

UNTERSUCHUNGEN ZU LYMPHOZYTENREAKTIVITÄT,
ZYTOKINMUSTER UND HLA-ASSOZIATION BEI PATIENTEN
MIT NICKELKONTAKTALLERGIE

TONJA BARTL

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Thomas Ruzicka

**UNTERSUCHUNGEN ZU LYMPHOZYTENREAKTIVITÄT,
ZYTOKINMUSTER UND HLA-ASSOZIATION BEI PATIENTEN MIT
NICKELKONTAKTALLERGIE**

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

vorgelegt von
Tonja Bartl
aus
Rosenheim
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. P. Thomas
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. K. Radon, MSc
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. med. P. Thomas
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	13.12.2007

UNTERSUCHUNGEN ZU LYMPHOZYTENREAKTIVITÄT, ZYTOKINMUSTER UND HLA-ASSOZIATION BEI PATIENTEN MIT NICKELKONTAKTALLERGIE

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Nickelkontaktallergie	2
2.1.	Historischer Rückblick	2
2.2.	Allgemeines	3
2.3.	Vorkommen	4
2.3.1.	Häufigkeit und Verteilung in der Bevölkerung	4
2.3.2.	Auslöser	5
2.4.	Das allergische Kontaktekzem	9
2.5.	Ätiologie und Pathogenese des allergischen Kontaktekzems	10
2.6.	Diagnostik	11
2.6.1.	Anamnese und klinisches Bild	11
2.6.2.	Epikutantest	12
2.6.3.	Systemischer Provokationstest	13
2.7.	Therapie	15
3.	Immunologische Grundlagen	16
3.1.	Histologisches Bild des Kontaktekzems	16
3.2.	Das T-Zell-System	16
3.2.1.	Entwicklung der T-Zellen	16
3.2.2.	Differenzierung in TH1- und TH2-Zellen	17
3.2.3.	Regulatorische T-Lymphozyten	19
3.3.	Interleukin-4	19
3.4.	Interferon- γ	20
3.5.	Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)	21

3.5.1. Definition	21
3.5.2. MHC und Krankheit	22
4. Fragestellung der Arbeit	24
5. Material	25
5.1. Patienten	25
5.2. Reagenzien und Geräte	28
6. Methoden	30
6.1. Lymphozytenisolierung und Kulturansätze	30
6.1.1. Isolierung von Lymphozyten aus peripherem Blut	30
6.1.2. Konzentrationseinstellung	30
6.1.3. Stimulationsansätze	31
6.2. Lymphozytentransformationstest	31
6.2.1. Allgemeines Testprinzip	31
6.2.2. Durchführung	32
6.3. Zytokin-Konzentrationen im Kulturüberstand	32
6.3.1. Prinzip der Zytokinbestimmung mittels ELISA	32
6.3.2. Durchführung	33
6.3.3. Bestimmung der Interferon- γ -Konzentration	33
6.3.4. Bestimmung der Interleukin-4-Konzentration	35
6.4. HLA-Analyse	36
6.5. Statistik	36
7. Ergebnisse	38
7.1. Lymphozytenproliferation	38
7.1.1. Messwerte	38
7.1.2. Sensitivität und Spezifität	41
7.2. Interleukin-4-Bestimmung	42
7.3. Interferon- γ -Bestimmung	45
7.4. Zigarettenkonsum	47
7.5. HLA-Analyse	48

8.	Diskussion	50
8.1.	Überblick	50
8.2.	Patientencharakteristika	50
8.3.	Lymphozytentransformationstest	52
8.4.	Interleukin-4- und Interferon- γ -Konzentrationen	57
8.5.	Zigarettenkonsum	60
8.6.	HLA-Analyse	61
9.	Zusammenfassung	63
10.	Anhang	65
11.	Literaturverzeichnis	68
12.	Danksagung	78
13.	Lebenslauf	79

1. Einleitung

Allergien sind häufig und bekommen zusehends öffentliches Interesse (33, 16). Als Auslöser für allergische Kontaktekzeme steht Nickel als eines der häufigsten Kontaktallergene im Vordergrund (59). Dementsprechend werden viele Erkenntnisse im Bereich Kontaktallergie anhand von Untersuchungen zur Nickelallergie gewonnen.

Da Nickel in einer Vielzahl von Gebrauchsgegenständen des täglichen Lebens enthalten ist, bestehen viele Auslösesituationen für Ekzeme bei entsprechend Sensibilisierten. Durch die 2002 erfolgte Einführung nickelhaltiger Euromünzen und über zunehmende Verbreitung von Piercings ergaben sich zusätzliche Allergenquellen (1, 30).

Neben Anamnese und klinischem Bild ist der Epikutantest ein klassischer und standardisierter Diagnoseschritt zur Ermittlung einer Nickelkontaktallergie. Dass hier vor allem eine T-lymphozytäre Entzündungsreaktion vorherrscht wird aus dem mikroskopischen Bild eines nickelinduzierten Kontaktekzems deutlich (59). Auch die nach Nickelzugabe in vitro zu beobachtende Stimulierbarkeit von peripheren Blutlymphozyten nickelallergischer Personen („Lymphozytentransformationstest“) zeigt eine Rolle lymphozytärer Pathomechanismen. Allerdings wird noch kontrovers diskutiert, wie die Stimulierbarkeit von Lymphozyten und deren Zytokinmuster für das Grundverständnis der Krankheit und auch für eine eventuelle therapeutische Intervention zu werten sind (19).

Bisher wird der Lymphozytentransformationstest nicht als Routinemethode zur In-Vitro-Diagnostik einer Kontaktallergie akzeptiert. Allerdings kann mit dieser Methode, beispielsweise bei Medikamentenunverträglichkeit, Zusatzinformation zur Frage einer bestehenden Sensibilisierung erhalten werden (67).

Vor diesem Hintergrund soll im folgenden eine Einführung zu Klinik und Immunologie der Nickelkontaktallergie erfolgen.

2. Nickelkontaktallergie

2.1. Historischer Rückblick

Nickel ist ein überall zu findendes Metall, das seit der Antike von der Menschheit als ein natürlicher Legierungsbestandteil für Waffen benutzt wurde. Einige Jahrhunderte nach Christi Geburt verwendeten Kunsthandwerker eine Nickellegierung, die weißes Kupfer genannt wurde, für Haushalts- und Kunstgegenstände. Bis zum 17. Jahrhundert erschien eine kostengünstige Nickel-Zink-Kupfer-Legierung aus China in Europa. 1754 erkannte der schwedische Chemiker A. F. Cronstedt Nickel als das 28. Element im Periodensystem. Das volle Ausmaß der kommerziellen Nickelproduktion begann erst in den letzten 100 Jahren, als J. F. Wharton schmiedbares Nickel produzierte, welches 1865 zuerst in einer 3-Cent Münze auftauchte. In den 1890ern entdeckte L. F. Mond Nickelcarbonyl und führte den Mond'schen Carbonylprozeß ein, um Nickel aus Erz zu gewinnen. Kurz nachdem die kommerzielle Nutzung des Mond'schen Carbonylprozeß begann, wurde man durch zwei, 1903 bei gewerblichem Umgang aufgetretene Todesfälle, auf die hohe Toxizität von Nickelcarbonyl aufmerksam.

Obwohl Nickelcarbonyl immer als eine sehr toxische Verbindung galt, wurde im frühen 20. Jahrhundert die medizinische Wirkung von Nickelsulfat für die Behandlung von Epilepsie, Migräne und Neuralgien empfohlen (historischer Rückblick zusammengefasst nach Barceloux (6)).

Die „Nickelkrätze“ wurde 1912 erstmals bei Industriearbeitern beschrieben. Erste Berichte über die Karzinogenität bei Nickelarbeitern gehen auf das Jahr 1932 zurück (50).

Über die ersten Fälle einer durch alltägliche Gebrauchsgegenstände hervorgerufenen Nickeldermatitis wurde in den frühen 1930er Jahren berichtet. Bereits 20 Jahre später wurde Nickelsensibilisierung, vor allem bei Frauen, als sehr häufig betrachtet. Das Risiko der Nickelsensibilisierung hatte sich vom überschaubaren Arbeitsumfeld zum unkontrollierten privaten Gebrauch industrieller Produkte ausgeweitet (66).

2.2. Allgemeines

Nickel ist überall in der Umwelt zu finden und stellt ungefähr 0,008% der Erdkruste dar. Es ist ein Metall, das in vielen Legierungen und chemischen Verbindungen verwendet wird. Nur Eisen, Chrom und Blei werden in größeren Mengen produziert (76b).

Der Hauptteil der Nickelproduktion wird für die Herstellung von rostfreiem Stahl, Nickellegierungen und Nickelt Gusseisen verwendet. Diese sind in Objekten wie Münzen, Werkzeugen, Maschinen, elektronischer Ausstattung und Haushaltsgeräten enthalten.

Nickel ist ein silber-weißes Metall mit dem sich relativ leicht Nickel-Eisen-Legierungen bilden lassen. Im Gegensatz zu den löslichen Nickelsalzen (Chloride, Nitrate, Sulfate), sind metallisches Nickel, Nickelsulfide und -oxide kaum wasserlöslich (6).

Nickelcarbonyl (Synonym: Nickeltetra-carbonyl, $\text{Ni}(\text{CO})_4$) ist bei Raumtemperatur eine sich leicht verflüchtigende Flüssigkeit, die sich rasch in Kohlenmonoxid und Nickel zersetzt. Fast alle Fälle akuter Nickeltoxizität ergaben sich nach Exposition gegenüber Nickelcarbonyl. Die initialen Effekte schließen Irritationen des Respirationstrakts und unspezifische Symptome ein. Patienten mit schweren Vergiftungen entwickeln eine intensive pulmonale und gastrointestinale Toxizität. Tödliche Vergiftungen zeigten diffuse interstitielle Pneumonie und Hirnödeme als Haupttodesursachen (6).

Über die biologische Funktion des Nickels im Körper ist wenig bekannt. Ob Nickel ein essentielles Element ist, wird kontrovers diskutiert. Zwar wurden Hinweise gefunden, dass dem Nickel bei Tier und Menschen eine physiologische Bedeutung zukommt, klinisch relevante Nickelmangelsymptome sind jedoch bisher nur einmal als Wachstumsverlangsamung bei einem Kind nach langer Diät beschrieben. Eine nickelarme Diät, bei der Lebensmittel mit höherem Nickelgehalt (siehe Tabelle Nr.1) gemieden werden, führt insgesamt wahrscheinlich nicht zu Fehlernährungsproblemen, da selbst durch eine streng nickelarme Diät, die Nickelaufnahme nicht um mehr als 50% reduziert werden kann (15).

2.3. Vorkommen

2.3.1. Häufigkeit, Verteilung in der Bevölkerung

Nickel stellt nach wie vor eines der häufigsten, meist sogar das häufigste Kontaktallergen dar (59, 66). In der Kontaktallergen-Hitliste des Informationsverbandes dermatologischer Kliniken (IVDK) ist Nickel das häufigste Kontaktallergen bei den getesteten Patienten; für 2001 lag die mittlere Nickel-Sensibilisierungsquote, das heißt bei dem 2001 getesteten Patientengut, bei 15,9% (80). Exakte Zahlen zur Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung sind nur teilweise erhältlich. Eine in Süddeutschland durchgeführte Untersuchung ergab eine mittlere Nickel-Sensibilisierungsprävalenz von 13,1% in der Allgemeinbevölkerung (77). Bis auf wenige Studien, die versuchten, die tatsächliche Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung zu ermitteln, basieren die Statistiken zumeist auf Patientengut aus Kliniken und Praxen und sind damit vorselektiert (66). Generell sind Frauen um ein Vielfaches häufiger betroffen als ihre männlichen Artgenossen. Je nach verwendeter Literatur variieren die Häufigkeitsangaben zur Sensibilisierung gegenüber Nickel jedoch stark. In den Daten des IVDK lag die Nickelsensibilisierung 1995 für Frauen < 40 Jahren bei 35% (> 40 Jahre bei 13,2%) und für Männer < 40 Jahren bei 6% (> 40 Jahre bei 4,9%). Im Jahr 2001 waren die Nickelsensibilisierungsraten bei Frauen < 40 Jahren bei 29% (> 40 Jahren bei 15,2%). Die Sensibilisierungsraten der Männer waren ähnlich geblieben (80).

Die Ursache der Geschlechtsabhängigkeit ist unklar (37). Bei Frauen werden das Ohrlochstechen und Tragen von metallhaltigem Schmuck als häufigste Ursache der Sensibilisierung angenommen (59, 76b). Dennoch scheint die Erkrankungshäufigkeit selbst bei ohrringtragenden Männern geringer zu sein (76b). Und obwohl auch Männer in den letzten Jahren vermehrt Metallschmuck trugen, blieb die Inzidenz bei Männern stabil (55).

Nach Einführung einer Auszeichnungspflicht für nickelhaltige Produkte 1992, beziehungsweise Einführung der „Nickeldirektive“ sank zunächst die Sensibilisierungsrate (81). Gemäß dieser Nickelregulation darf ein Produkt, das längere Zeit mit der Haut in Kontakt bleibt, nicht mehr als 0,5 µg/cm²/Woche Nickel freisetzen (80). Ferner wurden auch saisonale Schwankungen mit geringerer Inzidenz im Sommer berichtet (55).

Eine Nickelallergie scheint nicht generell das Risiko für andere Kontaktallergien zu erhöhen. Zwar sind gleichzeitige Sensibilisierungen auf vor allem Kobalt, aber auch Kupfer und Palladium häufig, allerdings sind diese Metalle in Verbindungen allgemein miteinander assoziiert (22, 76b).

2.3.2. Auslöser

Die ergiebigsten Nickelquellen stellen Gebrauchsgegenstände wie Schmuck oder Brillengestelle dar, aber auch Zahnersatz und als innere Expositionsquelle Metallimplantate in der Orthopädie / Chirurgie, sowie Nahrungsmittel (50, 55). Üblicherweise entstehen Hauterscheinungen zunächst an Stellen des direkten Kontakts mit einem nickelhaltigen Gegenstand (Abbildung 1). Sekundär können diese aber auch an weiteren Hautarealen auftreten und symmetrisch lokalisiert sein (50) (Abbildung 2). Dies entspricht der klinischen Beschreibung von Streuherden bei allergischen Kontaktekzemen. Teilweise liegt auch eine hämatogene Auslösung zugrunde, zum Beispiel durch Korrosion von Metallimplantaten oder nahrungsassoziiertes Nickel.

Neben den mehr oder weniger offensichtlichen Nickelquellen, wie Schmuck, Münzen und anderen metallhaltigen Gegenständen, existiert auch eine Exposition von innen. Dies geschieht wie oben genannt über Implantate und Nahrung.

Der größte Nickelanteil, den der Mensch aufnimmt, erreicht den Körper über Nahrungsmittel. Nickel kann aber auch in geringen Mengen durch Hautkontakt oder Inhalation aufgenommen werden, zum Beispiel im Tabakrauch oder an Arbeitsplätzen mit Nickelverarbeitung. Obwohl die Inhalation von Nickel im Allgemeinen limitiert ist, könnte die pulmonale Aufnahme in speziellen Situationen wichtig sein, da im Gegensatz zur enteralen Resorption, 30-50 % des inhalierten Nickels absorbiert werden (93).

Unter den Nahrungsmitteln gibt es nickelreiche und nickelarme (Tabelle 1). Pflanzliche Nahrungsmittel enthalten allgemein mehr Nickel als tierische Produkte. Je nach Ackerboden und Verarbeitung schwankt der Nickelgehalt der Nahrungsmittel jedoch beträchtlich. Wasser, das längere Zeit in Töpfen oder

der Wasserleitung steht, kann sich mit Nickel anreichern. Industrielle Verarbeitungsmaßnahmen und Dosennahrung können geringe Mengen von Nickel hinzufügen. Beim Kochen säurehaltiger Nahrungsmittel, wie Spinat oder Rhabarber, soll Nickel aus Edelstahltöpfen und anderen nickelhaltigen Küchenutensilien in klinisch relevanten Mengen gelöst werden (15). Andere Autoren halten diese Nickelmenge, die aus Stahlkochgeschirr, während des Kochens freigesetzt werden kann, jedoch für vernachlässigbar (70).

Die durchschnittliche tägliche Nickelaufnahme unterliegt ebenfalls großen Variationen. Die Angaben schwanken je nach Diät, Umgebung und Autor zwischen 100-900µg und 200µg-4,5mg täglich (55, 70).

Die resorbierbare Nickelmenge wird außer vom Gesamtgehalt der Nahrung, durch Faktoren wie unterschiedliche Resorptionsfähigkeit des Individuums und Elementbindungsform des Nickels im Lebensmittel beeinflusst (50). Fasten oder eine Ileitis terminalis können die Nickelabsorption beispielsweise erhöhen (15). Der größte Teil des aufgenommenen Nickels wird im Gastrointestinaltrakt allerdings nicht absorbiert. Die intestinale Nickelabsorption wird nur auf ca. 1% geschätzt. Aus Flüssigkeiten ist die Resorptionsrate höher (60, 74).

Durch Einhalten einer Diät mit Lebensmitteln, die weniger Nickel enthalten, kann die Nickelaufnahme um etwa die Hälfte reduziert werden (93).

Zahlreiche Faktoren beeinflussen auch die Menge des Nickels, das die Haut erreicht. Eine bekannte Variable ist Schweiß, der bis zu 20mal mehr Nickel enthält als Plasma (15), beziehungsweise zu verstärkter Nickelfreisetzung bei Körperkontakt mit Metallen führt.

Von einigen Autoren wurde zunächst bezweifelt, ob über die tägliche Ernährung ausreichend Nickel zur Auslösung von Reaktionen bei sensibilisierten Individuen zugeführt wird (37).

Orale Provokation mittels natürlich nickelreicher Diät, die über 4 Tage zusätzlich verabreicht wurde, führte jedoch bei 10 von 12 Patienten zur Ekzemverschlechterung am 11. Tag. Der Nickelgehalt der zusätzlich verabreichten Diät betrug in der Zeit ca. 490µg - 860µg /Tag. Die Urinexkretion war in dieser Zeit durchschnittlich um das Vierfache angestiegen. Es wurde daraus gefolgert, dass natürlich vorkommende nickelreiche Diät zur Ekzemverschlechterung bei Nickelallergikern führen kann (60). Dies kann auch

über verblindete Nickelzuführung im oralen Provokationstest gezeigt werden (93, 27).



Abbildung 1: Kontaktallergisches Ekzem auf Nickel durch die Gürtelschnalle im Bereich des Nabels



Abbildung 2: Dyshidrosiformes Fußekzem bei Nickelallergie

Tabelle 1: Nickelreiche und nickelarme Nahrungsmittel (nach Bresser (15)):

nickelarm	nickelreich
<i>Fleisch, Fisch etc.</i> Alle Fleischsorten Geflügel, Fisch, Eier tiefgefrorener Fisch	größere Mengen Innereien, Heringe, Meeresfrüchte, Shrimps Muscheln, Fischkonserven
<i>Milchprodukte</i> Alle Milchprodukte wie Butter, Käse, Milch, Joghurt	größere Mengen Edamerkäse, Sojamilch
<i>Gemüse</i> Rote Beete, Brokkoli, Rosenkohl, Weißkohl, Chinakohl, Dill, Pilze, Pfeffer, Gurken, Kartoffeln, Petersilie, Spargel, Aubergine	Sojaprodukte, Hülsenfrüchte (Erbsen, Bohnen, Linsen), Spinat, Grünkohl, Lauch, Kopfsalat, Bohnensprossen
<i>Getreide und Getreideprodukte</i> Reis, Cornflakes Popkorn Spaghetti, Makkaroni, Weißmehl geringe Mengen Vollkornprodukte	Haferflocken / Haferprodukte Buchweizen, Hirse, Weizenkleie Mehrkornbrote
<i>Früchte, Beeren usw.</i> Alle Beeren (außer Himbeeren) Pflirsiche, Birnen, Rosinen, Rhabarber	Feigen, Ananas, Himbeeren Backpflaumen Obstkonserven
<i>Getränke</i> Kaffee, Tee (kurz ziehen lassen, nicht in größeren Mengen), Limonade alkoholische Getränke (außer Wein und Bier)	Schokolade, kakaohalt. Getränke Tee aus Automaten
<i>Verschiedenes</i> Margarine, Hefe Erdnüsse, Haselnüsse, Leinsamen,	Schokolade, Marzipan, Mandeln, Sojaprodukte, Lakritze, Sonnenblumenkerne, Backpulver

2.4. Das allergische Kontaktekzem

Eine *akute allergische Kontaktdermatitis* entwickelt sich nach einer Latenz von mehreren Stunden bis zwei Tagen. Die zunächst oft asymmetrisch lokalisierten Hautveränderungen breiten sich über den Kontaktbereich hinaus aus und neigen zu Streureaktionen. Oft wird ein phasenhafter Verlauf sichtbar über anfangs starke Rötung (Erythemstadium) zu ödematöser Schwellung, Bläschen- und Blasenbildung, nässenden Erosionen (exsudatives Stadium) und schließlich Krustenbildung, Schuppung und postentzündlichem Resterythem (Rückbildungsstadium). Bei niedrigem Sensibilisierungsgrad können Bläschenbildung, Nässen oder auch Schuppenbildung fehlen.

Chronisch allergische Kontaktekzeme, oft durch wiederholten Kontakt mit Allergenen, zeigen auf dem Boden sich ständig wiederholender geringer Entzündungsreaktionen und regenerativer Vorgänge Epidermisverdickung und Hyperkeratose. Es besteht die Tendenz zu symmetrischer, unscharf begrenzter Ausprägung mit Streuung in herdferne Hautareale. Oft auf vorgeschädigter Haut auftretend, sind sie durch eine synchrone Polymorphie gekennzeichnet: Es findet sich ein Nebeneinander von Rötung, Bläschen, nässenden Erosionen, Krusten, Rhagaden, Schuppen, Hornhautverdickung und Lichenifikation. Das klinische Bild ist sehr variabel und hängt unter anderem ab vom Sensibilisierungsgrad des jeweiligen Patienten, der Exposition und hauteigenen Faktoren.

