutrophilic leukocytes. *J Leukoc Biol*, 63(6), 715-722.
- Trepel, M. (2004). *Neuroanatomie, Struktur und Funktion* (Bd. 3): Elsevier GmbH Urban & Fischer Verlag.
- Van Cauwenberge, P. B., Ingels, K. J., Bachert, C. & Wang, D. Y. (1997). Microbiology of chronic sinusitis. *Acta Otorhinolaryngol Belg*, 51(4), 239-246.
- Van Crombruggen, K., Van Bruaene, N., Holtappels, G. & Bachert, C. (2010). Chronic sinusitis and rhinitis: clinical terminology "Chronic Rhinosinusitis" further supported. *Rhinology*, 48(1), 54-58.
- Varney, V. A., Jacobson, M. R., Sudderick, R. M., Robinson, D. S., Irani, A. M., Schwartz, L. B. et al. (1992). Immunohistology of the nasal mucosa following allergen-induced rhinitis. Identification of activated T lymphocytes, eosinophils, and neutrophils. *Am Rev Respir Dis*, 146(1), 170-176.
- Venge, P. (1994). The monitoring of inflammation by specific cellular markers. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 219, 47-54.
- Wald, E. R. (1996). Diagnosis and management of sinusitis in children. *Adv Pediatr Infect Dis*, 12, 1-20.
- Waldeyer, A. (2003). *Anatomie des Menschen* (Bd. 17. Auflage): de Gruyter.
- Widal, F., Abrami, P. & Lermoyez, J. (1987). First complete description of the aspirin idiosyncrasy-asthma-nasal polyposis syndrome (plus urticaria)--1922 (with a note on aspirin desensitization). By F. Widal, P. Abrami, J. Lermoyez. *J Asthma*, 24(5), 297-300.
- Wong, D. (1992). Blood Eosinophilia and Nasal Polyps. *Am J Rhinol*, 6(6), 195-198.

Zhang, Y., Liu, C., Han, D. & Zhang, L. (2011). Correlation of routine examinations for the diagnosis of house dust mite allergic rhinitis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 73(4), 182-188.

## 8. Danksagung

Zunächst gilt mein herzlicher Dank Herrn Prof. A. Berghaus, Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München. Er hat es mir ermöglicht, meine Doktorarbeit an einer namhaften Universitätsklinik anfertigen zu können, indem mich seine Klinik mit all ihren Mitarbeitern und technischen Einrichtungen unterstützte.

Herrn Prof. Dr. med. M. Kramer danke ich für die ausgezeichnete fachliche Unterstützung bei der Themenwahl und -eingrenzung. Außerdem war er während der gesamten Zeit stets ein hervorragender Ansprechpartner bei fachlichen Problemstellungen jeglicher Art.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn Dr. med. Moritz Gröger, der sowohl in den Monaten der klinischen Versuchsreihen als auch während der schriftlichen Ausarbeitung jederzeit für mich da war und mir fachlich wie menschlich stets hilfreich zur Seite stand.

Die engagierte Hilfestellung bei den labortechnischen Arbeiten durch Frau Brigitte Mack möchte ich besonders hervorheben. Ihr unermüdlicher Beistand als technische Assistentin war für die Erstellung meiner Arbeit absolut unerlässlich. Dafür bin ich ihr sehr dankbar.

Ebenso gilt mein herzlicher Dank Frau Elisabeth Pfrogner, die mich bei der Vorbereitung und Durchführung der Versuche vor allem methodisch ganz erheblich unterstützt hat. Auch für den bisweilen nötigen persönlichen Zuspruch möchte ich ihr danken.

Selbstverständlich danke ich auch allen Schwestern und Ärzten der Klinik, die mir bei der Vermittlung geeigneter Patienten und den nötigen Formalien geholfen haben.

Nicht zuletzt sei auch den vielen Patienten gedankt, ohne deren freundliche Einwilligung und Mithilfe meine Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

## Eidesstattliche Versicherung

Bernt, Andreas

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

*In-vitro Diagnostik der Nase. Ein Methodenvergleich anhand chronisch nasaler Erkrankungen*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Zürich, 07.11.2014

Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorandin/Doktorand