

**Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen
Abteilung Dermatologie
(Allgemeine Dermatologie mit Poliklinik)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Röcken**

**Untersuchung des basophilen Aktivationsmarkers
Ectonukleotid Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 3
(E-NPP3) als Verlaufsparemeter der spezifischen
Hyposensibilisierung bei Patienten mit
Insektengiftallergie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Fabian Hüttig

aus

Meerane

2008

Dekan:

Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Fierlbeck

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Weber

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Epidemiologie der Insektengiftallergie	1
1.2	Insektengifte	2
1.3	Pathogenese allergischer Reaktionen auf Insektengift	2
1.4	Diagnostische Möglichkeiten der Insektengiftallergie	6
1.4.1	Standardverfahren	7
1.4.2	Flowcytometrische Verfahren	10
1.5	Therapiemöglichkeiten bei Insektengiftallergie	12
1.6	Pathogene Mechanismen der spezifischen Immuntherapie	14
1.7	Möglichkeiten der Therapieerfolgskontrolle	15
1.8	CD 203c auf basophilen Granulozyten.....	16
1.9	Zielsetzung der Studie	17
2	MATERIALIEN UND METHODEN	18
2.1	Standardisierung des Studienprotokolls.....	18
2.2	Patienten	18
2.3	Studienprotokoll.....	19
2.4	Blut.....	20
2.5	Markierung der Basophilen des Patientenserums	20
2.6	Messung	23
2.7	Auswertung.....	23
2.8	Datenerfassung und -verarbeitung	24
2.9	Statistische Methoden	26
3	ERGEBNISSE	28
3.1	Ergebnisse der Eingangsdiagnostik	28
3.1.1	Allergenspezifische IgE-Antikörper (CAP-RAST-Test) im Serum	30
3.1.2	Hauttests mit standardisierten Insektengiften.....	31
3.1.3	Schweregrad der allergischen Reaktion in der Studiengruppe	31
3.2	Flowcytometrische Untersuchungen der CD 203 Expression auf Basophilen Granulozyten.....	32
3.2.1	Ergebnisse der Voruntersuchung (Baseline).....	32
3.2.2	Ergebnisse der Nachuntersuchung (Recall).....	43

3.3	Ergebnisse des Vergleichs der Untersuchungen	46
3.3.1	Vergleich der Stimationsindices der Positivkontrollen	46
3.3.2	Vergleich der Stimationsindices der Bienengift-Inkubation.....	47
3.3.3	Vergleich der Stimationsindices der Wespengift-Inkubation.....	48
4	DISKUSSION.....	49
5	ZUSAMMENFASSUNG	57
5.1	Einleitung	57
5.2	Patienten, Materialien und Methoden.....	57
5.3	Ergebnisse	58
5.4	Diskussion	58
6	ANHANG	60
6.1	verwendete Abkürzungen.....	60
7	LITERATUR.....	62
	DANKSAGUNG.....	68
	LEBENS LAUF.....	69

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Insektengiftallergie

Der Stich eines Hautflüglers (Hymenopter) kann für 3-5% der Bevölkerung in Mitteleuropa eine lebensbedrohliche Situation darstellen [23]. Die Symptome der Gifte von Biene (*Apis mellifera*) und Wespe (*Vespula vulgaris*, *Vespula germanica*) im menschlichen Körper reichen von Hautrötungen über gastrointestinale und kardiovaskuläre Beschwerden bis hin zu respiratorischen Reaktionen oder einem vollständigen anaphylaktischen Schock, welcher unbehandelt oft tödlich endet.

Taxonomisch betrachtet stellen die Gifte der Species Apinae und Vespulae die häufigsten Ursachen einer allergischen Reaktion auf Hymenoptergifte dar. Die Unterfamilie der Apidae vom Genus *Bombus* (Hummeln) und Vespidae vom Genus *Vespa* (Hornissen) sowie *Dolchovespula* (Kurzkopfwespen) stellen in Ihrer Häufigkeit bezüglich des Auftretens allergischer Reaktionen durch die geringe Stichprävalenz keine Relevanz dar. Selbiges gilt für die Reaktionen gegen die Gifte der Hymenopter-Superfamilie Scolioidea mit ihren Familien Formicidae (Schuppenameisen) und Myrmicidae (Knotennameise) [72],[17].