Beim Befallsmuster sind, abhängig vom Auslöser, verschiedenste Lokalisationsvarianten möglich: Fingerkuppenekzeme beim Umgang mit Pflanzen, Lacken, Desinfektionsmitteln, Unterschenkelekzeme auf dem Boden einer chronisch venösen Insuffizienz mit Pfropfallergie auf beispielsweise Lokalthérapeutika und allergische Kontaktreaktionen an Schleimhäuten durch Zahnfüllungen, Zahnpasten, Kondome oder Intimkosmetika.

Neben den üblichen durch Gebrauchsgegenstände verursachten Kontaktekzemen, kommt es in der Praxis immer wieder auch zu „*hämatogenen Kontaktekzemen*“. Hier verursacht Allergenzufuhr auf oralem oder parenteralem Weg („von innen her“) Aufflammreaktionen in früheren Ekzemarealen oder

disseminierte, oft symmetrisch verteilte Ekzemherde. Das Fehlen eines Anfangsherdes mit nachfolgender Streureaktion und initiale symmetrisch-disseminierte Ausprägung deuten auf innerliche Auslösung, beispielsweise durch Metallsalze (Nickel, Chrom) oder Medikamente. Bei Nickelkontaktallergie ist das Auftreten von Rötung und juckenden, dyshidrosiformen Bläschen an Handflächen und Fußsohlen, sowie in Finger- und Zehenzwischenräumen typisch. Nicht selten führt der andauernde Allergenkontakt einer häufig auch beruflich erworbenen Kontaktsensibilisierung, selbst bei Berufswechsel oder Reduktion der äußerlichen Exposition, zum Fortbestehen von disseminierten Ekzemherden (50, 47, 5).

Gelegentlich können auch Allgemeinsymptome wie Fieber, BSG-Erhöhung, Lymphknotenschwellung, Leukozytose mit Eosinophilie, selten asthmatische Anfälle, Diarrhöen sowie ZNS-Symptomatik auftreten (5, 13, 72).

2.5. Ätiologie und Pathogenese des allergischen Kontaktekzems

Das allergische Kontaktekzem entsteht als Folge einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV) auf ein Allergen. Die das Ekzem auslösenden Moleküle sind meist Haptene. Diese sind selbst zu klein, um als Antigene eine Immunreaktion auszulösen. Sie können aber die Epidermis durchdringen und an Haut-/Carrierproteine binden. Hapten-Carrier-Komplexe werden von antigenpräsentierenden Zellen der Haut (den Langerhans-Zellen) aufgenommen, welche dann zu regionalen Lymphknoten wandern. Dort findet eine T-Zell-Stimulation statt. Diese sogenannte Sensibilisierungsphase dauert etwa 10 bis 14 Tage.

Bei einer Reexposition mit dem Hapten migrieren die antigenspezifischen T-Zellen in die Haut, in der sie sich ansammeln und vermehren und über Zytokine eine lokale Entzündungsreaktion mit Vasodilatation, Ödembildung, später Hyperkeratose verursachen (21).

Besonders häufige Auslöser des allergischen Kontaktekzems sind Metalle wie Nickel, Kobalt und Chrom, bei der Gummiherstellung verwendete Hilfsstoffe wie Thiurame, Merkapto-Verbindungen, Inhaltsstoffe von äußerlich anzuwendenden

Präparaten wie Wollwachsalkohole, Konservierungsmittel wie Parabene, Arzneistoffe wie Neomycin, Benzocain, sowie Duft- und Aromastoffe wie Perubalsam / Kolophonium.

Unterschiedliche Dicke von Haut und speziell Hornschicht beeinflussen den Schutz vor Kontakttoxinen, was insbesondere an den Handflächen deutlich wird. Okklusivbedingungen (Handschuhe), Störungen der Hautbarriere und der physiologischen Hautfunktion wie Austrocknung, verminderte Pufferkapazität durch häufige Waschprozeduren, entzündliches Umfeld der Kontaktfläche, Umgang mit Irritantien oder Effekte körpereigener Sekrete erleichtern die Wirkung potentieller Kontaktallergene (5).

2.6. Diagnostik

2.6.1. Anamnese und klinisches Bild

Anamnese, klinisches Bild und In-Vivo-Provokationstests stehen bei der Diagnostik im Vordergrund.

Anamnese

Von Seiten des Patienten sind anamnestische Angaben oft wegweisend: Bei akuter allergischer Kontaktdermatitis beispielsweise der Hinweis auf Kontakt mit bestimmten Substanzen beziehungsweise Gegenstände im erkrankten Hautbereich oder Hauterscheinungen in Zusammenhang mit der Durchführung bestimmter Tätigkeiten.

Bei chronisch allergischen Kontaktekzemen ist ein Zusammenhang mit Auslösern für den Patienten oft nicht erkennbar.

Klinisches Bild

Es bietet sich entweder das Bild einer akuten kontaktallergischen Dermatitis mit Rötung, evtl. Bläschenbildung und Nässen, oder durch längeren Verlauf geprägter Ekzeme mit Rötung, verdickter, schuppender Haut und eventuell Rhagaden und Exkoriationen. Meist sind eher unscharfe Begrenzung, das Auftreten von Streuherden und begleitender Juckreiz typisch, allerdings sind

auch relativ scharf auf die Kontaktstelle begrenzte Ekzemareale möglich (Uhrarmband, Jeansknopf, Ohrringe). Zusätzliche Hinweise auf mögliche Auslöser kann das Verteilungsmuster geben.

2.6.2. Epikutantest

Bei einer Ekzemabklärung können meist die in Betracht kommenden Kontaktallergene durch den Epikutantest identifiziert werden. Es handelt sich dabei um einen Provokationstest, bei dem die Auslösbarkeit einer akuten allergischen Kontaktdermatitis in einem umschriebenen Hautbereich durch das Aufbringen der Verdachtssubstanzen geprüft wird. Getestet wird an der oberen Rückenhälfte, nur bei erscheinungsfreier Haut (79).

Die Basisdiagnostik wird mit einer Standardreihe durchgeführt, wobei eine Vielzahl an ergänzenden Testreihen (z. B. Friseurblock) zur Verfügung steht. Die Teststoffe werden in geeigneten Vehikeln (meist Vaseline) in nicht-irritativer /-toxischer Konzentration in Aluminiumkammern mittels handelsüblicher Testpflaster okklusiv und nicht verschiebbar auf die Haut gebracht. Die erste Ablesung der Hautreaktionen erfolgt nach der Abnahme des Testpflasters, gewöhnlich nach zwei Tagen. Weitere Ablesungen sind an Tag drei oder vier der Testung sowie für bestimmte Substanzen nach einer Woche (z. B. Kortikosteroide, Paraphenyldiamin) erforderlich.

Epikutantestungen werden nur vorgenommen, wenn es erforderlich ist, da man nicht ausschließen kann, dass ein gewisses Risiko zur Induzierung einer Kontaktallergie gegeben ist (13, 79).

Zu einer Verfälschung der Testergebnisse können zugleich bestehende Ekzemherde an anderen Körperstellen (gesteigerte, unspezifische Reagibilität), immunsuppressive Faktoren wie Glucocorticosteroide oder vorausgegangene UV-Bestrahlung (Abschwächung der Reaktionslage) führen.

Wichtig ist auch die Abgrenzung allergischer von unspezifischen, irritativen oder toxischen Reaktionen. Bei zahlreichen Testreaktionen auf nicht verwandte Substanzen, muss eine unspezifische Hyperreagibilität („angry back“) ausgeschlossen werden oder eine fraktionierte Nachtestung erfolgen (5).



Abbildung 3: Patientenrücken nach Durchführung eines Epikutantests – links positives Ergebnis auf Nickelsulfat, rechts Reaktion auf eine Ein-Euromünze.

2.6.3. Systemischer Provokationstest

Bei Verdacht auf eine hämatogene allergische Kontaktreaktion kann unter stationären Bedingungen durch fraktionierte orale beziehungsweise parenterale Gabe des verdächtigen Auslösers ein Provokationstest vorgenommen werden (5, 47). Voraussetzung für eine sinnvolle Testung ist idealerweise erscheinungsfreie Haut, mindestens jedoch ein stabiler Hautzustand, um eventuelle Änderungen des Hautzustandes beurteilen zu können. Epikutane Testreaktionen sollten abgeheilt sein, um ein sehr starkes Wiederaufflammen des Testareals zu vermeiden.

Provokationen von Handekzemen sowie disseminierter Ekzeme wurden nach Ingestion von 0,5-5,6mg Nickelsulfat beschrieben. Dabei bestehen große Schwankungen von individueller Sensitivität und resultierenden Reaktionsmustern (15, 55). Als positives Testergebnis wird ein Aufflammen von Ekzemherden meist innerhalb von 8 Stunden und Spätreaktionen bis 48 Stunden gewertet.

Falsch-negative Ergebnisse können durch große Variationen in der Bioverfügbarkeit der Metalle entstehen. Generell haben gleichzeitig gegessene Nahrungsmittel und Getränke Einfluss auf die Nickelresorption.

Falsch-positive Ergebnisse sind insbesondere bei Aufflackern von ehemaligen Epikutantestarealen möglich (15).

Auch Patienten mit negativem Ergebnis in der Epikutantestung können bei oraler Provokation positiv reagieren, jedoch seltener als Patienten mit positivem Epikutantest (93).

Es bleibt anzumerken, dass bei der oralen Provokation die verabreichten Provokationsdosen höher liegen, als die Exposition über Nahrungsmittel ist. Die Notwendigkeit einer unphysiologisch hohen Provokationsdosis ergibt sich jedoch aus der sehr unterschiedlichen Resorption in Abhängigkeit insbesondere von gleichzeitig konsumierten Lebensmitteln und Getränken. Die orale Provokationsdosis muss außerdem so hoch sein, dass bei einer vernünftigen Anzahl nickelsensitiver Personen eine reproduzierbare Dermatitis erreicht werden kann, ohne atypische klinische Reaktionen hervorzurufen. Die Dosis sollte ferner hoch genug sein, um unspezifische Irritationen wie externen Nickelkontakt, pseudoallergische Nahrungsmittelallergie etc. zu überdecken. Gemäß der lebensmitteltoxischen Literatur ist die Toxizität von Nickel nach oraler Aufnahme sehr gering, so dass mit einer Intoxikation bei Provokation mit angemessener Dosis nicht zu rechnen ist (50).

Zum Vergleich: früher wurden 65-195mg Nickelsulfat für die Behandlung von Diarrhö und Epilepsie empfohlen, jedoch bewirkte die Aufnahme von 325mg Nickelsulfat Übelkeit, Schwindel und verlangsamten Puls. Die geschätzte Aufnahme von 0,5-2,5g Nickel aus Nickelsulfat- und Nickelchlorid-kontaminiertem Trinkwasser verursachte bei 32 Arbeitern Übelkeit, Erbrechen, Unwohlsein, Schwindel, Diarrhö, Kopfschmerzen, Husten und Dyspnoe (6).

Nun wird bei der oralen Provokation ausschließlich Nickelsulfat bewertet. Dieses gut lösliche Nickelsalz ist physiologisch besser verfügbar als der in Lebensmitteln gebundene Nickelanteil. Somit ist nicht klar, in wieweit Rückschlüsse auf andere Bindungsformen des Nickels in Lebensmitteln generell zulässig sind (50).

Durch nickelarme Diät konnte in verschiedenen klinischen Studien bei bis zu 59% der Untersuchten eine Abheilung oder Besserung der Hauterscheinungen erreicht werden. Es wurde festgestellt, dass eine sehr viel bessere Diät-Compliance erreicht wird, wenn die Patienten vorher erlebt haben, dass sich auf orale Provokation die Haut deutlich verschlechtert. Die orale Provokation ist also nicht nur diagnostischer Test, sondern kann den Patienten auch Nickel als Auslöser ihrer Ekzeme verständlich machen (15).

2.7. Therapie

Grundsätzlich steht das Erkennen und Meiden der auslösenden Substanzen und aggravierenden Faktoren im Vordergrund, dabei sollten vor allem auch berufliche und private Tätigkeitsfelder des Patienten betrachtet werden.

Die sonstige Behandlung kann nur symptomatisch erfolgen, dabei gelten die allgemeinen Prinzipien der allergischen Ekzembehandlung, bei der vor allem lokale Kortikosteroide zum Einsatz kommen (5, 13, 72).

Eine nickelarme Diät ist für ungefähr die Hälfte der Patienten hilfreich. Eine restriktive Diät bessert normalerweise Hauterscheinungen, die aber selten völlig verschwinden (93).

Desensibilisierung

Durch kieferorthopädische Behandlung konnte teilweise eine Toleranz induziert werden. Mädchen die vor dem Ohrlochstechen eine nickelhaltige Zahnspange tragen mussten, hatten seltener eine Nickelallergie, als solche, bei denen die Ohren früher durchstochen wurden (22).

Einige Untersucher konnten durch mehrwöchige orale Nickelgabe bei Meerschweinchen und Mäusen eine Nickeltoleranz induzieren. Diese Toleranz war bei vorher sensibilisierten Tieren jedoch nur temporär (4, 95).

Ein neuer therapeutischer Ansatz mit eventuellen Erfolgen besteht daher im Versuch der Desensibilisierung mittels regelmäßiger, oraler Gabe kleiner Mengen Nickels. Diese sollen den Grad der Allergie senken. Der Mechanismus ist jedoch noch unbekannt und es liegen noch keine weiterführenden Daten vor (65, 70, 76b).

3. Immunologische Grundlagen

3.1. Histologisches Bild des Kontaktekzems

Das Kontaktekzem ist histologisch zu Beginn der Entzündung charakterisiert durch eine Ansammlung von CD4⁺-T-Lymphozyten in den oberflächlichen Anteilen des Stratum papillare des Koriums. Einige Lymphozyten wandern in die Epidermis, wo sich ein interzelluläres Ödem („Spongiose“) und durch Zerreißung der Interzellularbrücken kleine Bläschen bilden. Die Langerhans-Zellen der Epidermis sind sehr potente antigenpräsentierende Zellen für die T-Lymphozyten. Deshalb findet die Bildung der kleinen Bläschen wahrscheinlich in der Nähe der Langerhans-Zellen statt. Entzündungsmediatoren bewirken eine Vasodilatation in der Dermis mit nachfolgender Ödembildung (21, 32, 59).

3.2. Das T-Zell-System

T-Lymphozyten dienen der Abwehr von virusinfizierten Zellen, Tumorzellen, Transplantaten und Fremdgewebe. Auch bei der humoralen Immunität sind T-Lymphozyten in Form der T-Helfer-Zellen beteiligt.

Da im Rahmen dieser Arbeit vor allem die zellvermittelte Immunität von Interesse ist, wird im folgenden nur noch auf das T-Zell-System eingegangen.

3.2.1. Entwicklung der T-Zellen

Bei der Reifung der T-Zellen findet eine Aufspaltung in zwei T-Zell-Populationen statt, die entweder das CD4- oder das CD8-Antigen tragen, wobei CD4 für die *T-Helferzell-Population (T_H)* und CD8 für die *zytotoxische T-Zell-Population* charakteristisch ist.

Zytotoxische T-Zellen reagieren auf Zellen, die Fremdartigene enthalten und töten diese durch Ausscheidung zytotoxischer Substanzen. Die Erkennung des Antigens ist den zytotoxischen T-Zellen nur möglich, wenn es gemeinsam mit MHC-Proteinen der Klasse I angeboten wird.

T-Helfer-Zellen sind an der humoralen Immunantwort mitbeteiligt. Die meisten Antigene allein können B-Zellen nicht stimulieren, sich zu

antikörperproduzierenden Plasmazellen zu entwickeln. Es wird dazu vielmehr die Hilfe der T-Helfer-Zellen benötigt. Die T-Helfer-Zellen erkennen das Antigen, welches von Antigen-präsentierenden Zellen auf ihrer Oberfläche dargeboten wird. Für die Antigenerkennung durch die T-Helfer-Zellen sind MHC-Proteine der Klasse II auf der Antigen-präsentierenden Zelle erforderlich (49).

Nach ihrer Entlassung in die Zirkulation findet eine weitere Differenzierung der reifen T-Zellen statt. Hierbei zirkulieren die *naiven T-Zellen* bis zu einem eventuellen Antigenkontakt außerhalb der lymphatischen Organe. Nach Antigenkontakt entstehen die sogenannten Memory-T-Zellen.

3.2.2. Differenzierung in TH1- und TH2-Zellen

Neben der Differenzierung in naive und Memory-T-Zellen gibt es nach weiterem Antigenkontakt eine funktionelle Differenzierung der T-Zellen in zwei unterschiedliche Subpopulationen: die TH1- und die TH2-Zellen. Auf die Sonderkonstellation regulatorischer T-Zellen (Treg) wird unter 3.2.3. eingegangen.

Bei Erstkontakt mit unterschiedlichen Antigenen (z. B. Bakterien, Pilze, Protozoen, Pollen) sind überwiegend Zellen des unspezifischen Immunsystems wie Makrophagen beteiligt. Die Antigenverarbeitung durch die unspezifischen Abwehrzellen wird durch genetische Suszeptibilität wie MHC-Komponenten, T-Zell-Rezeptor etc. beeinflusst und schafft ein Zytokinmilieu, das die weitere Immunreaktion entscheidend beeinflusst. Die weitere Antigenpräsentation wird vor allem durch dendritische Zellen übernommen. Bedingt durch das vorherrschende Zytokinmilieu sowie durch unterschiedliche Wege in der Antigenpräsentation, wird aus der ursprünglichen nicht determinierten T-Helfer-0-Zelle entweder eine TH1- oder eine TH2-Zelle.

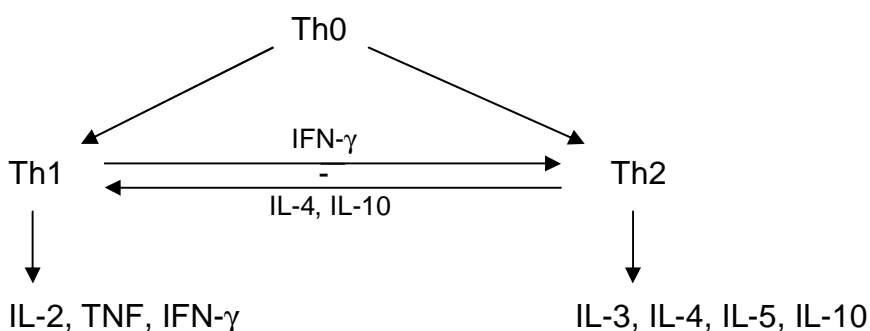
TH0-Zellen produzieren sowohl TH1- (IFN- γ), als auch TH2- (IL-4) Zytokine (10).

TH1-Zellen sezernieren vor allem Interleukin-2, Interferon- γ , TNF- β sowie GM-CSF und führen über Makrophagen-Aktivierung vor allem zu ausgeprägten Entzündungsvorgängen, die auch das Abtöten von intrazellulären Erregern

ermöglichen. Sie sind eher für die Zell-vermittelte Immunantwort verantwortlich (89).

TH2-Zellen bilden vor allem Interleukin-4 und Interleukin-5, daneben aber auch IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10 und IL-14 und aktivieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern. TH2-Zellen vermitteln somit eher die humorale Immunantwort (89).

Beide TH-Zellgruppen sind in der Lage, durch die eigenen Zytokine die jeweils andere Zellgruppe in ihrer Aktivität zu inhibieren. So führt Interferon- γ zu einer Behinderung der TH2-Zellen, während Interleukin-10 die Makrophagenaktivierung unterdrückt und zur Immunsuppression führt. Umgekehrt wirken die charakteristischen Zytokine positiv verstärkend auf die jeweilige Subpopulation, so z. B. IL-2 auf TH1- und IL-4 auf TH2-Zellen.



a) Aufteilung der T-Helfer (TH)-Zellen (nach Ring (75))

	TH1	TH2
IL-2	+	-
IL-3	+	+
IL-4	-	+
IFN- γ	+	-
GM-CSF	+	+
B-Zell-Hilfe	+	+

b) Merkmale der T-Helfer-Zell-Typen (nach den Erstbeschreibern Cher und Mosmann (26))

Abbildung 4 (a / b): Unterteilung von T-Helfer-Zellen

3.2.3. Regulatorische T-Lymphozyten

Regulatorische T-Lymphozyten (Treg) supprimieren immunologische Reaktionen vermutlich über mehrere Mechanismen. So wurde CD4⁺ T-Lymphozyten mit einer hohen CD25-Expression eine über Zell-Zell-Kontakt vermittelte Herunterregulation einer Antigen-(Nickel-)spezifischen Lymphozytenaktivierung zugeschrieben. Weiter können IL-10 produzierende Treg immunregulatorisch wirken (23, 24).

3.3. Interleukin-4

Interleukin-4 (IL-4) ist ein Zytokin, das von aktivierten TH2-Zellen produziert wird. Es beeinflusst primär B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen. Bei B-Zellen unterstützt IL-4 die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung. Weiterhin stellt es einen Faktor für das Umschalten von IgG- auf IgE-Produktion dar. Es induziert die MHC-Klasse-II-Expression ruhender B-Zellen und Makrophagen und fördert die Antigenpräsentation. Zusätzlich stimuliert IL-4 die Proliferation von Thymozyten und T-Zellen und fördert das Wachstum von Mastzellen.

Auf diese Art spielt IL-4 eine zentrale Rolle bei der Modulierung von Immunantworten und Entzündungsprozessen. Die Bestimmung von IL-4 ist wichtig bei der Bewertung allergischer Phänomene und autoimmuner Störungen (8).

3.4. Interferon- γ

Interferon- γ (IFN- γ) ist ein Zytokin, das von aktivierten TH1-Zellen produziert wird. Es handelt sich um ein lösliches Glykoprotein, das beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 kodiert ist. IFN- γ ist vor allem ein Modulator der meisten von T-Lymphozyten abhängigen Immunantworten, wie Vermittlung der Makrophagen- und B-Zell-Aktivierung, Steigerung der T-Lymphozytenaktivität und Verstärkung der MHC-Antigenexpression. IFN- γ wirkt aber auch antiviral und antiproliferativ.

Bei fast allen messbaren Immunfunktionen konnte eine Beeinflussbarkeit durch IFN- γ gezeigt werden. Die meisten Zellen scheinen schätzungsweise zwischen 100-10000 IFN- γ -Rezeptoren zu besitzen. Die größere Anzahl wird auf Tumorzellen gefunden (7, 78).

Eines der hervorstechenden charakteristischen Merkmale des Kontaktekzems ist die Ansammlung mononukleärer Leukozyten. Sowohl T-Helfer- als auch zytotoxische T-Zellen bilden einen wesentlichen Teil dieses Infiltrats. Intradermale Injektion von IFN- γ führte in Versuchen zu einer Entzündungsreaktion mit Induration und Erythem und stimulierte die Migration von Lymphozyten in die Haut. Durch IFN- γ -neutralisierende Antikörper konnte sowohl eine induzierte Schwellungsreaktion, als auch die Lymphozytenmigration teilweise bis fast vollständig verhindert werden. Daraus wurde geschlossen, dass IFN- γ einen starken Stimulator der Lymphozytenmigration in die Haut darstellt, der somit bei der Entzündungsreaktion des Kontaktekzems eine wesentliche Rolle spielt (36, 41).

3.5. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

3.5.1. Definition

MHC-Antigene (major histocompatibility complex) wurden zunächst bei Tieren in Zusammenhang mit der Transplantationsimmunität entdeckt. In den 50er Jahren gelang es auch beim Menschen die entsprechenden Strukturen zu entdecken. Da im humanen System nach Transplantationen Antikörper gegen humane Leukozyten technisch am einfachsten dargestellt werden konnten, wurden die so definierten MHC-Antigene beim Menschen als „humane Leukozyten-Antigene“ (HLA) bezeichnet, obwohl sie schließlich auf nahezu allen kernhaltigen Zellen entdeckt wurden.

MHC-Antigene sind meist Glycoproteine, die in der Zelloberfläche verankert sind und aus zwei Polypeptidketten bestehen. Die Funktion des MHC besteht in einer möglichst umfassenden Antigen-Präsentation. Der Genkomplex, der beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodiert wird, zeichnet sich durch einen sehr ausgeprägten Polymorphismus aus.

Es werden MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II Gengruppen unterschieden:

Zu den *Klasse-I-Antigenen* gehören HLA-A, HLA-B und HLA-C, die auf allen kernhaltigen Zellen nachgewiesen werden können. CD8⁺ (zytotoxische) T-Zellen, die mit den MHC-Klasse-I-Peptidkomplexen reagieren werden aktiviert und können über die Sekretion von lytischen Enzymen Peptid-exprimierende Zellen lysieren. Zytotoxische T-Zellen können Fremdanigene auf der Zelloberfläche organismuseigener Zellen nur dann erkennen, wenn sie gemeinsam mit den eigenen MHC-I-Antigenen präsentiert werden.

Für *Klasse-II-Antigene* kodieren die Genorte DR, DQ und DP. Sie sind nur auf Makrophagen, B-Zellen und aktivierten T-Zellen zu finden. MHC-Klasse-II-Peptidkomplexe können CD4⁺-T-Zellen (Helfer-T-Zellen) aktivieren und zur Proliferation und Sekretion verschiedener Zytokine führen. Die aktivierten CD4⁺-T-Zellen können B-Zellen zur Antikörperbildung anregen.

Zwischen den MHC-Klasse-I und -II-Genen befinden sich für Komplementfaktoren kodierende Gene, deren Expressionsprodukte ursprünglich als *Klasse-III-Antigene* bezeichnet wurde (21).

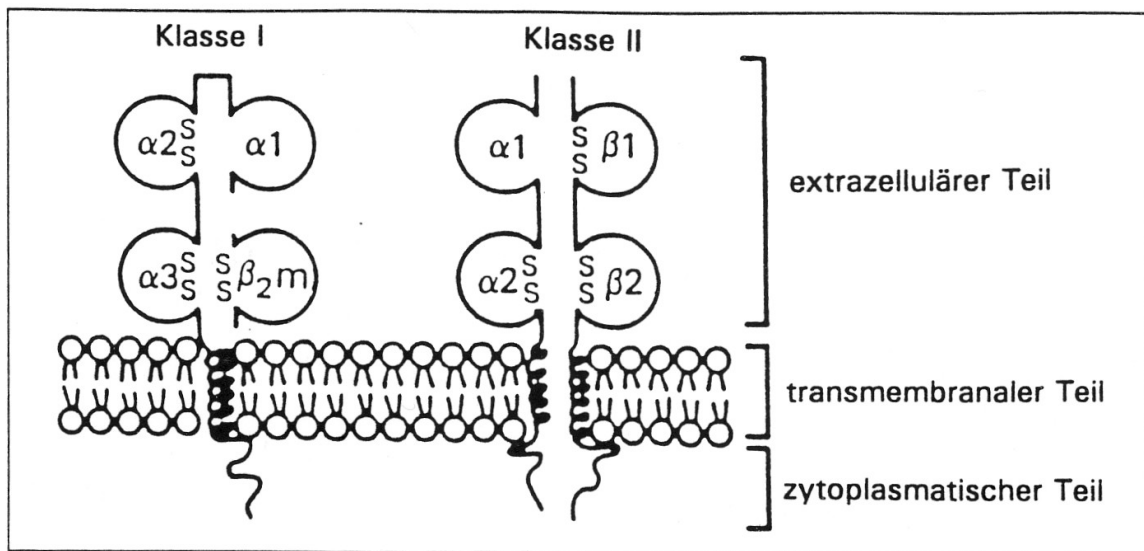


Abbildung 5: Struktur von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen (21)

3.5.2. MHC und Krankheit

Es bestehen Beziehungen zwischen dem Auftreten bestimmter Erkrankungen und dem Vorhandensein bestimmter HLA-Antigene. Die erste hochgradige Assoziation, die gefunden wurde, bestand zwischen HLA-B27 und dem Auftreten von Morbus Bechterew (ankylosierende Spondylitis). Danach wurden in rascher Folge viele weitere Assoziationen mit verschiedenen Erkrankungen entdeckt. Die Tatsache, dass die Empfänglichkeit für so viele verschiedene Erkrankungen in der doch sehr begrenzten genetischen Region des MHC auf Chromosom 6 kartiert ist, legt den Schluss nahe, dass für viele dieser Erkrankungen ein gemeinsames pathogenetisches Prinzip vorliegen könnte. Dies gilt insbesondere für Autoimmunprozesse, die mit der MHC-Klasse-II-Region assoziiert sind.

Erkrankungen, die hochgradig assoziiert sind mit einem autosomal dominant vererbten genetischen Merkmal, wie zum Beispiel einem HLA-Antigen, müssen per definitionem einen Hinweis auf Vererbung bieten. Wenn aber eineiige Zwillinge, die genetisch identisch sind, diskordant sein können für eine Erkrankung, muss man annehmen, dass Umweltfaktoren eine wesentliche Rolle bei der Auslösung der Erkrankung spielen (82).

In Bezug auf Nickelallergie wurde gezeigt, dass eventuell sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren, bei der Sensibilisierung eine Rolle spielen (18, 63).

Frühere Zwillingsstudien konnten für genetische Faktoren bei der Kontaktallergie keine Beweise zeigen. Bei Untersuchungen von Nickelallergie in einer weiblichen dänischen Zwillingspopulation wurde jedoch herausgefunden, dass eine genetische Prädisposition bei der Entwicklung der Nickelallergie möglicherweise eine Rolle spielt. Ergebnisse aus Familienstudien deuten ebenfalls auf eine genetische Komponente der allergischen Kontaktdermatitis hin (53).

Bei Meerschweinchen und Mäusen wurde gezeigt, dass die Gene, die Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ (IV) bestimmen, in Zusammenhang mit denen des Major Histokompatibilitätskomplexes liegen (83).

Eine Assoziation Nickelallergie mit HLA-gekoppeltem „Empfänglichkeitsgen“ erscheint daher möglich. Dies könnte man auch insofern erwägen, als Autoimmunprozessen, von denen einige mit bestimmten HLA-Antigenen assoziiert sind, ebenfalls eine gestörte Toleranz des Immunsystems zugrunde liegt (82).

4. Fragestellung der Arbeit

Für das Grundverständnis einer Krankheit, sowie für eventuelle therapeutische Interventionen, sind stets die immunologischen Mechanismen von Interesse (54). Ferner könnten aus bekannten immunologischen Vorgängen eventuell Fortschritte für die In-Vitro-Diagnostik abgeleitet werden, die bisher im Bereich der Kontaktallergien nur wenig praktische Bedeutung hat.

Diese Arbeit befasst sich diesbezüglich mit drei häufig diskutierten Fragekomplexen, sowie einer neueren Fragestellung, die sich aus der Zusammenstellung der Patientengruppen ergibt:

- Sind periphere Blut-Lymphozyten in vitro in einem sogenannten Lymphozytenreaktivitäts-/transformationstest durch Nickel stimulierbar?
- Sezernieren die stimulierten Lymphozyten ein bevorzugtes *Zytokinmuster*? Dabei wurde stellvertretend für den jeweils möglichen Weg der Immunreaktion (TH1- oder TH2-Muster) IFN- γ bzw. IL-4 zur Bestimmung ausgewählt.
- Inwiefern gibt es Unterschiede bei in vitro Lymphozytenreaktivität bzw. Zytokinmuster zwischen Patienten, die nur auf lokalen Allergenkontakt reagieren und Patienten, die auf systemische Allergenzufuhr reagieren?
- Besteht bei der Nickelkontaktallergie eine HLA-Assoziation und damit auch eine eventuelle genetische Komponente?

5. MATERIAL

Für die Durchführung von Lymphozytenstimulationstest, die Messung der In-Vitro-Zytokinfreisetzung und HLA-Analyse wurde, mit deren Einverständnis, Blut von verschiedenen Patienten verwendet. Die Patienten wurden nach bestimmten Voraussetzungen in drei verschiedene Gruppen ausgewählt, die im Folgenden näher beschrieben werden.

5.1. Patienten

Für diese Arbeit wurden insgesamt 30 Patienten im Alter von 19 bis 70 Jahren untersucht, die während 1992-1997 aufgrund von Ekzembeschwerden in der Dermatologischen Klinik und Poliklinik München vorstellig waren. Alle Patienten hatten in diesem Zeitraum sowohl eine Epikutantestung, als auch eine orale Provokationstestung auf Nickelsulfat erhalten. 20 Patienten waren weiblich, 10 männlich.

Patientengruppe A

In der Gruppe A wurden 10 Patienten mit Nickelkontaktallergie zusammengefasst, die bei der oralen Provokationstestung positiv reagiert hatten. 9 der Patienten hatten auch im Epikutantest ein positives Ergebnis gezeigt. Eine Patientin mit anamnestischen Hinweisen auf eine Nickelallergie zeigte im Epikutantest keine Reaktion auf Nickel, reagierte aber bei der oralen Provokation eindeutig positiv. Das mittlere Alter lag bei 47,6 Jahren und schwankte zwischen 28-70 Jahren. Acht der Patienten waren weiblich.

Patientengruppe B

In der Gruppe B wurden 10 Patienten mit Nickelkontaktallergie zusammengefasst, die bei der Epikutantestung positiv reagiert hatten, deren orale Provokationstestung jedoch negativ ausgefallen war. Das mittlere Alter lag bei 40,6 Jahren und schwankte zwischen 19-62 Jahren. Acht der Patienten waren weiblich.

Kontrollgruppe C

Die Kontrollgruppe bestand aus 10 weiteren Patienten, bei denen sich weder in der Epikutantest-, noch in der oralen Provokationstestung eine Nickelallergie nachweisen ließ. Das mittlere Alter lag bei 49,9 Jahren und schwankte zwischen 34-70 Jahren. Vier der Patienten waren weiblich.

Die Patienten- und Kontrollgruppen wurden zur weiteren Entwicklung ihrer Hautbeschwerden und Ekzemlokalisationen, sowie derzeitiger, eventueller Behandlung, Begleiterkrankungen, Medikamenteneinnahmen und Nikotinkonsum befragt. Daten zu Alter, Geschlecht und Zeitpunkt des Epikutantests beziehungsweise der oralen Provokation wurden festgehalten.

Bei den meisten der untersuchten Patienten bestand zusätzliche eine Sensibilisierung gegenüber zumindest einem weiteren Allergen.

Lediglich je ein Patient aus Gruppe A und B reagierte im Epikutantest ausschließlich positiv auf Nickelsulfat. Nur bei drei Patienten der Gruppe C war auch gegenüber allen anderen getesteten Allergenen keine Sensibilisierung festzustellen.

Das heißt auch Gruppe C umfasste Patienten, bei denen der Verdacht auf ein allergisches Kontaktekzem bestand, der Epikutantest und die orale Provokationstestung aber keine Allergie auf Nickel zeigte.

Die Patientencharakteristika mit Angabe von Alter, Geschlecht, eventuellen Ekzemlokalisationen, Nikotinkonsum, sowie eventuellen weiteren Kontaktallergien sind als Überblick in Tabelle 2 dargestellt.

Patient	Geschlecht m/w	Alter bei Testung	Ekzemverteilungsmuster bei Testung	Anzahl Zigaretten /Tag	Kontakt- allergien	orale Provozier- barkeit	Ni-ECT
A 1	w	28	Hände	25	Ni,+	ja	positiv
A 2	w	43	Hände, Füße	13	Ni	ja	positiv
A 3	w	42	Hände, Füße	0	Ni,+	ja	positiv
A 4	w	36	Hände, Füße	9	Ni,+	ja	positiv
A 5	w	38	Hände	0	Ni,+	ja	negativ x)
A 6	w	70	Hände, Füße	0	Ni,+	ja	positiv
A 7	w	45	Hände	20	Ni,+	ja	positiv
A 8	w	22	Auge	0	Ni,+	ja	positiv
A 9	m	54	Hände, Arme	10	Ni,+	ja	positiv
A10	m	45	Hände	35	Ni,+	ja	positiv
B 1	m	62	keine	0	Ni,+	nein	positiv
B 2	w	33	Ellbogen, Knie, Füße	1	Ni,+	nein	positiv
B 3	w	33	keine	15	Ni,+	nein	positiv
B 4	w	43	Rücken, Dekolletee, Gesicht	8	Ni,+	nein	positiv
B 5	w	59	Unterschenkel, Füße	0	Ni	nein	positiv
B 6	w	19	Hände	20	Ni,+	nein	positiv
B 7	w	32	Nabel, Füße	13	Ni,+	nein	positiv
B 8	m	52	Hände, Füße	20	Ni,+	nein	positiv
B 9	w	47	Gesicht, Nacken	11	Ni,+	nein	positiv
B10	w	26	Hände, Achseln	k. A.	Ni,+	nein	positiv
C 1	m	58	keine	20	--	nein	negativ
C 2	m	52	keine	0	+	nein	negativ
C 3	m	40	Hände	0	+	nein	negativ
C 4	m	37	Füße, Gesicht	0	--	nein	negativ
C 5	m	36	keine	10	--	nein	negativ
C 6	w	70	generalisiert, v.a. Hände	0	+	nein	negativ
C 7	w	63	Hände	0	--	nein	negativ
C 8	w	69	Hände, Füße, Oberkörper	0	+	nein	negativ
C 9	w	40	Hände	0	+	nein	negativ
C10	m	34	keine	5	+	nein	negativ

Tabelle 2: Patientencharakteristika im Überblick

Abkürzungen: m= männlich, w= weiblich, Ni= Nickelkontaktallergie, += weitere Kontaktallergien (außer Nickel), --= keine Kontaktallergie, v.a.= vor allem, k. A.= keine Angaben.

x) Wir haben Patienten A5 der Gruppe A zugeteilt, da das Auftreten von Ekzemen bei Kontakt mit nickelhaltigen Metallen angegeben wurde und auch eine klare orale Provozierbarkeit des Ekzems nach oraler Nickelgabe erfolgte

5.2. REAGENZIEN UND GERÄTE

Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Firma

LTT

Aqua ad injectabilia	Pharmacia
Essigsäure 3%	Merck
Ficoll-Paque	Pharmacia Biotech AB
Heparin-Natrium	Braun
RPMI-1640 Medium	Sigma cell culture TM
RPMI-Kulturmedium: RPMI-1640 Medium	Sigma cell culture TM
L-Glutamin	Biochrom/Seromed
Antibiot.-Antimyc.	Gibco
NEAA	Biochrom/Seromed
Hepes Buffer	Biochrom/Seromed
MEM Vitamins	Biochrom/Seromed
AB-Serum	Blutspendedienst
Methyl-[3H] Thymidin	Amersham
Nickelsulfat	Sigma
Phytohemagglutinin lyophil.	Seromed
Tetanustoxoid	Chiron Behring
24-Well Platten Cellstar steril	Greiner Labortechnik
96-Well Platten Cellstar steril	Greiner Labortechnik
Glass Fibre Filter	Inotech

IL-4

Cytokine, Jumbo ELISA for human IL-4	Biotrend
bestehend aus:	
Microtiterplatten mit anti-IL-4 beschichteten Antikörpern	
Rekombinanter IL-4-Standard	
Probenverdünnungspuffer	
Erkennungsantikörper (Anti-IL-4-Antikörper)	
Streptavidinkonjugat (Streptavidinperoxidase)	

Konjugatverdünnungspuffer
 TMB (3,3,5,5-tetramethylbenzidine) Substratkonzentrat
 Substratpuffer
 Stopplösung (H₂SO₄)
 Waschpuffer

IFN-g

IFN- γ Elisa Kit Diaclone
 bestehend aus:
 Microtiterplatten mit anti-IFN- γ beschichteten Antikörpern
 IFN- γ -Standard
 Standardverdünnungspuffer
 Erkennungsantikörper (Anti- IFN- γ -Antikörper)
 Verdünnungslösung für Erkennungantikörper
 Streptavidin-HRP (Streptavidinperoxidase)
 HRP-Verdünnungslösung
 TMB (3,3,5,5-tetramethylbenzidine) Substratlösung
 H₂SO₄-Stopplösung
 Waschpuffer

Geräte

Firma

Zentrifuge ROTIXa IKS	Hettich
Neubauer Zählkammer	
Inkubator	
Mikrotiterplattenschüttler	Heidolph
Cell Harvester	Inotech
Kolimatorplatten	
Automatic Filter Counting System	Inotech
Photometer (450nm-Filter)	Mikrotek
Laborsysteme GmbH	
Messwerteprogramm Mikro Win 3.0	Mikrotek
Laborsysteme GmbH	

6. METHODEN

6.1. Lymphozytenisolierung und Kulturansätze

6.1.1. Isolierung von Lymphozyten aus peripherem Blut

Durch Venenpunktion wurden pro Person 40 ml Blut gewonnen und mit 200 Einheiten Heparin antikoaguliert. Das heparinisierte Blut wurde in Reagenzröhrchen auf zuvor einpipetiertes Ficoll-Hypaque überschichtet und anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 1800 U/Min zentrifugiert. Durch die Zentrifugation lagern sich die Zellen geringerer Dichte, wie Lymphozyten und Monozyten in die Schicht zwischen Ficoll (Dichte von 1,077g/Liter) und Serum, während alle anderen Blutbestandteile (Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten) auf den Boden des Röhrchens absinken. Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Lymphozyten und Monozyten) konnten aus der Zwischenschicht zwischen Ficoll und Plasma mit einer Pipette abgezogen werden. Die so gewonnenen Zellen wurden 10 Minuten bei 1200 U/Min zentrifugiert um, den restlichen Überstand aus Plasma und Ficoll abgießen zu können. Die am Röhrchenboden abgesetzten Zellen wurden anschließend durch Resuspension mit RPMI und erneuter Zentrifugation zwei mal gewaschen. Schließlich wurden die mononukleären Zellen in RPMI-Kulturmedium aufgeschwemmt (in Anlehnung an 90).

6.1.2. Konzentrationseinstellung

Von der Zellsuspension wurden 10µl mit 190µl 3%iger Essigsäure verdünnt und ein Tropfen des Gemisches in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die durch die Essigsäure leicht angeschwollenen Lymphozyten wurden in 0,4µl, entsprechend dem Volumen der Neubauer-Kammer gezählt. Über die gezählten Lymphozyten pro Volumen und die bekannte Verdünnung mit Essigsäure lässt sich die Konzentration der Lymphozyten-Kulturmedium-Suspension errechnen. Durch Zugabe von entsprechender Menge RPMI-Kulturmedium wurde die Zellsuspension auf Konzentrationen von 10^6 Lymphozyten / ml eingestellt.

6.1.3. Stimulationsansätze

Für die folgenden Untersuchungen zu Lymphozytenproliferation beziehungsweise Zytokinmuster wurde je ein Stimulationsansatz erstellt. In eine 96/24-Wellplatte wurde jeweils 200µl bzw. 800µl der erstellten Lymphozytensuspension zu 20µl bzw. 80µl einer Testsubstanz gegeben. Getestet wurde mit:

a) reinem RPMI-Kulturmedium - zur Leerwertbestimmung

b) Phytohämagglutinin (PHA) - als Positivkontrolle

Dieses ist ein polyklonaler T-Zell-Aktivator (unabhängig von antigenspezifischen Rezeptoren).

c) Tetanustoxoid (TT) – als zweite Positivkontrolle -

da die große Mehrheit der Bevölkerung durch Impfung für dieses Antigen Immungedächtnis besitzt.

d) Nickelsulfatlösungen (NiSO_4) mit 10^{-4}M , 10^{-5}M und 10^{-6}M Endkonzentration, als Testsubstanz für den eventuellen Nachweis einer Sensibilisierung.