Allein in Deutschland sterben 10-40 Menschen jährlich durch Folgen von Insektenstichen [4]. Todesfolgen sind neben systemischen allergischen Reaktionen auch lokale nichtallergische Reaktionen, insbesondere bei Hymenopter-Stichen im Mund/Rachen-Bereich. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass der anaphylaktische Schock weit seltener Todesursache ist, als das Larynxödem in Folge eines Hymenopteren-Stiches im oralen Bereich. Abzugrenzen sind also nichtallergische Reaktionen auf die Toxine nach einem Hymenopteren-Stich im Kopf-, Hals-, Mund- oder Rachenbereich, welche bis zum Erstickungstod führen können, von den systemischen allergisch-bedingten Reaktionen. Nach einem Insektenstich, unabhängig von der Schwere der Lokalreaktion, tragen in Folge der „Immunantwort“ bereits 25% aller Betroffenen spezifische Immunglobuline- (Ig) E Antikörper des Giftes in sich [76], [74], [28]. Bei einem weiteren Stich besteht dann das Risiko, dass die Immunantwort zu einer allergischen Reaktion führt, welche in keinem Verhältnis

zur eigentlichen Wirkung des Giftes steht. Eine genauere Darstellung dieser Pathogenese, wird im Kapitel 1.3 behandelt.

1.2 Insektengifte

Die in den Giften von Hymenoptern enthaltenen Allergene sind vielfältig: Von niedermolekularen Substanzen und vasoaktiven Aminen wie Acetylcholin und Histamin – über Peptide, z.B. das im Bienengift enthaltene 2,9 kDa Peptid Melittin (Api m 4) bis zu vielkettigen Proteinen wie z.B. die 16 kDa Phospholipase A2 (Api m 1) des Bienengiftes [38]. Allerdings sind die Gifte der Biene und die der Wespe von unterschiedlicher Zusammensetzung und so kann man als Hauptallergene des Wespengiftes das Antigen 5 (Ves v 5) und die Phospholipase A1 (Ves v 1) und des Bienengiftes die Phospholipase A2 (Api m 1) nennen. Mögliche Kreuzreaktivitäten der Gifte resultieren aus der nahen entomologischen Verwandtschaft der Hautflügler. [98], [44, 45]

Ein Allergen in Wespen- wie Bienengift ist mit 50% Identität in der Sequenz zwischen beiden Spezies die 43 kDa Hyaluronidase und ihre damit verbundene Kreuz-Reaktivität bei Allergien [99], [85], [84], [92], [54].

1.3 Pathogenese allergischer Reaktionen auf Insektengift

Bei „Nicht-Allergikern“ entsteht in Folge eines Stiches mit Giftapplikation durch den Hymenoptern in die Haut, meist eine juckende bis schmerzende Quaddel mit Rötung von ungefähr 2 cm Durchmesser. Diese, teilweise von einer subkutanen Schwellung begleitete Hautreaktion auf die Toxine ist meist schon nach Stunden, in aller Regel spätestens nach 1-2 Tagen, wieder verschwunden. Alle Allgemeinreaktionen sind als Manifestationen einer sog. „IgE vermittelten Hypersensitivität“ auf das Gift zu betrachten. Diese werden nach Coombs & Gell als „Typ 1 Reaktionen“ klassifiziert und als „Allergische Reaktionen vom Soforttyp“ bezeichnet.

In Folge einer Bildung von spezifischen IgE Antikörpern auf Bestandteile des Insektengiftes nach ein- oder auch mehrmaliger Exposition, existieren diese dann stets im Blutkreislauf des Trägers und stellen so eine fortwährende Sensibilisierung dar. Die Bindung findet an hochaffinen Fcε-Rezeptoren auf

EINLEITUNG

Mastzellen und basophilen Granulozyten statt, welche wiederum eine zentrale Rolle in der Immunantwort spielen und deshalb als „Effektorzellen“ bezeichnet werden. Ein wesentlicher Unterschied dieser beider Zelltypen besteht darin, dass Mastzellen gewebeständig und vor allem in den Schleimhäuten des Respirations- (RT) sowie Gastrointestinaltraktes (GIT) „verankert“ sind; Basophile Granulozyten hingegen zirkulieren frei im Blutkreislauf und können in Bezug auf Untersuchungen leicht zugänglich gemacht werden (Blutentnahme). Ein Grund weshalb Basophile im Fokus der Forschungen liegen.