6.2. Lymphozytentransformationstest (LTT)

6.2.1. Allgemeines Testprinzip

T-Zellen werden durch spezifischen Antigenkontakt aktiviert und zur Proliferation angeregt. Als Parameter für die T-Zell-Funktion wird im Lymphozyten-Transformationstest, oder -Stimulationstest die Proliferationsfähigkeit der Zellen untersucht. Hierfür kultiviert man die Zellen mit einem Stimulus für 72-96 Stunden im Brutschrank. Die einsetzende Zellteilung ist mit einer Verdopplung des DNA-Gehaltes verbunden. Dem Kulturmedium in der Schlussphase der Kultur zugesetztes radioaktiv markiertes Thymidin, bei dem eine H-Position des Moleküls mit Tritium ^3H ersetzt ist, führt dazu, dass sich teilende Zellen radioaktiv markiertes Thymidin in ihre DNA einbauen. Nach weiteren 16-24 Stunden Zellkultur werden die Zellen mit automatisierten Geräten "geerntet", das heißt aus den Löchern der Kulturplatte herausgespült und durch einen Glasfaserfilter geleitet. Hier bleiben die Zellen beziehungsweise die hochmolekulare radioaktiv markierte DNA hängen. Die

Radioaktivität der Filter wird in einem β -Zähler ermittelt. Sie korreliert mit dem Ausmaß an DNA-Replikation und damit der Zellproliferation.

6.2.2. Durchführung

Von jeder Testsubstanz (a-d) wurden pro Patient drei Ansätze erstellt und die verschiedenen Ansätze fünf Tage im Brutschrank bei 37° und 5% CO₂ inkubiert. Nach fünf Tagen erfolgte die Zugabe von 20 μ l radioaktiv markiertem Thymidin. Anschließend wurde die Zellkultur mindestens weitere 16 Stunden bebrütet und danach bei -80° tiefgefroren, um die Zellmembranen der Lymphozyten zu zerstören. Die markierte DNA konnte nach dem Auftauen mittels eines Cell Harvesters auf Glasfaserplatten geerntet werden. Deren Radioaktivität wurde mittels β -Zähler in Counts per minute (cpm) gemessen und der Mittelwert pro Testsubstanz aus den Dreifachansätzen gebildet.

Das Ausmaß der Lymphozytenproliferation wurde als Stimulationsindex (SI) im Vergleich zum Leerwert dargestellt. Er entspricht dem Quotienten aus gemessener Radioaktivität der Testansätze zu Radioaktivität der Ansätze mit reinem Kulturmedium.

$$SI = \frac{\text{Mittelwert in cpm der Kultur mit Testsubstanz}}{\text{Mittelwert in cpm bei reinem Kulturmedium}}$$

Ein Stimulationsindex von ≥ 2 wurde als positiv für eine Sensibilisierung gegenüber Nickelsulfat gewertet.

6.3. Zytokin-Konzentrationen im Kulturüberstand

6.3.1. Prinzip der Zytokinbestimmung mittels ELISA

Die Konzentrationen für Interleukin-4 und Interferon- γ wurden mittels Sandwich-ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent-assay) in den Zellkulturüberständen bestimmt.

Der Sandwich-ELISA dient zum Antigennachweis - in diesem Fall ein Zytokin. Dabei wird eine Trägersubstanz, meist eine Mikrotiterplatte mit einem zum Antigen korrespondierenden Antikörper beschichtet. Sind Antigene im

Untersuchungsmaterial vorhanden, binden sie an den Antikörper. Die Menge des gebundenen Antigens aus der Probe wird durch die Zugabe eines enzymmarkierten Zweitantikörpers, der unter Bildung eines "Sandwich" an das Antigen bindet, ermittelt. Durch das Enzym wird zugegebenes Substrat in einer Farbreaktion umgewandelt. Anhand einer mitgeführten Standardverdünnungsreihe kann, nach Erstellung einer Eichkurve, die Farbreaktion mit der Antigenkonzentration korreliert werden (21).

6.3.2. Durchführung

Für jede Testsubstanz wurde pro Patient ein Doppelansatz erstellt und die verschiedenen Ansätze sechs Tage im Brutschrank bei 37° und 5% CO₂ inkubiert.

Nach sechs Tagen wurden die Kulturüberstände abpipettiert, die Lymphozyten, die sich am Kulturboden abgesetzt hatten, verworfen. Anschließend wurden die Überstände bei -80° tiefgefroren, um eine gleichzeitige Testung aller Proben unter gleichen Bedingungen (Tag, Temperatur, Testplatten) gewährleisten zu können.

6.3.3. Bestimmung der Interferon- γ -Konzentration

Zunächst wurde mittels vorgefertigter Standardlösung eine Standardverdünnungsreihe, mit insgesamt sechs verschiedenen IFN- γ -Konzentrationen, folgendermaßen hergestellt: In die ersten Wells der Verdünnungsreihe wurden 200 μ l Standardlösung einpipettiert. Die folgenden Wells der Verdünnungsreihe waren mit jeweils 100 μ l Standardverdünnungspuffer versehen worden und erhielten nacheinander zusätzlich 100 μ l des vorhergehenden Standards. Aus dem Inhalt des letzten Standardwells wurden schließlich 100 μ l Standardverdünnung verworfen (siehe Abbildung 6).

Die restlichen Wells wurden mit je 100 μ l der zu bestimmenden Proben versehen. Alle Proben und Standardkonzentrationen wurden doppelt bestimmt. Zu allen Proben und Standards wurden 50 μ l einer monoklonalen Anti-IFN- γ - Antikörperlösung pipettiert und die Mikrotiterplatten abgedeckt, bei

6.3.4. Bestimmung der Interleukin-4-Konzentration

Die Mikrotiterplatten wurden mit Waschlösung fünf mal vorgewaschen. Im kommerziellen Testansatz enthaltener lyophilisierter Standard wurde in Verdünnungspuffer gelöst und eine Standardverdünnungsreihe analog zum Vorversuch hergestellt. Der gelöste Standard enthielt 500 pg/ml rekombinantes, humanes Interleukin-4. Daraus ergaben sich folgende Standardkonzentrationen:

1. 500 pg/ml	2. 250 pg/ml	3. 125 pg/ml	4. 62.5 pg/ml
5. 31,25 pg/ml	6. 15.6 pg/ml	7. 7,8 pg/ml	8. 0 pg/ml

Von den Standardlösungen wurden je 100µl in ein Well pipettiert.

Für die zu messenden Proben wurden gemäß Herstelleranweisung je 50µl Kulturüberstand mit 50µl Probenverdünnungspuffer gemischt und in die jeweiligen Wells gegeben. Alle Proben und Standards wurden wieder doppelt bestimmt.

Die Ansätze wurden 45 Minuten bei Raumtemperatur und permanentem Schütteln mit 350rpm inkubiert. Anschließend wurden die Platten fünf mal gewaschen.

Danach wurden je 100µl „Erkennungs“-Antikörper zugegeben und die Platten nochmals 45 Minuten bei Raumtemperatur und permanentem Schütteln mit 350rpm inkubiert.

Anschließend wurden die Platten wieder fünf mal gewaschen.

Pro Well wurden 100µl Streptavidinlösung zupipettiert und die Platten nach 30 Minuten Inkubation erneut fünf mal gewaschen.

100µl Substratlösung wurden jeweils zugegeben und die Platten nochmals 30 Minuten im Dunkeln auf übliche Weise inkubiert.

Durch Zugabe von 50µl Stopplösung wurde die Farbreaktion beendet und die Absorption pro Well im Photometer bei 450nm gemessen.

Die IL-4-Konzentrationen der Proben wurde über die Absorptionen der mitgeführten Standards mittels Eichkurve in einem Computerprogramm berechnet und die Ergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor zwei multipliziert. Aus den Messwerten der Doppelansätze von Standards und Proben wurde der Mittelwert berechnet.

Die Nachweisgrenze wurde mit 1,5 pg/ml angegeben (8). Für Messwerte unterhalb des Bestimmungsgrenzwerts wurden entsprechend der halben Nachweisgrenze Konzentrationen von 0,75 pg/ml angenommen.

6.4. HLA-Analyse

Die Lymphozyten der Patientengruppen A und B wurden auf HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Antigene untersucht. Die Bestimmung der HLA-A-, -B-, -C- und -DR-Allele übernahm freundlicherweise das Labor für Immungenetik der Universität München. Diese wurde für die MHC-Klasse-I serologisch, für die MHC-Klasse-II durch Amplifikation des DRB1 Gens aus genomischer DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt.

6.5. Statistik

Bezüglich der statistischen Auswertung wurde mit Herrn Prof. Hölzl vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Epidemiologie und Biomathematik (IBE) in Großhadern Rücksprache gehalten. Aufgrund der Beratung wurde zur Datenverarbeitung von Lymphozytenproliferation, Zytokinmessung und Nikotinkonsum schließlich der Mann-Whitney-U-Test und der H-Test nach Kruskal-Wallis ausgewählt.

Der Mann-Whitney-U-Test dient dem nichtparametrischen Vergleich zweier unabhängiger Stichproben und basiert auf einer gemeinsamen Rangreihe der Werte beider Stichproben (20). Der Kruskal-Wallis-Test ist eine Ausweitung des U-Tests nach Mann-Whitney für den Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Gruppen.

Zum Vergleich aller Gruppen (A, B, C) wurde vorab ein H-Test nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Als signifikant wurden Werte $<0,05$ erachtet.

Da aber auch gesamt die Nickelallergiker (Gruppe A+B) im Vergleich zur Kontrollgruppe C (Zweigruppenvergleich), sowie die genaueren Unterschiede der einzelnen Gruppen zueinander interessierten, wurde im Anschluß an den Kruskal-Wallis-H-Test jeweils der Mann-Whitney-U-Test für die verschiedenen

Gruppen durchgeführt. Aufgrund des multiplen Testens wurden hier erst Werte $< 0,01$ als signifikant erachtet.

Die Auswertung der Ergebnisse der HLA-Untersuchung wurde freundlicherweise im Münchner Labor für Immungenetik mittels Fischer-Exakt-Test durchgeführt. Dabei werden an Hand einer Vierfeldertabelle für jeden der untersuchten genetischen Marker zwischen Patienten- und Kontrollpopulation verglichen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wird berechnet um zu ermitteln, ob ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit verschiedener Merkmale zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe vorliegt. Da bei Häufigkeitsuntersuchungen im HLA-System meist sehr viele Vergleiche gleichzeitig angestellt werden, verwendet man in solchen Fällen eine p -Wert-Korrektur. Der p -Wert wird dazu mit der Anzahl der Vergleiche multipliziert (Bonferroni-Korrektur) (92).

Der Fischer-Exakt-Test gibt auch für kleine Fallzahlen die genaue Wahrscheinlichkeit wieder, mit der ein Unterschied so stark, oder stärker wie der gefundene rein zufallsbedingt auftritt (92).

7. ERGEBNISSE

7.1. Lymphozytenproliferation

7.1.1. Messwerte

Der Lymphozytenstimulationstest wurde als Maß für die T-Zell-Proliferation durch spezifischen Antigenkontakt durchgeführt. Das Ausmaß der Lymphozytenproliferation im Vergleich zum Leerwert, wurde als Stimulationsindex (SI) dargestellt. Für erhöhte Proliferationsraten mit einem $SI \geq 2$ wurde eine Sensibilisierung angenommen.

Tabelle 3 zeigt den kleinsten und größten Wert, Median und 25%- / 75%-Quantil für die verschiedenen Patientengruppen.

Gruppe		LW	SIPHA	SITT	SI1	SI2	SI3
Gruppe A	Min	179,00	7,09	6,16	0,15	0,37	0,72
	25%-Quantil	616,00	7,77	9,39	1,45	0,88	1,14
	Median	1207,50	14,62	11,59	3,72	4,05	1,29
	75%-Quantil	2027,25	38,76	33,44	6,08	8,77	2,64
	Max	3704,00	78,02	117,78	21,86	20,80	7,76
Gruppe B	Min	169,00	4,01	0,46	0,10	0,44	0,46
	25%-Quantil	495,75	15,39	5,84	0,61	0,63	0,88
	Median	568,50	25,00	15,33	1,60	1,26	1,02
	75%-Quantil	1260,50	33,41	52,93	5,96	5,36	1,45
	Max	2931,00	135,83	279,42	7,56	26,93	3,43
Gruppe C	Min	144,00	4,44	1,89	0,28	0,41	0,57
	25%-Quantil	243,75	4,76	6,65	0,32	0,44	0,65
	Median	333,50	41,81	12,93	0,52	0,63	0,86
	75%-Quartil	1289,25	72,94	16,08	0,78	1,28	1,24
	Max	4178,00	136,66	128,41	4,02	2,37	2,99
Insgesamt	Min	144,00	4,01	0,46	0,10	0,37	0,46
	25%-Quantil	344,75	7,70	7,22	0,34	0,58	0,82
	Median	590,50	22,45	13,06	1,35	0,99	1,07
	75%-Quantil	1456,00	55,11	44,21	4,88	4,35	1,47
	Max	4178,00	136,66	279,42	21,86	26,93	7,76

Tabelle 3: kleinster / größter Wert, Median und 25%- / 75%-Quantil im LTT für die jeweiligen Stimulationsansätze und Patientengruppen - die Werte für PHA, TT und Nickelkonzentrationen wurden aus den Stimulationsindices (SI) berechnet. Abkürzungen: LW= Leerwert (Kulturmedium), SIPHA= SI für Phytohämagglutininansätze, SITT= SI für Tetanustoxoidansätze, SI1/2/3= SI für $10^{-4}M/10^{-5}M/10^{-6}M$ NiSO₄, Min / Max = kleinster / größter Wert

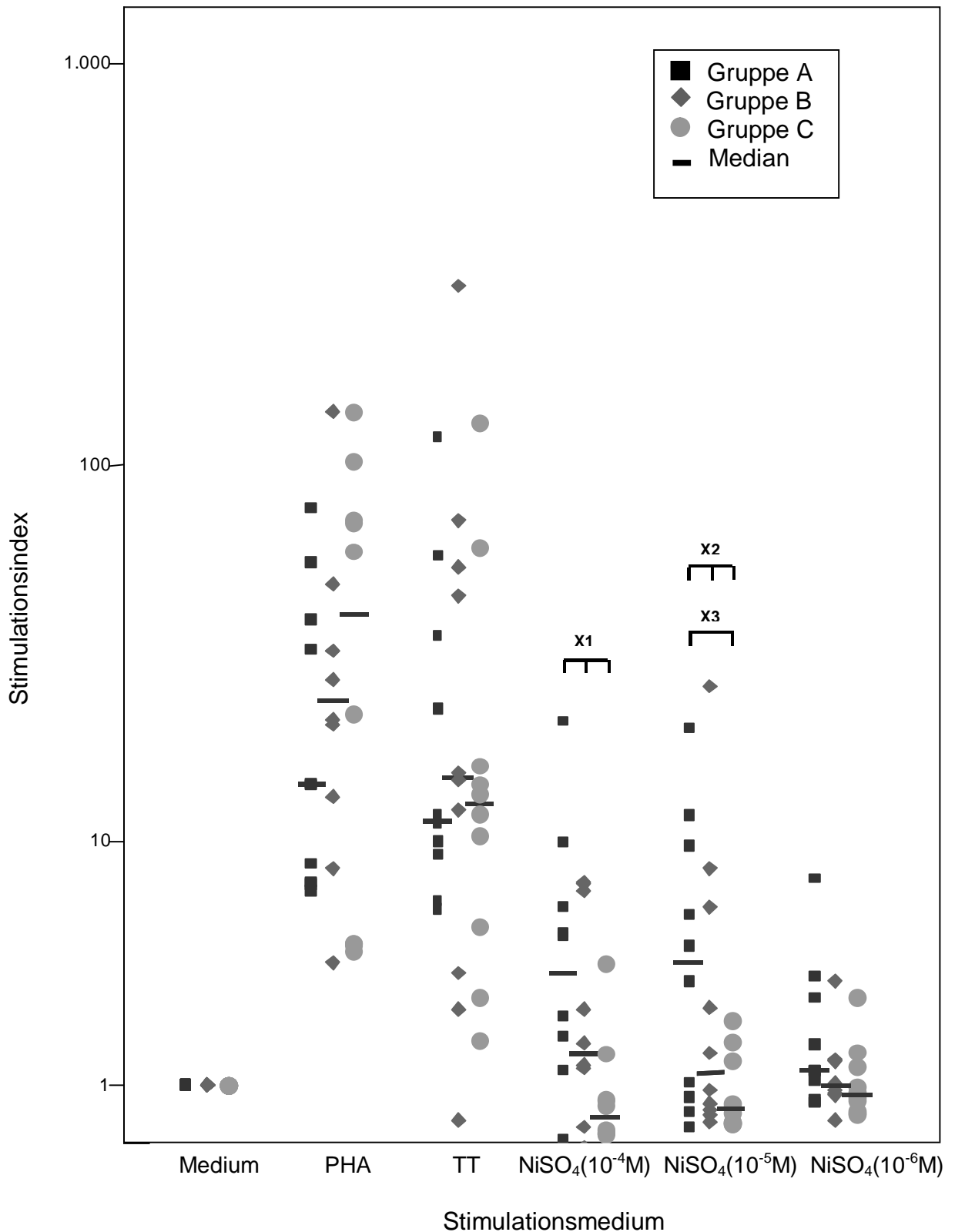


Abbildung 7: Lymphozytenproliferation dargestellt als Stimmulationsindex: jeweils 10 Patienten in Gruppe A, B und C; Abkürzungen: PHA= Phytohämagglutinin, TT= Tetanustoxoid, NiSO₄= Nickelsulfat, M= Mol/Liter
 X1/2 = auffälliger Unterschied Gruppe A+B zu C mit X1: p=0,049; X2: p=0,022
 X3 = auffälliger Unterschied Gruppe A zu C mit p=0,029

In Abbildung 7 wurden die jeweiligen Stimulationsindices und Mediane der Patientengruppen für verschiedene Nickelsulfatkonzentrationen graphisch dargestellt.

Die einzelnen Messergebnisse sind im Anhang in Tabelle 4 aufgeführt.

Ein Vergleich der drei Gruppen mit dem H-Test nach Kruskal-Wallis zeigte keine signifikanten Unterschiede. Dabei lagen die Stimulationsindices (SI) für 10^{-5} M Nickelsulfatansätze nur knapp ($p=0,061$) oberhalb des Signifikanzniveaus ($p<0,05$).

Beim Vergleich der Nickelallergiker (A+B) mit der Kontrollgruppe, beziehungsweise der einzelnen Gruppen untereinander, mit dem Mann-Whitney-U-Test, ergaben sich auffällige Unterschiede ($p<0,05$), die jedoch aufgrund der herabgesetzten Signifikanzschwelle ($p<0,01$) nicht signifikant getestet wurden.

Insgesamt zeigten sich bei den Nickelallergikern (Gruppe A+B) höhere Proliferationsraten auf Nickelsulfat als bei der Kontrollgruppe (Gruppe C).

Auffällige Werte wurden in den 10^{-4} M ($p=0,049$) und 10^{-5} M ($p=0,022$) Kulturen mit Nickelsulfat gemessen

Die stärkste nickelabhängige Proliferation wurde bei Patienten gemessen, die auf eine orale Provokation mit Nickel reagiert hatten (Gruppe A). Auffällige Unterschiede wurden für 10^{-5} M ($p=0,029$) und 10^{-4} M ($p=0,052$) Nickelsulfatkonzentrationen beim Vergleich der Gruppen A und C gefunden.

Die Messungen der Patienten, die nur im Epikutantest auf Nickel reagiert hatten (Gruppe B), ergaben im Vergleich zur Kontrollgruppe C ebenfalls höhere, jedoch keine signifikanten Werte ($p=0,089$ für 10^{-5} M Nickelsulfatkonzentrationen). Ein Vergleich der Patientengruppen A+B untereinander zeigte keine auffälligen Unterschiede.

In der Kontrollgruppe C wurde die Zellproliferation durch Nickel eher unterdrückt als angeregt.

Bezogen auf die Entscheidung zur Diagnose einer Sensibilisierung auf Nickel hatten 6 Patienten der Gruppe A, 5 Patienten der Gruppe B und 1 Patient der Kontrollgruppe ein positives Ergebnis, also einen Stimulationsindex > 2 bei zumindest einer der Nickelkonzentrationen.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Anzahl positiver Ergebnisse ($SI \geq 2$) in den jeweiligen Patientengruppen.

Gruppe	Anzahl der Patienten mit $SI \geq 2$		
	$10^{-4}M NiSO_4$	$10^{-5}M NiSO_4$	$10^{-6}M NiSO_4$
A	6	6	3
B	4	4	1
C	1	1	1

Tabelle 5: Anzahl der positiven Testergebnisse ($SI \geq 2$) im LTT bei den jeweiligen Ansätzen in den verschiedenen Patientengruppen. Abkürzungen: SI= Stimulationsindex, M= Mol/Liter, $NiSO_4$ = Nickelsulfat

7.1.2. Sensitivität und Spezifität:

Die Sensitivität gibt die Fähigkeit eines diagnostischen Tests an, Personen mit der fraglichen Krankheit vollständig herauszufiltern. Sie ist definiert als Verhältnis der Personen mit richtig positivem Testergebnis zu den tatsächlich Kranken.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl der richtig positiven Ergebnisse}}{\text{Anzahl d. richtig positiven + Anzahl d. falsch negativen Ergebnisse}}$$

Damit errechnet sich aus den Ergebnissen des Lymphozytentransformationstests eine Sensitivität von 0,5 für $10^{-4}M$ und $10^{-5}M$ Nickelkonzentrationen und von 0,2 für $10^{-6}M$ Nickelkonzentrationen.

Die Spezifität ist die Fähigkeit ausschließlich Personen mit der fraglichen Erkrankung zu erfassen. Sie ist definiert als das Verhältnis der Personen mit richtig negativem Testergebnis zu den Nichtkranken (25, 69).

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl der richtig negativen Ergebnisse}}{\text{Anzahl d. richtig negativen + Anzahl d. falsch positiven Ergebnisse}}$$

Die Spezifität beträgt damit bei allen drei Nickelkonzentrationen 0,9

7.2. Interleukin-4-Bestimmung

Mittels ELISA wurden die Interleukin-4-Konzentrationen in den Kulturüberständen bestimmt. Tabelle 6 zeigt den kleinsten und größten Wert, Median und 25%- / 75%-Quantil für die verschiedenen Patientengruppen.

Gruppe		LW	PHA	TT	Ni1oLW	Ni2oLW	Ni3oLW
Gruppe A	Min	0,75	3,50	0,00	0,00	0,00	0,00
	25%-Quantil	2,50	7,81	4,93	1,46	0,75	0,00
	Median	4,65	12,65	8,98	5,50	1,90	0,50
	75%-Quantil	13,90	20,45	28,05	21,46	5,49	2,04
	Max	20,60	39,10	35,25	34,40	24,30	6,10
Gruppe B	Min	0,75	0,00	1,30	0,00	0,00	0,00
	25%-Quantil	0,75	7,81	2,79	0,19	0,23	0,00
	Median	1,85	13,55	10,20	1,38	2,00	0,00
	75%-Quantil	8,13	15,24	36,19	13,83	5,75	0,00
	Max	34,20	41,10	99,20	25,70	12,70	1,60
Gruppe C	Min	0,75	1,20	0,00	0,00	0,00	0,00
	25%-Quantil	1,68	6,59	3,96	0,23	0,00	0,00
	Median	3,25	9,80	54,25	0,40	0,25	0,00
	75%-Quartil	5,83	15,88	100,05	0,78	1,04	0,38
	Max	10,80	24,60	309,10	2,90	5,20	1,50
Insgesamt	Min	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	25%-Quantil	0,94	6,56	3,26	0,23	0,00	0,00
	Median	3,80	11,95	11,20	0,95	1,03	0,00
	75%-Quantil	8,15	16,51	42,01	7,44	3,35	0,84
	Max	34,20	41,10	309,10	34,40	24,30	6,10

Tabelle 6: kleinster / größter Wert, Median und 25%- / 75%-Quantil der IL-4-Bestimmung für die jeweiligen Stimulationsansatz und Patientengruppen.

Abkürzungen: LW= Leerwert (Kulturmedium), PHA= Phytohämagglutinin, TT= Tetanustoxoid, Ni1/2/3oLW= Werte der $10^{-4}M/10^{-5}M/10^{-6}M$ Nickelsulfatansätze abzüglich Leerwert, Min / Max = kleinster / größter Wert.

Die jeweiligen Messergebnisse der Patientengruppen sind für die verschiedenen Nickelsulfatkonzentrationen in Abbildung 8 dargestellt .

Im Anhang sind die einzelnen Messergebnisse in Tabelle 7 aufgeführt.

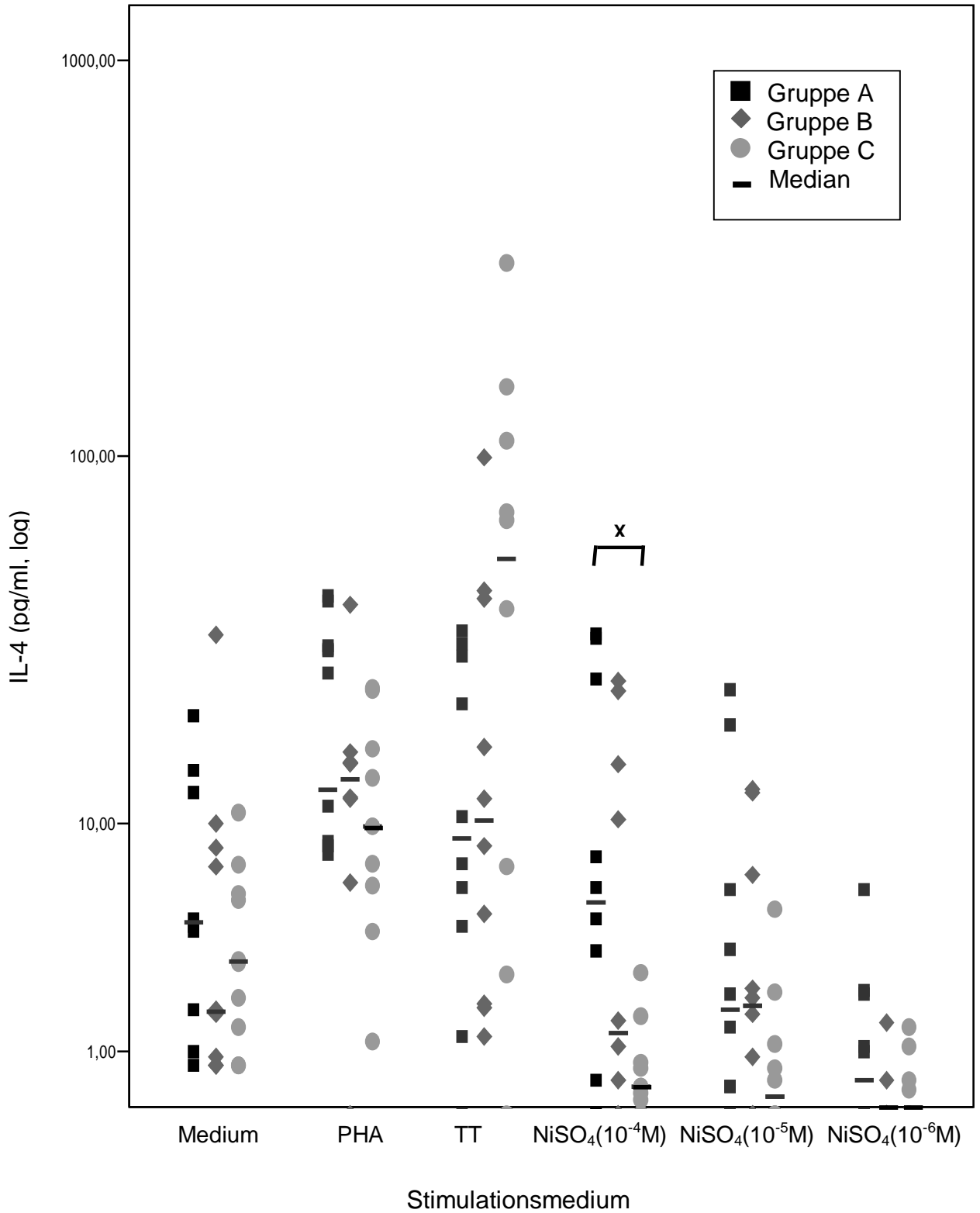


Abbildung 8: Interleukin-4-Konzentrationen im Zellkulturüberstand.

Abkürzungen: siehe Abbildung 7

X = auffälliger Unterschied Gruppe A zu C mit p=0,035

In allen Kulturen wurde eine gewisse IL-4-Basisproduktion auch ohne Stimulation (reines Kulturmedium) gemessen. Diese basale Produktion zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Zur weiteren Auswertung wurden die Leerwerte von den jeweiligen Interleukinkonzentrationen nach Stimulation abgezogen. Dabei ergaben sich in einigen Fällen negative Werte, die im Folgenden als Null betrachtet wurden.

In den 10^{-4} M und 10^{-5} M Nickelsulfatkulturen zeigten sich bei den Nickelallergikern (A+B) höhere IL-4-Werte als in der Kontrollgruppe C. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,061$).

Die höchsten IL-4-Konzentrationen wurden in der Patientengruppe mit oral provozierten Reaktionen (Gruppe A) gemessen. Der Unterschied lag im Vergleich zur Kontrollgruppe C für 10^{-4} M Nickelkonzentrationen mit $p=0,035$ knapp oberhalb des Signifikanzniveaus für multiples Testen ($p<0,01$).

Die übrigen Gruppen unterschieden sich im Mann-Whitney-U-Test ansonsten ebenfalls nicht signifikant.

Auch ein Vergleich der drei Gruppen mit dem H-Test nach Kruskal-Wallis zeigte keine signifikanten Unterschiede.

7.3. Interferon- γ -Bestimmung

In Abbildung 9 wurden die jeweiligen Werte der Patientengruppen für verschiedene Nickelsulfatkonzentrationen graphisch dargestellt. Die einzelnen Messergebnisse sind im Anhang als Tabelle 8 aufgeführt.

Die überwiegende Mehrzahl der Testpersonen zeigte keine nickelspezifische Interferon- γ -Produktion. In den mit Nickel stimulierten Kulturansätzen war Interferon- γ lediglich bei drei Patienten nachweisbar, diese stammten ausschließlich aus der Gruppe A.

Die Leerwerte sämtlicher Testpersonen lagen, im Gegensatz zur IL-4-Bestimmung, die auch in unstimulierten Kulturen eine gewisse Basisproduktion zeigte, unterhalb der Messgrenze (Nachweisgrenze: 5pg/ml). Die Messungen aus den PHA- und TT-Ansätzen, die als Positivkontrollen fungierten, ergaben dagegen vergleichsweise hohe Interferon- γ -Konzentrationen. (Mediane: PHA 455-521pg/ml, TT 261-379pg/ml).

Bei den drei Patienten der Gruppe A, die auf Nickelstimulation in vitro nachweisbares IFN- γ in den Kulturüberständen hatten, lagen die Werte mit 56-425pg/ml ebenfalls relativ hoch (Mittelwerte für NiSO₄ Kulturen 10⁻⁴ M: 77,0; 10⁻⁵ M: 67,2; 10⁻⁶ M: 27,9pg/ml). Die höchsten IFN- γ -Werte wurden bei 10⁻⁴ M und 10⁻⁵ M Nickelkonzentrationen gefunden. Bei der Kultur mit 10⁻⁶ M Nickelsulfat konnte nur noch bei einem Patienten IFN- γ gemessen werden.

Der Kruskal-Wallis-Test der drei Gruppen war für 10⁻⁴ M Nickelkonzentrationen signifikant ($p=0,04$).

Die Testung der einzelnen Gruppen gegeneinander im Mann-Whitney-U-Test zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen.

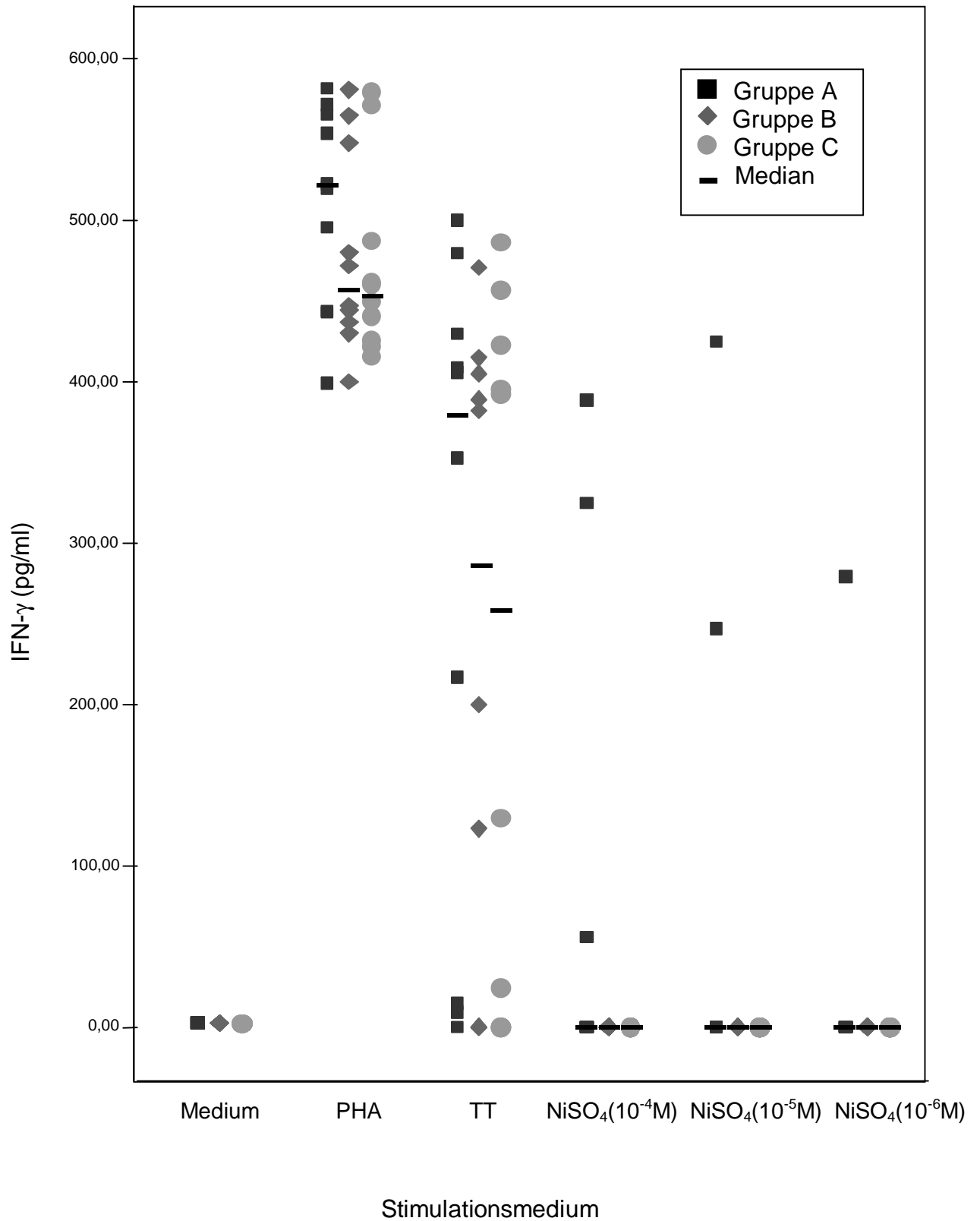


Abbildung 9: Interferon- γ -Konzentrationen im Zellkulturüberstand.

Abkürzungen siehe Abbildung 5

7.4. Zigarettenkonsum

Aufgrund der besonderen Situation bei der Absorption von Nickel durch Inhalation, stellte sich auch die Frage nach einer eventuellen Beziehung oder Einfluss zwischen Anzahl konsumierter Zigaretten und gewonnenen Messergebnissen.

Die Rauchergewohnheiten sind im Überblick in Tabelle 2 (Patientencharakteristika) auf Seite 27 und in Abbildung 10 dargestellt.

Für die statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis- und U-Test nach Mann-Whitney wurden die getesteten Personen in drei Gruppen eingeteilt: Nichtraucher, Wenigraucher mit einem durchschnittlichen Konsum von maximal 10 Zigaretten pro Tag und starke Raucher mit über 10 gerauchten Zigaretten täglich. Ein Patient machte keine Angaben zum Zigarettenkonsum.

Der H-Test nach Kruskal-Wallis ergab einen signifikanten Unterschied der drei Gruppen bei der IL-4-Konzentration für 10^{-4} M ($p=0,027$) und 10^{-5} M ($p=0,012$) Nickelsulfatansätze.

Für die Auswertung mittels Mann-Whitney-Test ergaben sich ebenfalls signifikante Werte ($p<0,01$).

Beide Rauchergruppen zusammengefasst hatten im Vergleich zu den Nichtrauchern höhere IL-4-Konzentrationen in den 10^{-4} M und 10^{-5} M Nickelsulfatansätzen. Dieser Unterschied war für 10^{-5} M Nickelsulfatkonzentrationen mit $p=0,004$ signifikant und lag für die 10^{-4} M Ansätze nur knapp oberhalb des Signifikanzniveaus ($p=0,022$).

Ebenfalls unterschieden sich die IL-4-Werte der Wenigraucher im Vergleich zu den Nichtrauchern für 10^{-4} M und 10^{-5} M Kulturen ($p=0,009$ und $0,007$). Die Werte der starken Raucher lagen für 10^{-5} M Ansätze knapp oberhalb der Signifikanzgrenze ($p=0,03$). Die Konzentrationen der Wenigraucher und der starken Raucher unterschieden sich nicht signifikant.

Zigarettenkonsum hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Interferonproduktion, oder die Lymphozytenproliferation.

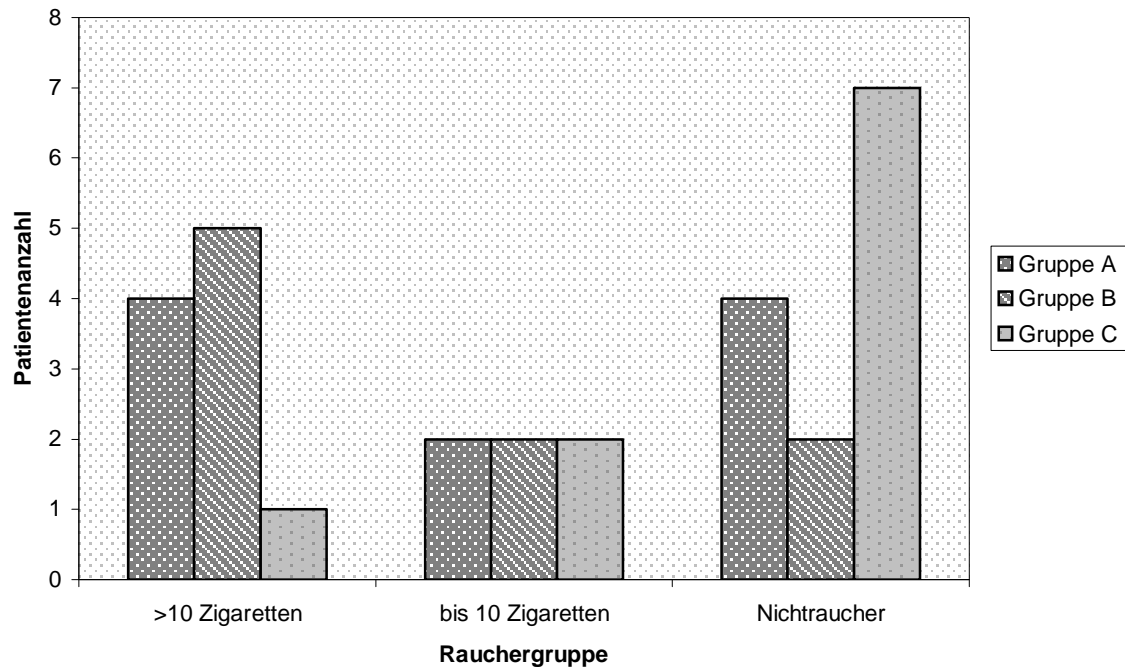


Abbildung 10: Übersicht über die Verteilung der Rauchgewohnheiten in den drei Patientengruppen

7.5. HLA-Analyse

Von den Personen der Patientengruppen A + B wurde zur Untersuchung einer eventuellen Assoziation eine HLA-Analyse durchgeführt. Es wurde hier zur Assoziation zwischen Nickelallergie und HLA-Merkmal untersucht, dementsprechend wurden die Patientengruppen A + B (Nickelallergiker) als ein gemeinsames Kollektiv für die eventuelle Assoziation angesehen. Bei einem Patienten war die Zellqualität im abgenommenen Blut für eine serologische HLA-Klasse-I-Analyse nicht ausreichend. Bei einem Patienten wurde versehentlich keine HLA-Klasse-II-Analyse durchgeführt.

Die einzelnen Typisierungsergebnisse sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Zur Auswertung wurden die Ergebnisse der Patienten mit den HLA-Merkmalen von 252 Panelpersonen des Labors für Immungenetik in München verglichen. Diese Vergleichspersonen wurden dort als Kontrollgruppe, auch für andere Studien, serologisch auf HLA-Klasse-I-Merkmale (HLA-A,-B,-C) und mittels PCR auf Klasse-II-Merkmale (HLA-DR) untersucht.

Die statistische Auswertung wurde mittels Fischer-Exakt-Test berechnet.

Auffällig war eine Häufung von HLA-B14 in der Patientengruppe (A+B) mit einer Frequenz von 21,05% im Vergleich zu 3,97% in der Kontrollgruppe.

Gemäß statistischer Auswertung ergab sich jedoch insgesamt keine signifikante Häufung für ein bestimmtes HLA-Merkmal.

Patient	A		B		Cw		DR	
A 1	2	3	27	51	1	1	1	11
A 2	1	24	8		7	7	3	13
A 3	1	28	8	60	3	7		
A 4	24	26	14	27	1	8	1	7
A 5	24	29	13	38	4	4	2	7
A 6	2	3	47	62	4	6	7	8
A 7	3	28	14	35	4	8	1	6
A 8	26	33	38	41			13	
A 9	26	33	14	40	8	8	7	13
A10	23	29	17	50	6	7	3	8
B 1	24	66	7	41	2	7	1	14
B 2	1	3	7	50	6		2	4
B 3	1	2	57	62	3	6	4	7
B 4	23	32	27	35	2	4	2	11
B 5							4	11
B 6	3	24	35	47	6		6	11
B 7	1	2	8	27	1		3	11
B 8	2	33	14	51	8		2	3
B 9	2	28	5	35	4		11	
B10	3		7	53	4		1	2

Tabelle 9: Ergebnisse der HLA-Analyse.

Dargestellt sind die typisierten HLA-Loci: HLA-A (A), -B, -Cw und -DR für die jeweiligen Patienten

8. Diskussion

8.1. Überblick

Beim allergischen Kontaktekzem handelt es sich um eine T-Zell-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp (Typ IV). In der Auslösephase vermehren sich antigen-spezifische T-Zellen, nachdem sie durch das entsprechende Allergen stimuliert wurden. Nach erneutem Nickelkontakt der Haut wandern Memory-/ Effektor-T-Lymphozyten ein. Darunter befinden sich CD4+ Helfer T-Lymphozyten (überwiegend vom TH1-Subtyp, teils aber auch vom TH2-Subtyp) und CD8+ T-Lymphozyten. Letzteren wird eine Schädigung der Keratinozyten mit Apoptoseinduktion zugeschrieben. Schließlich werden auch regulatorische T-Zellen rekrutiert und das Ekzem lässt bei Sistieren der Allergen-(Nickel-)Exposition nach.