Die IgE Antikörper existieren fortwährend, gebunden über ihren Fc-Teil, auf den Effektorzellen. Sollte es zu einer erneuten Exposition mit Allergenen kommen, binden diese an die spezifischen, zellfixierten IgE Antikörper. In Folge dessen können entstehende Quervernetzungen von Antikörpern Membranveränderungen induzieren, die eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen [61], welche in anderen Arbeiten ausführlich beschrieben ist. Das Ende der komplexen Prozesskette besteht in einer Ausschüttung von präformierten Mediatorsubstanzen und der Verschmelzung zytosolischer sowie basophiler Granula mit der Zellmembran. Zuvorderst zu nennen ist die Freisetzung von Histamin, Prostaglandin D₂ sowie verschiedener Zytokine (Interleukin 4 und 13) und Leukotrien C₄ [62]. Auf die Existenz dieser Stoffe im extrazellulären Raum folgen klinisch eine Kontraktion glatter Muskulatur und Sekretion der Schleimhäute bei gleichzeitig erhöhter Gefäßpermeabilität und Kapillardilatation (klinisch entsteht dadurch eine „Schwellung des Gewebes“). Es imponieren so die Symptome einer allergischen Allgemeinreaktion in unterschiedlichen Facetten und Kombinationen. Die Zeit, welche bis zum Auftreten einer solchen Klinik verstreicht, kann von wenigen Minuten bis hin zu Stunden betragen [46]. Ein Fakt von immenser Bedeutung für Diagnostik und Therapie, denn er verlangt in jedem Fall bei provoziertem Kontakt mit Allergenen die Notfallbereitschaft der Ärzte, wie die weiteren Beschreibungen zeigen.

In Tabelle eins sind typische Symptome durch die Reaktion am Manifestationsort aufgelistet. Diese können getrennt sowie gemeinsam und auch in verschiedenen Schweregraden auftreten. Das entstehende individuelle klinische Gesamtbild der „allergischen Reaktion“ auf ein Allergen ist in unserem Fall schlussendlich die Wirkung eines Giftbestandteils, welche indirekt auch noch begleitende physiologische Reaktionsketten nach sich ziehen.

EINLEITUNG

Tabelle 1 Symptome einer allergischen Reaktion: Je nach Manifestationsort der aktivierten Effektorzellen verursachen die Allergene klinische Symptome. Diese können Befunde in Haut, GIS (Gastrointestinalesystem) und RT (Respirationstrakt) verursachen, welche Symptome unterschiedlichen Ausmaßes begründen.

Manifestation	Befund	Symptome
Haut	Quaddeln Quincke Ödem	Rötlich, einzeln stehend, konfluierend über den Körper disseminiert. Teils ödematös Periorale / periorbitale Schwellung starken Ausmaßes (Angioödem)
Gastrointestinales System (Magen / Darm)	Schleimhautödem, Magen-Darm-Spasmus	Diarrhoe (bis hin zu Stuhlinkontinenz), Emesis, Abdominalkrämpfe
Respirationstrakt (Lunge / Rachen)	Bronchialobstruktion, Bronchospasmus, Larynxödem	klosiges Gefühl im Hals, Angstzustände, Dispnoe

Zum Beispiel eine eintretende Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System kann von zweierlei Ursache sein: Erstens in Folge direkter Kardiotoxizität einiger ausgeschütteter Mediatoren, zweitens als Folgereaktion der in Tabelle 1 genannten Symptome. So ist Hypotonie im Endzustand einer allergischen Reaktion auf Flüssigkeitsverschiebung (in die Ödeme der Haut), Flüssigkeitsverlust (durch Diarrhoe und Emesis) sowie Hypoxie und Acidose (durch Bronchospasmus) begründet. Das Gesamtbild des „Anaphylaktischen Schocks“ stellt sich bei signifikanter Reduktion der Herzleistung, Hypovolämie und vermindertem peripherem Widerstand des Kreislaufsystems ein.