Diese Arbeit befasst sich mit der Proliferation von Lymphozyten, nach Stimulation mittels Allergen, unter In-vitro-Bedingungen, sowie dem sezernierten Zytokinmuster, das auf die vorherrschende Subpopulation hinweisen soll.

Als Allergen wurde aufgrund der Häufigkeit einer Sensibilisierung in der Bevölkerung Nickel (hier als Nickelsulfat) ausgewählt.

Zusätzlich wurde von der Patientengruppe eine HLA-Analyse durchgeführt, die Hinweise auf eine mögliche Assoziation der Erkrankung mit einem HLA-Merkmal geben sollte.

So sollte die Aussagekraft des Nickel-spezifischen LTT im Hinblick auf Nickel-allergische Personen mit unterschiedlicher Reaktivität in der oralen Provokationstestung hinterfragt werden.

8.2. Patientencharakteristika

Die Untersuchungen erstreckten sich auf drei verschiedene Personengruppen: Patienten, die auf eine systemische, d.h. orale Nickelprovokation mit hämatogenen allergischen Kontaktekzemen reagiert hatten (Patientengruppe A), Patienten, die zwar nicht auf orale Nickelgabe, aber im Epikutantest lokal

auf Nickel reagiert hatten (Patientengruppe B) und eine Kontrollgruppe ohne Reaktionen auf Nickelapplikation (Patientengruppe C).

Besonderes Interesse galt dabei der Unterscheidung zwischen Patientengruppe A und B.

Die Fallzahlen, mit je 10 Patienten pro Gruppe, müssen als relativ klein angesehen werden. Es ergibt sich daraus zwangsläufig eine gewisse Selektion, da der orale Provokationstest mit Metallpräparationen vor allem bei Patienten mit wiederholten Ekzembildern oder Hand-/Fußekzemen und wegen der aufwendigen Prozedur auch nur an wenigen Zentren durchgeführt wird. Daraus ergibt sich auch die Problematik, dass die Kontrollgruppe (mit negativem Epikutantest und negativer oraler Provokationstestung auf Nickel) ebenfalls Ekzeme aufwies, beziehungsweise teilweise aus Patienten besteht, bei denen eine Allergie auf andere Substanzen vorlag.

Eine weitere Störgröße könnte darin bestehen, dass sich der Nikotinkonsum zwischen Fall- und Kontrollgruppe deutlich unterscheidet und ein Einfluss auf die untersuchten Parameter nicht sicher ausgeschlossen werden kann.

Eine Testung an größeren Fallzahlen, beziehungsweise die Auswahl geeigneterer Patienten, erwies sich als schwierig, da die Anzahl der Patienten, denen aus diagnostischen Gründen eine orale Provokation zusätzlich zur Epikutantestung angeraten wird, wegen des höheren Testrisikos bei systemischer Allergenzufuhr und des größeren zeitlichen und organisatorischen Aufwands eher gering ist. Die erforderliche stationäre Aufnahme führt außerdem bei einigen Patienten nur zu einer teilweisen Bereitschaft zur Mitarbeit, zumal der orale Provokationstest nur bei Freiwilligkeit durchgeführt wird. Trotz der eingeschränkten Aussagekraft konnten jedoch interessante Ergebnisse gezeigt werden.

Es fällt ferner auf, dass die Geschlechterverteilung vor allem in den Patientengruppen deutlich zugunsten der Frauen verschoben ist. Dies spiegelt jedoch die allgemeine Situation wider, da Frauen auch deutlich häufiger von einer Nickelallergie betroffen sind.

Von den Testpersonen wurde ein Lymphozytentransformationstest als Maß für die Lymphozytenproliferation durchgeführt. Nach Stimulation der Lymphozyten mit Nickelsulfat wurden ferner mittels ELISA, in den Kulturüberständen Interferon- γ , stellvertretend für ein TH1-Zytokinmuster und Interleukin-4, als TH2-Zytokin bestimmt. Die HLA-Analyse wurde auswärts durchgeführt. Hintergründe und Ergebnisse werden im Folgenden jeweils diskutiert.

8.3. Lymphozytentransformationstest (LTT)

Der erste LTT wurde 1970 bei MacLeod et al. beschrieben (34). Die überwiegende Mehrzahl der Autoren berichtet seither über eine durch Nickel stimulierbare, erhöhte Lymphozytenproliferation. Die Aussagekraft wird jedoch teilweise sehr unterschiedlich bewertet. Nordlind et al. (61) fanden 1993 bei durch Nickel erhöhter Lymphozytenproliferation keinen Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen. Dagegen zeigte im Vergleich zu den Kontrollpersonen die große Mehrzahl der Nickelallergiker zum Beispiel bei Untersuchungen von Al-Tawil, Marcusson, Möller (3) eine signifikant höhere Lymphozytenreaktion. In den Arbeiten von von Blomberg et al. (96) sowie Räsänen und Tuomi (71) wurde eine signifikant erhöhte Lymphozytenproliferation bei den Patientengruppen mit positivem Nickel-Epikutantest gemessen, jedoch wurde, vor allem bei höheren Nickelkonzentrationen im LTT, auch über vermehrt falsch positive Ergebnisse in der Kontrollgruppe berichtet.

Dies limitierte die diagnostisch Aussagekraft des LTT als In-Vitro-Korrelat des Hauttests. Zu diskutieren ist bei einigen Patienten auch, ob ein positiver LTT eventuell eine später auftretende Hautreaktivität aufdecken könnte (96), oder ob es sich um irritative, unspezifische Testreaktionen im Epikutantest handeln könnte (25, 76b). Da meist selektiertes Patientengut mit Hauterkrankungen untersucht wird, besteht die Gefahr, dass vermehrt unspezifisch-irritative Reaktionen im Epikutantest auftauchen können. Schließlich muss auch betont werden, dass im Epikutantest trotz Nickelallergie bis zu 20% falsch negative Ergebnisse auftauchen können (48). Es bleibt anzumerken, dass andererseits ein negativer Epikutantest das Bestehen einer Kontaktallergie nicht völlig ausschließt (56, 94).

Räsänen und Tuomi (71) erachten den LTT bei niedrigeren Nickelkonzentrationen dennoch als zuverlässigen, zusätzlichen diagnostischen Test zur Bestätigung einer Nickelallergie.

Zur Lymphozytenstimulation wurde Nickelsulfat in Endkonzentrationen zwischen 10^{-4} bis 10^{-6} M verwendet. Dies entspricht etwa üblichen, in der Literatur beschriebenen Konzentrationen. Niedrigere Konzentrationen als 10^{-5} M wurden teils als ineffektiv erachtet (73). Teils wurde über einen allgemein stimulierenden Effekt geringer Konzentrationen (10^{-8} - 10^{-6} mol/L) berichtet (9).

Bei Konzentrationen über 10^{-4} M wurden sowohl unspezifisch mitogene Effekte, als auch toxische Effekte des Nickels beschrieben (71, 73, 99). Teilweise wurde bereits bei 10^{-6} – 10^{-4} M Nickel ein inhibitorischer Effekt für sogenannte „höhere“ Konzentrationen gefunden (9).

Aus unspezifischen Reaktionen der Lymphozyten von Kontrollpersonen, sowie Lymphozyten aus Nabelschnurblut bei höheren NiSO_4 -Konzentrationen schlossen Al-Tawil, Marcusson, Möller (3) eher auf eine schwach mitogene Wirkung des Nickels.

Die eigenen Messungen zeigten, im Vergleich mit der Kontrollgruppe, für die Patientengruppen (A+B), eine deutliche, jedoch noch nicht signifikant erhöhte Zellproliferation bei 10^{-4} und 10^{-5} M NiSO_4 .

Die Ergebnisse gehen einher mit der Beobachtung von Res et al. (73), Nickelkonzentrationen kleiner 10^{-5} M zur Stimulation als eher ineffektiv zu betrachten, da sich für die 10^{-6} M Konzentrationen, im Gegensatz zu den anderen Ansätzen, keine auffälligen Messwerte mehr ergaben. Unspezifisch mitogene Effekte konnten nicht beobachtet werden. Bei der Kontrollgruppe C wirkten die höheren Nickelkonzentrationen (10^{-4} M und 10^{-5} M) eher schwach hemmend.

Insgesamt wären bei 10^{-4} M und 10^{-5} M NiSO_4 -Konzentrationen jeweils sechs Patienten der Gruppe A und vier Patienten der Gruppe B richtig als sensibilisiert erkannt worden. Bei 10^{-6} M NiSO_4 -Konzentrationen dagegen nur drei Patienten der Gruppe A und ein Patient der Gruppe B.

Ein falsch positives Ergebnis, das heißt eine unspezifisch erhöhte Zellproliferation ($SI \geq 2$) auf Nickelsulfat wurde lediglich bei einer Person der Kontrollgruppe gemessen, dies allerdings bei allen drei der verwendeten Konzentrationen.

Schlussfolgerung:

Zur Diagnose der Kontaktallergie wird standardmäßig der Epikutantest eingesetzt. Obwohl dieser Test bereits etwa hundert Jahren alt ist, konnte er durch viele In-Vitro-Methoden bisher nicht ersetzt werden (17). Es handelt sich hier sozusagen um einen Provokationstest an der Haut, über den die krankmachende Überempfindlichkeit („Allergie“) gezeigt wird. Aufgrund möglicher Nebenwirkungen und wegen des zeitlichen Aufwands der Epikutantestung, für den in der Regel drei Arztbesuche des Patienten nötig werden, speziell aber bei wegen Ekzem oder anderer Ursachen nicht testfähiger Patienten, sind Fortschritte der In-Vitro-Diagnostik jedoch wünschenswert (34). Analoges gilt für die Problematik der oralen Provokationstestung, die zudem unter stationären Bedingungen durchgeführt werden muss. Trotz aller Nachteile, wurde beim Epikutantest aber eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei wiederholten Untersuchungen gezeigt (17). Dies trifft auch bei der Nickelkontaktallergie zu (12).

Aus vielerlei Gründen ist es aber häufig ratsam, zweifelhafte Testergebnisse durch Wiederholung oder alternative Tests zu bestätigen (55). Ein standardisierter In-Vitro-Test kann wichtige Zusatzinformationen geben, vor allem in Fällen, bei denen der Epikutantest kontraindiziert, oder nicht eindeutig ist (76a).

Die eigenen Messergebnisse lassen sich derart interpretieren, dass mit dem LTT ein zwar nur mäßig sensitiver, jedoch relativ spezifischer In-Vitro-Test zur Diagnose einer Nickelsensibilisierung zur Verfügung steht. Dieser kann auch im Klinikalltag relativ leicht und sinnvoll eingesetzt werden. Bei gleicher Spezifität (90%) wurde für die höheren getesteten Nickelkonzentrationen ($10^{-4}/10^{-5}$) eine bessere Sensitivität (50%) ermittelt.

Die Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu Cederbrant et al. (25) die bei einer relativ hohen Sensitivität (82%) nur eine geringe Spezifität (17%) ermittelten. Dort wurden die Ergebnisse von 31 Patienten mit Symptomen einer

Metallallergie im Epikutantest, Lymphozytentransformationstest und einem weiteren In-Vitro-Test (MELISA) für Nickel, Gold und Palladium verglichen.

Da für den Test zirkulierende Lymphozyten aus peripherem Blut verwendet wurden, stellte sich auch die Frage, ob es Unterschiede zwischen solchen Patienten gibt, die hämatogen auslösbare allergische Kontaktreaktionen hatten (Gruppe A) und solchen mit nur lokaler Reaktion auf Nickel (Gruppe B). Die stärkste nickelabhängige Proliferation wurde in der Gruppe A gemessen, die auch auf orale Provokation reagiert hatte. Hier zeigte sich ein auffälliger jedoch noch nicht signifikanter Unterschied zwischen Gruppe A und C (Mann-Whitney-Test). Dieser ist beim Vergleich der Gruppen B mit C weniger ausgeprägt. Ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der beiden Patientengruppen (A/B) bestand nicht. Der Vergleich aller drei Gruppen miteinander (im Kruskal-Wallis-Test) war ebenfalls knapp oberhalb der Signifikanzgrenze. Somit scheinen die Lymphozyten von Patienten mit hämatogen allergischen Kontaktekzemen mit höheren Proliferationsraten auf in vitro Stimulation mit Nickel zu reagieren, auch wenn dies noch nicht signifikant getestet werden konnte.

Für die unterschiedliche Reaktionsfreudigkeit auf Nickel im LTT beziehungsweise Epikutantest lassen sich verschiedene Gründe diskutieren:

Bei Cederbrant et al. (25) wurde erwogen, ob unterschiedliche Ergebnisse im LTT beziehungsweise Epikutantest dadurch bedingt sein könnten, dass die Lymphozyten aus der Haut, beziehungsweise aus dem Blut ein unterschiedliches Funktionsmuster aufweisen.

Nickelspezifische T-Zellen sind möglicherweise nicht immer in der Zirkulation vorhanden sondern eher gewebeständig, beziehungsweise könnten quantitativ im Blut vor allem bei Gruppe A-Patienten in größerem Umfang vorhanden sein. Damit wären diese z. B. bei häufiger „hämatogener Boosterung“ auch eher im LTT erfassbar. Hier hatte eine vorab erfolgte orale Provokation zu einer Expansion Nickel-spezifischer T-Zellen in der Zirkulation geführt.

Eine höhere Stimulierbarkeit der T-Lymphozyten allergischer Personen könnte auch durch eine eingeschränkte Funktion oder einen Mangel an CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen bedingt sein, die in vitro die nickelspezifische Aktivierung von CD4⁺CD25⁻-T-Zellen verhindern konnten (23).

Die Mehrheit der regulatorischen T-Zellen, die bei der Immunantwort von Haptenen in der Haut beteiligt sind, exprimieren CLA (cutaneous lymphocyte-associated Ag). Aber auch ein Teil der regulatorischen T-Zellen aus dem Blut koexprimiert CLA, was auf eine mögliche Verbindung zur Immunmodulation in der Haut hinweist. Diese CLA⁺-T-regulatorischen Zellen scheinen bei der Unterdrückung der nickelspezifischen T-Zell-Antwort effektiver zu sein als CLA-negative (23). Somit besteht auch die Möglichkeit, dass nickelallergische Patienten, insbesondere solche mit hämatogenen allergischen Kontaktekzemen eine abweichende CLA-Expression aufweisen könnten.

Einige Fragen bleiben offen. In der Literatur erhältliche Daten lassen beim Vergleich die Frage nach den Ursachen für die häufig unterschiedlichen Ergebnisse anderer Autoren aufkommen und somit nach der tatsächlichen Aussagekraft des LTTs. Ein Datenvergleich ist aber erschwert, da es den In-Vitro-Tests bisher an Standardisierung zwischen den Laboren mangelt. Weder das zu verwendende Nickelsalz (Nickelsulfat, Nickelchlorid), noch die optimale Konzentration und Kulturdauer wurden bisher festgelegt. Zudem wird von manchen Arbeitsgruppen ein SI >2, von anderen ein SI >3 als erhöht angesehen. Eine weitere Standardisierung wäre daher wünschenswert (76a).

Weiteres Potenzial zur Verbesserung des LTTs könnte in der von manchen Autoren angesprochen Beeinflussbarkeit der Ergebnisse von der Menge an anwesenden Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) in der Kultur bestehen (99). Dabei wird davon ausgegangen, dass die Kapazität der APZ im peripheren Blut möglicherweise nicht ausreichend ist, um ruhende Memory-T-Zellen in vitro zu reaktivieren (28). Res et al. (73) fanden 1987, dass Lymphozyten von Nickelallergikern, die im LTT keine signifikante Reaktion zeigten, in Anwesenheit von Langerhansschen Zellen mit Proliferation reagierten. Falsch negative LTT-Ergebnisse könnten somit eventuell durch eine im Vergleich mit dendritischen Zellen schwächere Antigenpräsentation von Monozyten in der Blutprobe bedingt sein (34). Von einigen Autoren wird deshalb der Zusatz von IFN- α zur Zellkultur propagiert (42). Dies könnte in weiteren Studien geprüft werden. In den Artikeln von Brehler und Merk (14) wird zum Stellenwert des LTT kommentiert, dass vor dem breiten Einsatz in der Routinediagnostik noch Evaluationen an größeren Kollektiven erfolgen müssen.

8.4. Interleukin-4- und Interferon- γ -Konzentrationen

Die Messung von Interleukin-4 und Interferon- γ in den Kulturüberständen, der mit Nickelsulfat stimulierten Lymphozyten sollte Aufschluss geben, ob das vorhandene Zytokinmuster zugunsten einer bestimmten T-Zell-Subgruppe verändert ist. Dabei wurde Interferon- γ , stellvertretend für ein TH1-Zytokinmuster und Interleukin-4, als TH2-Zytokin bestimmt.

In Ergänzung zu der im LTT gemessenen Proliferationsantwort könnte ja das Zytokinmuster eventuell einen zusätzlichen Hinweis auf Nickelallergie geben. Dabei stellt sich die zentrale Frage, ob eine Nickelsensibilisierung mit messbaren Veränderungen der Zytokinsekretion von spezifischen T-Zellen assoziiert ist (10). Generell muss angemerkt werden, dass Sekretionsprodukte der wenigen spezifisch reagierenden Zellen einen Verdünnungseffekt im Zellkulturüberstand erfahren. So ist hier die Quantifizierung beeinflussbar. Andererseits wäre der ELISPOT-Array zur Darstellung Zytokin-sezernierender Zellen als quantitativer Ansatz ebenfalls Störfaktoren unterworfen (42).

Einige Studien (44, 85, 87) haben gezeigt, dass die TH1- Antwort dominiert (10). Bei Untersuchungen von Cher et al. (26) und Fong et al. (36) ließ sich tierexperimentell in vivo durch Injektion von TH1-Zellklonen eine antigenspezifische Entzündungsreaktion auslösen. Morton et al. (57) konnten in Hautbiopsien 72h nach Allergenkontakt eine erhöhte IFN- γ -Expression messen. Warner und Lawrence (98) sprachen sich dafür aus, dass IFN- γ bei der Induktion der Lymphozytenproliferation eine Rolle spielt, da sie durch anti-IFN- γ -Antikörper eine die durch Nickel induzierte Lymphozytenproliferation hemmen konnten. Kapsenberg et al. (44) fanden, dass die T-Lymphozytenklone vor allem IFN- γ , IL-2, TNF- α und GM-CSF produzieren, jedoch kaum IL-4 und IL-5 und schloss damit ebenfalls auf ein TH1- ähnliches Zytokinprofil.

Andere Untersuchungen zeigten allerdings das Gegenteil, das heißt, dass nickelspezifische T-Zell-Klone eher zur TH0-, oder TH2-Untergruppe gehören: Kartunen et al. (45) konnten in Zellkulturen aus peripheren mononukleären Blutzellen von nickelsensibilisierten Patienten keine messbare IFN- γ -Sekretion nachweisen. Bei Versuchsansätzen von Silvennoinen-Kassinen et al. (85)

sezernierten die Hälfte der untersuchten T-Zellklone IL-4. Borg et al. (10) untersuchten ebenfalls die Zytokinantwort von peripheren Lymphozyten nach Stimulation in den Kulturüberständen und fanden eine signifikant höhere IL-4- und IL-5-Produktion bei Nickelallergikern. IFN- γ -Werte waren nicht erhöht. T-Zellklone aus Ekzemarealen eines Patienten reagierten bei den Versuchen von Probst et al. (68) auf Nickel mit der Produktion hoher IL-4- und IL-5-Level, jedoch nur geringer Mengen IFN- γ .

So folgerten etliche Autoren, dass sowohl TH1- als auch TH2-Zytokinmuster an der Immunpathogenese der Kontaktallergie beteiligt sind. Szepietowski et al. (89) konnten eine signifikante Zunahme der mRNA-Expression für IFN- γ , IL-2 und IL-4 nach Provokation bei Nickelallergikern messen. Allerdings bestanden beachtliche individuelle Bandbreiten in der Zytokinproduktion vor allem bei IL-2 und IFN- γ .

Falsafi-Amin et al. (35), Jakobson et al. (42), Palirand et al. (64), Riccardi et al. (74), Summer et al. (88) und Thomas et al. (90) konnten ebenfalls sowohl eine TH1-, als auch TH2-Zytokinproduktion von nickelstimulierten Lymphozyten nachweisen. Teilweise bestand dabei jedoch eine Dominanz zugunsten einer der beiden TH-Untergruppen.

Ferner wurde herausgefunden, dass TH1-Zytokinprofile vorzugsweise in Klonen aus peripherem Blut vorherrschen, während TH2- oder TH0-Zytokinprofile bei Zellklonen, die aus der Haut gewonnen wurden, vorherrschen sollen.

Diese Ergebnisse würden auf eine Modulation der Zytokinmuster (von TH1 zu TH2) hinweisen, die von T-Lymphozyten nach ihrer Migration aus dem peripheren Blut in die Haut produziert werden (39,99). Auf diese Dichotomie hatte beispielsweise die Arbeitsgruppe von Werfel (99) hingewiesen.

Kitagaki et al. (46) haben in kontaktallergischen Ekzemen einen Wechsel von TH1- zu TH2-Antwortmuster bei Chronifizierung gezeigt.

Im Gegensatz dazu fanden Wittmann et al. (100), in T-Lymphozyten von akuten kontaktallergischen Läsionen, eine Expression von IL-4-mRNA (TH2-Hinweis), die die IFN- γ -Expression überstieg und eine überwiegende Expression von IFN-

γ -mRNA (TH1-Hinweis) in chronischen Läsionen der allergischen Kontaktdermatitis.

Die eigenen Ergebnisse legen ebenfalls eine Beteiligung beider Zytokine beziehungsweise beider Zytokinmuster bei der Nickelallergie nahe. Dabei erscheint eine Dominanz des TH2-Zytokins IL-4 möglich, zumindest bei Beobachtung der Kurzzeitkulturen.