Der Schweregrad der allergischen Reaktionen wird aufsteigend zu diesem mit Grad IV bezeichnetem Schockzustand, nach Mueller [69], [80] wie in Tabelle 2 gezeigt unterteilt.

EINLEITUNG

Tabelle 2: Klassifikation des Schweregrades einer allergischen Reaktion

nach MUELLER. Die Zuordnung zum Grad der Schwere einer allergischen Reaktion eines Patienten auf ein Allergen, kann aus Daten der Anamneseerhebung, wie auch einem vorliegenden klinischen Befund ermittelt werden. Oft wird die Zuordnung durch Anamnese und unter Berücksichtigung vorliegender Ergebnisse der Standarddiagnostik getroffen.

MÜLLER- Grad	Klinische Symptomatik
I	Generalisierte Urtikaria, Pruritus, Malaise, starkes Angstgefühl <i>= leichte Allgemeinreaktion</i>
II	Angioödem und/oder beliebige Reaktion aus Grad I zzgl. zwei oder mehr der Folgenden: thorakales Engegefühl, Nausea, Erbrechen, Diarrhoe <i>= mäßige Allgemeinreaktion</i>
III	Beliebige aus Grad I + II sowie zwei oder mehr der Folgenden: Stridor, Dysphagie, Dysarthrie, Heiserkeit, Schwächegefühl, Benommenheit, Todesangst <i>= schwere Allgemeinreaktion</i>
IV	Beliebige der o.g. und zwei oder mehr der Folgenden: Blutdruckabfall, Zyanose, Kollaps, Inkontinenz, Bewusstlosigkeit <i>= Schockreaktion</i>

Die umrissene Darstellung der Pathogenese, welche zu dem klinischen Bild eines provozierten Allergikers führt wird orchestriert durch die Anwesenheit von Zytokinen, die von T-Lymphozyten ausgeschüttet werden. Die T-Helferzellen (T_H) besitzen in den „allergischen“ Reaktionskaskaden zwischen verschiedenen Zelltypen, vermittelt über Mediatoren, eine progrediente Rolle. Die Helferzellen vom Typ 1 (T_H1) agieren mittels Sekretion von Interferon (INF) γ und Interleukin

(IL) 2 , welche die Produktion von IgG Antikörpern induzieren und damit in der Gesamtheit der Kaskade eine neutrale Position einnehmen.

Die Helferzellen des Typ 2 (T_H2) haben hingegen durch die Freisetzung der Interleukine IL-4, IL-13 und IL-5 eine inflammatorisch förderliche Rolle. Dies liegt daran, dass durch letztgenannte die Produktion allergen-spezifischer IgE-Antikörper induziert wird. Daher charakterisieren T_H2 – Lymphozyten maßgeblich die Immunantwort im Sinne der Allergie [52].

Das letztlich in den Focus der Untersuchungen gerückte Eikosanoid Prostaglandin D₂ kann selektiv über einen neu entdeckten, auf Leuko- und Lymphozyten präsenten DP-Rezeptor Chemotaxis zwischen Lymphozyten, basophilen und eosinophilen Granulozyten auslösen, die inflammatorisch wirkt [43]. Weitere Rezeptoren auf Zellen, wie z.B. CD 63 und CD 203c sind zum Teil bekannt, jedoch in ihrer Funktion und „Verhaltensweise“ pathophysiologisch nicht erschlossen. Es gäbe noch eine Vielzahl anderer zu nennender Reaktionen, Interaktionen und Ansätze in der Pathogenese, doch soll es bei den Wichtigsten bis hier genannten belassen werden. Zusammenfassend betrachtet bleibt eine nur teilweise geklärte Kaskade von Mechanismen zwischen verschiedenen Zellen, Mediatoren und Antikörpern, die in ihrem Zusammenspiel starke klinische Reaktionen auslösen, welche lebensbedrohliche Ausmaße für den Betroffenen haben können. Diese Tatsache erschwert die im Weiteren ausgeführte Diagnose und Therapiekontrolle einer Insektengiftallergie.