Zum einen wurde nach Stimulation mit Nickelsulfat eine antigenspezifische, wenn auch noch nicht signifikante, Erhöhung der IL-4-Konzentrationen bei den Nickelallergikern gefunden. Zum anderen war die IFN- γ -Produktion nach Nickelstimulation, die in der Kontrollgruppe unterhalb der Nachweisgrenze lag, bei den Nickelallergikern zumindest teilweise erhöht.

Das Ausmaß der IL-4-Produktion in den einzelnen Patientengruppen, die in der Gruppe A höher lag als bei Patienten der Gruppe B, sowie die Tatsache, dass eine IFN- γ -Produktion nach Nickelstimulation ausschließlich bei Patienten der Gruppe A nachgewiesen wurde, lässt vermuten, dass Patienten mit Nickelallergie, die auf orale (systemische) Nickel-Provokation mit Ekzemschüben reagieren auch eine stärkere beziehungsweise abweichende In-Vitro-Reaktionen zeigen.

Letztlich bleibt die Rolle der haptenspezifischen TH1/TH2-Zell-Subgruppen, in der Pathogenese der allergischen Kontaktdermatitis weiterhin eher unklar, zumal von unterschiedlichen Untersuchern über oft widersprüchliche Zytokinmuster berichtet wurde (19). Dass initiale erhöhte IL-4-Produktion durchaus auch ein TH1-Muster fördern kann berichtete kürzlich die Arbeitsgruppe von Biedermann. Unter IL-4 und GM-CSF-Exposition aus Monozyten generierte dendritische Zellen (mDC's) zeigten unterschiedliches Verhalten, je nachdem ob niedrige oder hohe IL-4-Spiegel eingesetzt waren. Nur unter hoher IL-4-Exposition generierte mDC's waren in der Lage in der anschließenden Kokultur mit CD4+T-Zellen unter hoher IL-12-Freisetzung eine IFN- γ -Produktion zu induzieren (38).

Zum Zeitpunkt der Durchführung unserer Experimente standen Immunreagentien zur Beurteilung der Rolle von regulatorischen T-Zellen noch nicht zur Verfügung. So bleibt dieser Aspekt Folgearbeiten vorbehalten.

In Bezug auf den Einsatz bei einer In-Vitro-Diagnostik bleibt auch zu überlegen, dass das komplexe Zusammenspiel verschiedener Mediatoren in vivo vermutlich nicht genau abgebildet werden kann. Der Epikutantest umfasst als In-Vivo-Provokationstest durch die Produktion einer Ekzemreaktion die klinische Relevanz des Kontaktallergens. Dies kann durch die Analyse der Zytokinproduktion nicht ersetzt werden (76a). Die Messung von Zytokinen als alleiniger Indikator für eine Nickelallergie erscheint derzeit als In-Vitro-Test jedenfalls eher ungeeignet und stellt eher eine Zusatzinformation dar (14).

8.5. Zigarettenkonsum

Bei Betrachtung der Nickelallergie kann Zigarettenkonsum in zweierlei Hinsicht interessieren. Zum einen enthalten Tabakpflanzen Nickel, das aus dem Boden absorbiert wird. Es wurde diskutiert, dass der inhalierte Rauch aus Zigaretten auf diese Weise eine zusätzliche Quelle der Nিকেlexposition darstellen könnte (91). Zum anderen beeinflusst das Rauchen eine Vielzahl immunologischer Faktoren (52).

Im Hinblick auf die erhobenen Daten fiel auf, dass die Raucher im Gegensatz zu den Nichtrauchern nach Nickelstimulation in vitro erhöhte IL-4-Konzentrationen aufwiesen. Der Vergleich mit Lymphozytenproliferation beziehungsweise IFN- γ -Produktion zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Dieses Ergebnis wirft eine Reihe zu diskutierender Fragen auf:

Könnten die T-Zellen durch den nickelhaltigen Tabakrauch eventuell bereits in vivo stimuliert sein? Dies hätte sich dann allerdings auch auf die Lymphozytenproliferation und eventuell IFN- γ -Produktion auswirken sollen. Oder beeinflusst das Rauchen generell immunologische Vorgänge wie die Zytokinproduktion beziehungsweise Messergebnisse?

Es besteht des weiteren aber auch die Möglichkeit, dass Rauchen die Möglichkeit beeinflusst, eine Allergie und insbesondere eine Sensibilisierung gegenüber Nickel zu entwickeln und diese zur erhöhten IL-4-Produktion führt. So fand Linneberg et al. (52) in einer Studie eine signifikante Assoziation von

Kontaktallergie, Nickelallergie und Nickelkontaktdermatitis mit Zigarettenkonsum. Diese Assoziation zeigte, unabhängig von Geschlecht, Alter und Nিকেlexposition, auch eine signifikante Dosisabhängigkeit. Sie schlossen daraus, dass Rauchen das Risiko einer Kontaktallergie erhöht.

Beim näheren Vergleich fiel ferner auf, dass die Mehrzahl der sechzehn Raucher aus der Gruppe A+B stammten. Aus der Kontrollgruppe gaben nur drei Testpersonen an zu rauchen. Allerdings sollte diese Tendenz aufgrund der begrenzten Fallzahl nicht überbewertet werden.

8.6. HLA-Analyse

Bei der Entstehung einer Nickelsensibilisierung werden sowohl genetische, als auch umweltbedingte Faktoren diskutiert (63). Die Beteiligung umweltbedingter Faktoren wird allgemein nicht bestritten, etliche Untersucher unterstützen aber auch die Hypothese, dass genetische Faktoren bei der Sensibilisierung gegenüber Allergenen beteiligt sind.

Der genetische Einfluss bei der Kontaktallergie wurde teilweise in Zusammenhang mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex gesehen (31). Die nickelspezifische T-Zellantwort wird durch MHC beschränkt (86). Sie ist HLA-DR und/oder -DQ abhängig (31). Bei Stimulation mit Nickelsulfat konnte die T-Zellantwort durch Vorinkubation mit Anti-DR-Antikörpern verhindert werden (11). Es stellte sich somit die Frage, ob bestimmte HLA-Allele die Tendenz zur Sensibilisierung gegenüber Nickel beeinflussen können.

In mehreren Studien wurden bereits mögliche HLA-Assoziationen mit Kontaktallergie untersucht. Dabei findet man in der Literatur sehr widersprüchliche Angaben zu eventuellen Assoziationen der Nickelallergie mit bestimmten HLA-Merkmalen:

Kapoor-Pillarsetti et al. (43) fanden ein gehäuftes Auftreten von HLA-B21 bei 29 Nickelallergikern. Mozzanica et al. (58) berichten über signifikant erhöhtes HLA-DRw6-Antigen in der Patientengruppe. Die Häufigkeit von HLA-B35 war bei Walton et al. (97) unter Nickelallergikern signifikant. Olerup und Emtestam (63) zeigten eine Assoziation mit einem Taq I HLA-DQA-Allel, das auf dem DR-

und DQ-Locus gefunden werden kann. In ähnlichen Studien gab es diese Korrelation jedoch nicht (62).

Viele weitere Arbeiten konnten ebenfalls keine signifikante Assoziation zu einem HLA-Antigen feststellen. HLA B7, DR4, DR7 und Bw22 wurden in einigen Arbeiten zwar erhöht gefunden, es konnte dabei aber keine Signifikanz gezeigt werden (11, 51, 84). Ikäheimo et al. (40) untersuchten HLA-DQA1 und -DQB1 Loci und konnten ebenfalls keine Assoziation zwischen HLA und Nickelallergie finden.

Emtestam et al. (31) hatten erst eine Assoziation von Nickelallergikern mit einem HLA-DQA-Allel beschrieben, fanden aber in einer weiteren Studie keine entsprechenden Ergebnisse mehr. Sie schlossen, dass es unwahrscheinlich ist, dass die Tendenz eine Metallallergie zu entwickeln von Allelen der HLA-Klasse-II abhängig ist.

Önder et al. (62) erhofften, wie andere Untersucher, durch Einsatz neuerer, genomischer Methoden eine bessere Zuverlässigkeit der Ergebnisse als bei den Untersuchungen mit serologischen Tests. Er zeigte eine statistisch signifikante Häufung von HLA-DQA1-0601 bei Nickelallergikern, dagegen kam HLA DR15 signifikant seltener vor. Es wurde jedoch geschlossen, dass diese Daten aufgrund der unterschiedlichen vorangehenden Berichte keine wirklich signifikanten Assoziationen zeigen.

Im eigenen Patientengut, das heißt bei den zwanzig Patienten mit dem Merkmal Nickelallergie (Gruppe A + B), war eine Häufung von HLA B14 mit einer Frequenz von 21% im Vergleich zu 4% in der Kontrollgruppe auffällig. In Anbetracht der vielen unterschiedlichen Ergebnisse anderer Untersucher und der Tatsache, dass die eigene Auswertung keine Signifikanz ergab, sollten hieraus keine Schlüsse über eventuelle Assoziationen der Nickelallergie mit HLA-Merkmalen gezogen werden. Um diesbezügliche Aussagen zu machen, würden sicherlich mehr Studien mit größeren Gruppen benötigt.

9. Zusammenfassung

Kontaktallergien sind in unserer Gesellschaft häufig. Nickel ist einer der häufigsten Auslöser der Kontaktallergie. Beim allergischen Kontaktekzem handelt es sich um eine T-Zell-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion (Typ IV).

Diese Arbeit befasst sich mit der nickelspezifischen In-Vitro-Reaktivität peripherer Blutlymphozyten bei Patienten mit Kontaktallergie. Untersucht wurden die In-Vitro-Lymphozytenproliferation nach Stimulation mit dem Pan-T-Zell-Mitogen Phytohämagglutinin (PHA), mit Tetanustoxoid und mit verschiedenen Konzentrationen an Nickelsulfat. In Parallelkulturen wurde die IL-4- (TH2-Muster) und IFN- γ -Sekretion (TH1-Muster), als Hinweis auf ein vorherrschendes Funktionsmuster bestimmt. Verglichen wurde die Reaktivität im Lymphozytenproliferationstest von 10 Patienten mit Nickelkontaktallergie und Ekzemprovokation durch orale Nickelgabe (Gruppe A), von 10 Patienten mit Nickelkontaktallergie aber ohne orale Ekzempvovozierbarkeit (Gruppe B) und 10 Patienten ohne Nickelkontaktallergie (Gruppe C). IL-4- und IFN- γ -Spiegel in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt. Damit sollte der Stellenwert des Lymphozytentransformationstest als In-Vitro-Diagnostikmethode und mögliche Unterschiede zwischen den drei Patientengruppen beurteilt werden.

Zusätzlich wurde von den nickelallergischen Patienten eine HLA-Analyse durchgeführt, die Hinweise auf eine mögliche Assoziation der Erkrankung mit einem HLA-Merkmal geben sollte.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte bei den Nickelallergikern eine erhöhte Lymphozytenproliferation auch unter In-Vitro-Bedingungen gemessen werden. 6 Patienten der Gruppe A, 5 Patienten der Gruppe B und ein Patient der Kontrollgruppe reagierten auf die Stimulation mit Nickelsulfat positiv. Der Unterschied zwischen nickelallergischen Patienten und der Kontrollgruppe C war knapp oberhalb der Signifikanzgrenze. Auffällig war, dass die stärkste nickelabhängige Proliferation bei Patienten auftrat, die auf eine orale Provokation mit Nickel reagiert hatten. Dies ließe sich entweder als erhöhte Zahl zirkulierender nickelspezifischer Zellen deuten oder als vorausgegangener

„Booster“-Effekt. Mit dem Lymphozytenproliferationstest steht ein In-Vitro-Test zur Verfügung, der zwar nicht deckungsgleich zum Epikutantest ist, der aber vor allem in Fällen bei denen der Epikutantest kontraindiziert oder nicht durchführbar ist eine Zusatzinformation zur Nickelsensibilisierung geben kann.

In Analogie zu zwischenzeitlich publizierten Studien fanden wir sowohl IL-4- als auch IFN- γ -Produktion in unseren Zellkulturen. Dabei herrschte eine auch „spontane“ IL-4-Produktion vor. IFN- γ war durch Nickelzugabe in vitro speziell bei Patienten der Gruppe A induzierbar. Hier ist einerseits der Verdünnungseffekt im Zellkulturüberstand für ELISA-Messungen zu diskutieren und andererseits das auch bei vorherrschender IL-4-Produktion mögliche anschließende Bahnen einer TH1-Antwort sowie möglicherweise mehr zirkulierende nickelspezifische Zellen in Gruppe A.

Da sehr unterschiedliche Versuchsbedingungen und auch Ergebnisse zum Thema In-Vitro-Charakteristika bei Nickelallergie vorliegen, können unsere Ergebnisse nicht deckungsgleich mit denen anderer Arbeitsgruppen gewertet werden. Auch in anderen Studien zeigt die Zytokinmessung nicht immer ein eindeutiges Vorherrschen des oft postulierten TH1-Musters.

Obwohl bei der Nickelkontaktallergie eine Beteiligung genetischer Faktoren, sowie eine Assoziation mit HLA-Merkmalen des öfteren diskutiert wurde, konnten wir dies anhand unserer erhobenen Daten – mit der Einschränkung einer kleinen Fallzahl – nicht erkennen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass insbesondere in der Gruppe A eine erhöhte In-Vitro-Lymphozytenproliferation auf Nickel feststellbar war.

Ferner war auffällig, dass die Nickel-Allergieguppen A und B deutlich mehr Raucher aufwiesen.

Es fand sich eine konstitutive IL-4-Produktion in vitro, IFN- γ war nur teilweise nach Nickelstimulation induzierbar und die HLA-Analyse ergab keine signifikante Assoziation eines HLA-Merkmals mit der Nickelallergie.

10. Anhang

Patient	LW	PHA	TT	10 ⁻⁴ M NiSO ₄	10 ⁻⁵ M NiSO ₄	10 ⁻⁶ M NiSO ₄
A1	3704	7,45	6,16	1,28	0,82	0,76
A2	322	56,84	117,78	5,43	20,80	1,77
A3	1283	14,58	11,95	2,44	3,44	1,29
A4	2265	7,09	6,57	9,96	11,97	7,76
A5	679	40,40	36,73	0,15	0,37	0,72
A6	595	33,84	11,22	0,20	0,59	1,24
A7	1314	7,49	9,16	5,16	5,95	2,93
A8	3079	8,59	10,10	1,96	1,05	1,10
A9	179	78,02	59,15	6,30	4,65	1,28
A10	1132	14,65	23,55	21,86	9,71	3,6
B1	1357	21,30	0,46	0,1	0,44	0,83
B2	1489	8,32	12,36	7,56	2,64	0,93
B3	2931	4,01	3,66	1,32	0,92	0,46
B4	586	21,92	55,01	7,39	26,93	3,43
B5	428	33,46	46,71	7,07	0,60	1
B6	551	33,28	14,96	0,37	0,71	1,45
B7	495	49,92	72,08	2,61	8,24	1,48
B8	971	28,07	2,62	0,11	0,54	0,86
B9	169	135,83	279,42	1,82	1,59	1,44
B10	498	13,43	15,70	1,37	6,27	1,03
C1	242	102,57	1,89	0,28	0,67	0,98
C2	249	60,64	61,90	1,59	1,84	1,63
C3	4178	4,69	5,40	0,35	0,41	0,61
C4	254	4,75	2,97	0,31	0,43	0,57
C5	413	73,36	16,55	0,30	0,58	0,90
C6	190	71,69	13,75	0,77	0,72	0,59
C7	144	136,66	128,41	0,78	1,46	1,33
C8	447	22,98	14,66	0,33	0,45	0,82
C9	1570	4,44	12,11	4,02	2,37	2,99
C10	3403	4,78	10,39	0,68	0,42	0,77

Tabelle 4: Ergebnisse des Lymphozytenstimulationstest für die jeweiligen Stimulationsansätze – die Werte für PHA, TT und die verschiedenen Nickelkonzentrationen wurden als Stimulationsindices dargestellt. Abkürzungen: LW= Leerwert (Kulturmedium), PHA= Phytohämagglutinin, TT= Tetanustoxoid, M= Mol/Liter, NiSO₄= Nickelsulfat

Patient	LW	PHA	TT	NiSO ₄ 10 ⁻⁴ M	NiSO ₄ 10 ⁻⁵ M	NiSO ₄ 10 ⁻⁶ M
A 1	12,4	27,0	16,9	9,4	8,6	10,4
A 2	0,75	11,3	8,2	8,6	4,4	0,75
A 3	1,9	8,8	3,2	5,5	2,3	4,3
A 4	4,8	8,5	15,3	38,3	7,1	7,1
A 5	4,3	43,4	34,3	4,8	3,1	3,4
A 6	1,0	31,0	36,0	0,0	2,5	2,0
A 7	4,5	8,0	26,7	9,3	28,8	5,6
A 8	14,4	32,0	20,6	20,6	14,8	13,2
A 9	20,6	42,0	53,0	46,6	40,0	26,7
A10	20,6	31,3	14,0	55,0	26,7	14,8
B 1	1,9	13,8	3,2	2,4	3,7	3,5
B 2	10,0	22,0	15,0	35,7	22,7	6,3
B 3	7,3	48,4	19,2	17,6	7,3	3,6
B 4	34,2	34,0	51,0	58,3	46,6	32,9
B 5	8,4	8,4	53,2	4,2	6,4	4,2
B 6	0,9	16,0	9,4	2,0	3,1	1,4
B 7	0,75	15,9	43,4	15,8	7,6	0,75
B 8	0,75	17,0	2,7	0,75	0,75	0,75
B 9	1,8	17,0	101,0	1,6	2,7	0,75
B10	0,75	7,2	2,8	2,4	3,2	0,75
C 1	7,4	24,0	0,75	7,8	12,6	7,4
C 2	3,2	27,8	10,5	3,5	2,5	2,9
C 3	0,75	8,2	3,6	0,75	1,9	1,1
C 4	2,2	12,0	42,3	2,4	2,9	2,7
C 5	3,3	7,6	75,0	3,7	2,2	1,1
C 6	10,8	20,6	8,8	13,7	11,3	9,0
C 7	5,9	19,6	315,0	6,7	1,9	7,4
C 8	1,5	7,8	111,0	2,2	1,5	0,5
C 9	5,6	6,8	74,0	3,5	3,2	4,2
C10	0,6	25,0	151,0	2,5	3,1	1,7

Tabelle 7: Ergebnisse der IL-4-Messungen (in pg/ml) in den Kulturüberständen für die jeweiligen Stimulationsansätze. Abkürzungen: LW= Leerwert (Kulturmedium), PHA= Phytohämagglutinin, TT= Tetanustoxoid, M= Mol/Liter, NiSO₄= Nickelsulfat

Patient	LW	PHA	TT	NiSO ₄ 10 ⁻⁴ M	NiSO ₄ 10 ⁻⁵ M	NiSO ₄ 10 ⁻⁶ M
A 1	2,5	582	406	2,5	2,5	2,5
A 2	2,5	572	15	2,5	2,5	2,5
A 3	2,5	554	430	2,5	2,5	2,5
A 4	2,5	566	480	389	425	279
A 5	2,5	399	2,5	2,5	2,5	2,5
A 6	2,5	444	9	2,5	2,5	2,5
A 7	2,5	496	500	56	247	2,5
A 8	2,5	443	409	2,5	2,5	2,5
A 9	2,5	520	217	2,5	2,5	2,5
A10	2,5	523	353	325	2,5	2,5
B 1	2,5	581	2,5	2,5	2,5	2,5
B 2	2,5	430	389	2,5	2,5	2,5
B 3	2,5	480	123	2,5	2,5	2,5
B 4	2,5	565	415	2,5	2,5	2,5
B 5	2,5	444	405	2,5	2,5	2,5
B 6	2,5	447	2,5	2,5	2,5	2,5
B 7	2,5	472	471	2,5	2,5	2,5
B 8	2,5	437	2,5	2,5	2,5	2,5
B 9	2,5	548	382	2,5	2,5	2,5
B10	2,5	400	200	2,5	2,5	2,5
C 1	2,5	572	2,5	2,5	2,5	2,5
C 2	2,5	450	396	2,5	2,5	2,5
C 3	2,5	462	423	2,5	2,5	2,5
C 4	2,5	416	130	2,5	2,5	2,5
C 5	2,5	426	2,5	2,5	2,5	2,5
C 6	2,5	441	2,5	2,5	2,5	2,5
C 7	2,5	461	457	2,5	2,5	2,5
C 8	2,5	422	25	2,5	2,5	2,5
C 9	2,5	488	487	2,5	2,5	2,5
C10	2,5	580	393	2,5	2,5	2,5

Tabelle 8: Ergebnisse der IFN- γ -Messung (in pg/ml) in den Kulturüberständen für die jeweiligen Stimulationsansätze. Abkürzungen: LW= Leerwert (Kulturmedium), PHA= Phytohämagglutinin, TT= Tetanustoxoid, M= Mol/Liter, NiSO₄= Nickelsulfat

11. Literaturverzeichnis

1. ABERER, W., KRÄNKE, B.:The new Euro releases nickel and elicits contact eczema. *Br J Dermatol* 2002; 146:155-174
2. AL-TAWIL, N. G., BERGGREN, G., EMTESTAM, L., FRANSSON, J., JERNSELIUS, R., MARCUSSON, J. A.: Correlation between quantitative in vivo and in vitro responses in nickel-allergic patients. *Acta Derm Venereol* 1985; 65: 385-389
3. AL-TAWIL, N. G., MARCUSSON, J. A., MÖLLER, E.: Lymphocyte transformation test in patients with nickel sensitivity: an aid to diagnosis. *Acta Derm Venereol* 1981; 61: 511-515
4. ARTIK, S., HAARHUIS, K., WU, X., BEGEROW, J., GLEICHMANN, E.: Tolerance to Nickel: oral nickel administration induces a high frequency of anergic T cells with persistent suppressor activity. *J Immunol* 2001; 167: 6794-6803
5. BAENKLER, HW: Immunopathien der Haut. *Medizinische Immunologie*. Ecomed Verlag 12/96; 52-61
6. BARCELOUX, D., G. : Nickel. *Clinical Toxicology* 1999; 37(2): 239-258
7. BARKER, J. N. W. N., ALLEN, M. H., MACDONALD, D. M.: Alterations induced in normal human skin by in vivo interferon-gamma. *British J of Dermatology* 1990; 122: 451-458
8. BIOTREND: Cytokine ELISA for human Interleukin-4. *Begleitheft des Testkits* 1997
9. BORELLA, P., MANNI, S., GIARDINO, A.: Cadmium, nickel, chromium, and lead accumulate in human lymphocytes and interfere with PHA-induced proliferation. *J Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 1990; 4: 87-95
10. BORG, L., CHRISTENSEN, J. M., KRISTIANSEN, J., NIELSEN, N. H., MENNÉ, T., POULSEN, L. K.: Nickel-induced cytokine production from mononuclear cells in nickel-sensitive individuals and controls. *Arch Dermatol Res* 2000; 292: 285-291

11. BRAATHEN, L. R.: Langerhans cells, HLA, and nickelspecific T cell responses. *Acta Derm Venereol* 1988; 68, suppl 135: 50-53
12. BRASCH, J., HENSELER, T., ABERER, W., FUCHS, T., HOECK, U., KREILGARD, B.: Patch testing of nickel sulfate and potassium dichromate with a standardized ready-to-use test system gives highly reproducible results: a double-blind multizentric study. *Acta Derm Venereol* 2001; 81(2): 122-124
13. BRAUN-FALCO, O., PLEWIG, G., WOLFF, H. H.: Dermatologie und Venerologie. *Springer Verlag* 2005
14. BREHLER, R., MERK, H.: In-vitro-Tests zum Nachweis von Kontaktallergien. *Hautarzt* 2005; 56: 1141-1143
15. BRESSER, H. : Orale Nickelprovokation und nickelarme Diät. *Hautarzt* 1992; 43: 610-615
16. BROADFIELD, E., MCKEEVER, TM., SCRIVENER, S., VENN, A., LEWIS, SA., BRITTON J.: Increase in the prevalence of allergen skin sensitization in successive birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109(6): 969-974
17. BRUZE, M., ISAKSON, M., EDMAN, B., BJÖRKNER, B., FREGERT, S., MÖLLER, H.: A study on expert reading of patch test reactions: inter-individual accordance. *Contact Dermatitis* 1995; 32: 331-337
18. BRYLD, L. E., HINDSBERGER, C., KYVIK, K. O., AGNER, T., MENNÉ, T.: Genetic Factors in Nickel Allergy Evaluated in a Population-Based Female Twin Sample. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 1025-1029
19. BÜDINGER, L., HERTL, M.: Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. *Allergy* 2000; 55: 108-115
20. BÜHL, A., ZÖFEL, P.: SPSS 11 – Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. *Pearson Studium* 2002; 288
21. BURMESTER, G.-R., PEZZUTTO, A., ULRICHS, T.: Taschenatlas der Immunologie. *Thieme* 2007:

22. BURROWS, D.: Mischievous metals – chromate, cobalt, nickel and mercury. *Clin Exp Dermatol* 1988; 14: 266-272
23. CAVANI, A., NASORRI, F., OTTAVIANI, C., SEBASTIANI, S., DE PITÀ, O., GIROLOMONI, G.: Human CD25⁺ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy nonallergic individuals. *J Immunol*. 2003; 171: 5760-5768
24. CAVANI, A.: Breaking tolerance to nickel. *Toxicology* 2005; 209: 119-121
25. CEDERBRANT, K., HULTMAN, P., MARCUSSESON, J. A., TIBBLING, L.: In vitro lymphocyte proliferation as compared to patch test using gold, palladium and nickel. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 112: 212-217
26. CHER, D. J., MOSMANN, T. R.: Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol* 1987; 138: 3688-3694
27. CHRISTENSEN, OB., MOLLER, H.: External and internal exposure to the antigen in the hand eczema of nickel allergy. *Contact Dermatitis* 1975; 1(3):136-141
28. DE GRUIJL, T. D., MOORE, J. J., DE VRIES, E., VON BLOMBERG-VAN DER FLIER, B. M. E., FONK, J.C.M., SCHEPER, R. J.: Augmentation of antigen-specific lymphoproliferative responses in vitro by biological response modifiers. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 535-540
29. DIACLONE: IFN- γ ELISA Kit. *Gebrauchsanweisung* 1997;
30. EHRLICH, A., KUCENIC, M., BELSITO, DV: Role of body piercing in the induction of metal allergies. *Am J Contact Dermat.* 2001; 12(3): 151-155
31. EMTESTAM, L., ZETTERQUIST, H., OLERUP, O.: HLA-DR, -DQ and -DP alleles in nickel, chromium and/or cobalt-sensitive individuals: genomic analysis based on restriction fragment length polymorphisms. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 271-274
32. ENK, A. H.: Pathophysiologie der allergischen Kontaktdermatitis. *Allergo J* 2003; 12: 501-507

33. ESEVERRI, JL., COZZO, M., MARIN, A., BOTEY, J.: Epidemiology and chronology of allergic diseases and their risk factors. *Allergol Immunopathol* 1998; 26 (39): 90-97
34. EVERNESS, K.M., GAWKRODGER, D. J., BOTHAM, P. A., HUNTER, J. A. A.: The discrimination between nickel-sensitive and non-nickel-sensitive subjects by an in vitro lymphocyte transformation test. *Br J Dermatol* 1990; 122: 293-298
35. FALSAFI-AMIN, H., LUNDEBERG, L., BAKHIET, M., NORDLIND, K.: Early DNA synthesis and cytokine expression in the nickel activation of peripheral blood mononuclear cells in nickel-allergic subjects. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 170-176
36. FONG, T. A. T., MOSMAN, T. R.: The role of IFN- γ in delayed-type hypersensitivity mediated by Th1 clones. *J Immunol* 1989 ; 143 : 2887-2893
37. GAWKRODGER, D. J., VESTEY, J. P., WONG, W-K., BUXTON, P. K.: Contact clinic survey of nickel-sensitive subjects. *Contact Dermatitis* 1986: 14: 165-169
38. GUENOVA, E, VOLZ, T., KAESLER, S., RÖCKEN, M., BIEDERMANN, T.: The Th2 to Th1 switch in the pathogenesis of atopic dermatitis is orchestrated by IL-4. *Allergo-J* 2007; 50
39. HENTSCHEL, M., KAPP, A., RENZ, H., WERFEL, T.: Interleukin-4 production and selection of TCR-V(beta) elements by nickel-specific T-cells in allergic contact dermatitis (abstract). *Arch Dermatol Res* 1996; 288: 331
40. IKÄHEIMO, I., TIILIKAINEN, A., KARVONEN, J., SILVENNOINEN-KASSINEN, S.: HLA-DQA1 and -DQB1 loci in nickel allergy patients. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 100: 248-250
41. ISSEKUTZ, T. B., STOLTZ, J. M., V. D. MEIDE, P.: Lymphocyte recruitment in delayed-type hypersensitivity. The role of IFN- γ . *J Immunol* 1988 ; 140 : 2989-2993
42. JAKOBSON, E., MASJEDI, K., AHLBORG, K., LUNDEBERG, L., KARLBERG, A-T., SCHEYNIUS, A.: Cytokine production in nickel-sensitized individuals analysed with enzyme-linked immunospot assay: possible implication for diagnosis. *Br J Dermatol.* 2002; 147 (3): 442-449

43. KAPOOR-PILARISSETTI, A., MOWBRAY, J. F., BROSTOFF, J., CRONIN, E. A.: HLA dependence of sensitivity to nickel and chromium. *Tissue Antigens* 1981; 17: 261-264
44. KAPSENBERG, M.L., WIERENGA, E. A., STIEKEMA, F. E., TIGGELMAN, A. M., BOS, J. D.: Th1 lymphokine production profiles of nickel-specific CD4⁺ T-lymphocyte clones from nickel contact allergic and non-allergic individuals. *J Invest Dermatol* 1992; 98: 59-63
45. KARTTUNNEN, R., SILVENNOINEN-KASSINEN, S., JUUTINEN, K., ANDERSSON, G., EKRE, H-P. T., KARVONEN, J.: Nickel antigen induces IL-2 secretion and IL-2 receptor expression mainly on CD4⁺ T cells, but no measurable gamma interferon secretion in peripheral blood mononuclear cell cultures in delayed type hypersensitivity to nickel. *Clin exp Immunol* 1988; 74: 387-391.
46. KITAGAKI, H., ONO, N., HAYAKAWA, K., KITAZAWA, T., WATANABE, K., SHIOHARA, T.: Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile. *J Immunol* 1997; 159: 2484-2491
47. KLASCHKA, F., RING, J.: Systemically induced (hematogenous) contact eczema. *Seminars in Dermatol* 1990; 9(3): 210-215
48. KLEINHANS, D.: Interpretation negativer Ergebnisse beim Epikutantest. *Allergo J* 2006; 15: 582-583
49. KREUTZIG, T.: Biochemie. *Jungjohann Verlagsgesellschaft* 1993: 267-271 und 284-285
50. LAUTER, H.: Nickelallergie und Nickelkontaktekzeme. *Allergologie* 1994; 17: 470-476
51. LIDEN, S., BECKMAN, L., CEDERGREN, B., GROTH, O., GÖRANSSON, K., WÄHLBY, L.: Lack of association between allergic contact dermatitis and HLA antigens of the A and B series. *Acta Derm Venereol* 1981; 61: 155-157
52. LINNEBERG, A., NIELSEN, NH., MENNE, T., MADSEN, F., JORGENSEN, T.: Smoking might be a risk factor for contact allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111 (5): 980-984

53. MENNÉ, T., HOLM, N. V.: Nickel allergy in a female twin population. *Int J Dermatol* 1983; 22: 22-28
54. MITCHINSON, N. A.: Specialization, tolerance, memory, competition, latency and strife among T cells. *Annu Rev Immunol* 1992 ; 10 : 1-12
55. MÖLLER, H.: Nickel dermatitis: problems solved and unsolved. *Contact Dermatitis* 1990; 23: 217-220
56. MÖLLER, H., SVENSSON, Å.: Metal sensitivity: positive history but negative patch test indicates atopy. *Contact Dermatitis* 1986; 14: 57-60
57. MORTON, C. A., CAMPBELL, I., MACKIE, R. M.: Gamma-interferon in evolving allergic contact dermatitis reactions. *Br J Dermatol* 1996; 135: 853-854
58. MOZZANICA, N., RIZZOLO, L., VENERONI, G., DIOTTI, R., HEPEISEN, S., FINZI, A. F.: HLA-A, B, C and DR antigens in nickel contact sensitivity. *Br J Dermatol* 1990; 122: 309-313
59. MYGIND, N., DAHL, R., PEDERSEN, S., THESTRUP-PEDERSEN, K.: Allergologie; Textbuch und Farbatlas. *Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin* 1998: 181-186
60. NIELSEN, G. D., JEPSEN, L. V., JØRGENSEN, P. J., GRANDJEAN, P., BRANDERUP, F.: Nickel-sensitive patients with vesicular hand eczema: oral challenge with a diet naturally high in nickel. *Br J Dermatol* 1990; 122: 299-308
61. NORDLIND, K., LIDEN, S.: In vitro lymphocyte reactivity to heavy metal salts in the diagnosis of oral mucosal hypersensitivity to amalgam restorations. *Br J Dermatol* 1993; 128: 38-41
62. ÖNDER, M., AKSAKAL, B., GÜLEKON, A., MAKKI, S., GÜRER, M. A., BARUT, A.: HLA DR, DQA, DQB and DP antigens in patients allergic to nickel. *Contact Dermatitis* 1995; 33: 434-435
63. OLERUP, O., EMTESTAM, L.: Allergic contact dermatitis to nickel is associated with a Taq I HLA-DQA allelic restriction fragment. *Immunogenetics* 1988; 28: 310-313

64. PALIRAND, X., DE WAAL MALEFIJT, R., YSSEL, H., BLANCHARD, D., CHRÉTIEN, I., ABRAMS, J., DE VRIES, J., SPITS, H. : Simultaneous production of IL-2, IL-4 and IFN- γ by activated human CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones. *J. Immunol.* 1988; *141*: 849-855

65. PANZANI, R. C., SCHIAVINO, D., NUCERA, E., PELLEGRINO, S., FAIS, G., SCHINCO, G., PATRIARCA, G.: Oral hyposensitization to nickel allergy: preliminary clinical results. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; *107*: 251-254

66. PELTONEN, L.: Nickel sensitivity in the general population. *Contact Dermatitis* 1979; *5*: 27-32

67. PICHLER, W. J., TILCH, J.: The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2004; *59*: 809-820

68. PROBST, P., KÜNTZLIN, D., FLEISCHER, B.: T_H2-type infiltrating T Cells in nickel-induced contact dermatitis. *Cellular Immunology* 1995; *165*: 134-140

69. PSCHYREMBEL, W.: Klinisches Wörterbuch. *Walter de Gruyter* 1990: 1531

70. PURELLO D'AMBROSIO, F., BAGNATO, G. F., GUARNERI, B., MUSARRA, A., DI LORENZO, G., DUGO, G., RICCIARDI, L.: The role of nickel in foods exacerbating nickel contact dermatitis. *Allergy* 1998; *53*: 143-145

71. RÄSÄNEN, L., TUOMI, M.-L.: Diagnostic value of the lymphocyte proliferation test in nickel contact allergy and provocation in occupational coin dermatitis. *Contact Dermatitis* 1992; *27*: 250-254

72. RASSNER, G.: Dermatologie. *Urban & Schwarzenberg* 1992; S 94-98

73. RES, P., KAPSENBERG, M. L., BOS, J. D., STIEKEMA, F.: The crucial role of human dendritic antigen-presenting cell subsets in nickel-specific T-cell proliferation. *J Invest Dermatol* 1987; *88*: 550-554

74. RICCIARDI, L., GANGEMI, S., ISOLA, S., FOGLIANI, O., SAITTA, S., PURELLO-D'AMBROSIO, F.: Nickel allergy, a model of food cellular hypersensitivity? *Allergy* 2001; *56* (Suppl. 67): 109-112

75. RING, J., THEWES, M.: The clinical expression of allergy in the skin. *Allergy* 1999; 54: 192-197
76. RYCROFT, R. J. G., MENNÉ, T., FROSCH, P. J., BENEZRA, C.: Textbook of Contact Dermatitis. *Springer-Verlag* (a): 1992: 314-319 und (b): 2001: 938-950
77. SCHÄFER, T., BÖHLER, E., RUHDORFER, S., WEIGL, L., WESSNER, D., FILIPIAK, B., WICHMANN, H. E., RING, J.: Epidemiology of contact allergy in adults. *Allergy* 2001; 56: 1192-1196
78. SCHEYNIUS, A., SKOGLUND, C.: Interferon-gamma and the contact allergic reaction. *Contact Dermatitis* 1990; 23: 230-233
79. SCHNUCH, A., ABERER, W., AGATHOS, M., BRASCH, J., FROSCH, P. J., FUCHS, T., RICHTER, G.: Durchführung des Epikutantests mit Kontakt-Allergenen. *Allergo J* 2002; 62: 864-866
80. SCHNUCH, A., GEIER, J., LESSMANN, H., UTER, W., BRASCH, J., FROSCH, P. J.: Kontaktallergene im aktuellen Zeitverlauf. *Allergo J* 2004; 13: 57-69
81. SCHNUCH, A., UTER, W.: Decrease in nickel allergy in Germany and regulatory interventions. *Contact Dermatitis* 2003; 49 (2): 107-108
82. SCHOLZ, S., ALBERT, E.: Das HLA-System. mta serie 1993; 8: 925-933
83. SCHULZ, L. D., BAILEY, D. W.: Genetic control of contact sensitivity in mice: effect of H-2 and non H-2 loci. *Immunogenetics* 1975; 1: 570-583
84. SILVENNOINEN-KASSINEN, S., ILONEN, J., TILIKAINEN, A., KARVONEN, J.: No significant association between HLA and nickel contact sensitivity. *Tissue Antigens* 1979; 14: 459-461
85. SILVENNOINEN-KASSINEN, S., POIKONEN, K., IKÄHEIMO, I.: Characterization of nickel-specific T cell clones. *Scan. J. Immunol.* 1991; 33: 429-434
86. SINIGAGLIA, F.: The molecular basis of metal recognition by T cells. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 398-401

87. SINIGAGLIA, F., SCHEIDEGGER, D., GAROTTA, G., SCHEPER, R., PLETSCHER, M., LANZAVECCHIA, A.: Isolation and characterization of ni-specific T cell clones, from patients with ni-contact dermatitis. *J Immunol* 1985; 135: 3929-3932

88. SUMMER, B., BARNSTORF, S., SANDER, C. A., PRZYBILLA, B., THOMAS, P.: Kinetics of in-vitro-T-cell reactivity in nickel allergy: analysis of T-cell clonality, IL-4 and IFN- γ mRNA expression pattern (RT-PCR) and respective mediator secretion. *Arch Dermatol Res* 2001; 293 (1-2): 44

89. SZEPIETOWSKI, J. C., MCKENZIE, R. C., KEOHANE, S. G., ALDRIDGE, R. D., HUNTER, J. A. A.: Atopic and non-atopic individuals react to nickel challenge in a similar way. A study of the cytokine profile in nickel-induced contact dermatitis. *Br J Dermatol* 1997; 137: 195-200

90. THOMAS, P., SUMMER, B., SANDER, C., PRZYBILLA, B.: In vitro T cell reactivity in nickel allergy: comparison of T cell clonality, cytokine expression and mediator production. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124: 292-295

91. TORJUSSEN, W., ZACHERIASSEN, H., ANDERSEN, I.: Cigarette smoking and nickel exposure. *J Environ Monit* 2003; 5(2): 198-201

92. TRAMPISCH, H., J., WINDELER, J.: Medizinische Statistik. *Springer* 1997

93. VEIEN, N: Systemically induced eczema in adults. *Acta Derm Venerol Suppl* 147 1989; 30(4): 1-58

94. VEIEN, N. K., HATTEL, T., JUSTESEN O., NØRHOLM, A.: Oral challenge with metal salts. (I). Vesicular patch-test-negative hand eczema. *Contact Dermatitis* 1983; 9: 402-406

95. VAN HOOGSTRATEN, I. M., BOOS, C., BODEN, D., VON BLOMBERG, M. E., SCHEPER, R. J., KRAAL, G.: Oral induction of tolerance to nickel sensitization in mice. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 26

96. VON BLOMBERG-VAN DER FLIER, B. M. E., VAN DER BURG, C. K. H., POS, O., VAN DE PLASSCHE-BOERS, E.M., BRUYNZEEL, D.P., GAROTTA, G., SCHEPER, R. J.: In vitro studies in nickel allergy: diagnostic value of a dual parameter analysis. *J Invest Dermatol* 1987; 88: 362-368

97. WALTON, S., KECZKES, K., LEAROYD, P.A., RAJAH, S.M.: HLA-A, -B and DR antigens in nickel sensitive females. *Clinical and Experimental Dermatology* 1986; 11: 636-640
98. WARNER, G., L., LAWRENCE, D., A.: The effect of metals on IL-2-related lymphocyte proliferation. *Int. J. Immunopharmac.* 1988; 10: 629-637
99. WERFEL, T., HENTSCHEL, M., KAPP, A., RENZ, H.: Dichotomy of blood- and skin- derived IL-4 producing allergen-specific T cells and restricted V β repertoire in nickel-mediated contact dermatitis. *J Immunol* 1997; 158: 2500-2505
100. WITTMANN, M., NEUMANN, J., KIENLIN, P., EILERS, B., KAPP, A., WERFEL, T.: Evidence for a similar cytokine pattern expressed in allergic contact and atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 124: 346-348

12. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Pryzbilla und Herrn Prof. Dr. Thomas danke ich zunächst für die freundliche Überlassung des Themas an der Klinik. Herrn Prof. Dr. Thomas möchte ich ferner für die Unterstützung bei praktischen und theoretischen Fragen danken, sowie für die Geduld bis zur endgültigen Fertigstellung der Arbeit.

Besondere Dankbarkeit gebühren auch Frau Maier und Herrn Dr. Summer für die stets freundliche Unterstützung bei allen praktischen Labortätigkeiten, sowie die unermüdliche Hilfe bei der Organisation von Literatur und Terminen mit Betreuern und weiteren Helfern.

Für die durchgeführten HLA-Typisierungen und Hilfe bei deren Auswertung, sowie für die Durchsicht des HLA-Teils im Manuskript möchte ich Herrn Prof. Dr. Albert vom Labor für Immungenetik meinen herzlichen Dank aussprechen.

Dankbar bin ich auch Herrn Prof. Dr. Hölzl vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Epidemiologie und Biomathematik (IBE) in Großhadern für die kompetente Unterstützung bei der Statistik.

Hierzu möchte ich auch Frau Gaßner und Frau PD Dr. Rueff für die Unterstützung im Umgang mit dem SPSS-Programm danken.

Ich danke außerdem allen Familienmitgliedern und Freunden, die mich bei der Fertigstellung der Arbeit unterstützt haben. Insbesondere danke ich meinen Eltern für die unzähligen Male, die sie in der Zeit des Manuskriptschreibens auf meine Töchter aufgepasst haben.

13. Lebenslauf

Name	Tonja Bartl geb. Holz
geboren:	24. August 1973 in Rosenheim
1980-1984	Grundschule Kolbermoor
1984-1993	Gymnasium Bad Aibling (Abitur)
1993-2000	Studium der Humanmedizin an der LMU München (Abschluß Juni 2000)
2000-2001	Ärztin im Praktikum an der Frauenklinik in Prien
ab 2001	Beendigung des AIP und Beginn der Assistenzarztzeit in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikums Rosenheim
2003/2005	Unterbrechung der Fachartzausbildung wegen Elternzeit nach Geburt zweier Töchter im Dezember 2003 bzw. August 2005 für jeweils ca. ein Jahr