1.4 Diagnostische Möglichkeiten der Insektengiftallergie

Die Diagnose einer wie in Kap. 1.3 beschriebenen Allergie vom Soforttyp kann nur Parameter der Pathogenese zum Ansatz haben. Besonders problematisch ist dabei die teils ungeklärte Interaktion in der Reaktionskaskade für „in-vitro“ Untersuchungen, zum anderen die klinischen Auswirkungen bei Provokation eines Allergikers mit Allergenen bzw. Giften – also „in-vivo“ Untersuchungen. Im Folgenden sollen Standardverfahren und deren Vor- bzw. Nachteile, sowie Ansatzpunkte der verbesserten Diagnostik aufgezeigt werden.

1.4.1 Standardverfahren

Klinische Diagnostik

Voraussetzung für die Diagnose und Behandlung ist, wie auch im Standpunktpapier der WHO gefordert, das Vorhandensein standardisierter Allergene – in unserem Fall – Bestandteile der standardisierten Gifte von Biene und Wespe. Diese Gifte sind aufgereinigte und in der Konzentration gleich aufgemengte Sekrete aus den Giftblasen von lebenden Bienen und Wespen.

Gentechnisch ist die Herstellung von rekombinanten Giften, also der synthetischen Herstellung und Mischung spezieller Allergene möglich, jedoch für in-vivo Anwendungen am Menschen nicht zugelassen und hat somit in der in-vitro Diagnostik momentan auch keinen Stellenwert.

Diagnostisches Mittel Nummer eins ist eine sorgsame und eingehende Anamnese, denn nur diese lässt eine Aussage über die den Patienten widerfahrene „Schwere der Reaktion“ auf einen Insektenstich zu. Das Ergebnis dieser Befragung trägt maßgeblich, in gemeinsamer Betrachtung mit u.a. Laborparameter, zur Findung des Schweregrads der Reaktion nach Müller (s. Tabelle 2) bei, ist allerdings in seiner Reliabilität durch die subjektive Einschätzung des Betroffenen fraglich. Leider gibt es auch keine standardisierten Bögen zur Erfassung und somit keine wirkliche Vergleichbarkeit, ermöglicht durch ein integriertes „Scoring“ von erhobenen Anamnesedaten, wie es z.B. für Schmerzpatienten existiert.

Der zweite Goldstandard der Diagnostik ist ein sog. Hauttest. Dieser erfolgt in zwei Stufen. Erstens durch einen Prick-Test, bei dem in aufsteigender Konzentration von 0.01 –100 µg/ml standardisierten Giftextrakts als Kleinstmengen über Klängen in die Oberhautschicht des Unterarms appliziert wird. Im Falle keiner Reaktion mittels dieses Tests erfolgt die subcutane Injektion von 0,02-0,05 ml standardisierten Giftextrakts in gleicher aufsteigender Konzentration. Hierbei sei bemerkt, dass die Sensitivität einer subcutanen Injektion höher liegt als die eines Pricktest in Konzentration von 100µg/ml [7]. Beide Tests werden bis zum Auftreten einer positiven Reaktion maximal bis zu einer Konzentration von 100µg/ml durchgeführt und beim Auftreten einer positiven Hautreaktion und unter Bewertung dieser beendet. Die Bewertung der Hautreaktion kann einfach (+) oder zweifach (++) positiv sein. Dieses liegt,

EINLEITUNG

gleich der Abgrenzung zur negativen (\emptyset) Hautreaktion, in Entscheidung des untersuchenden Arztes, konform den Empfehlungen der European Academy of Allergology & Clinical Immunology (EAACI) [1]. Besonderes Problem ist hier die eingangs erwähnte auslösbare allergische Reaktion des Patienten, weshalb neben einer Notfallbereitschaft auf eine für mehrere Stunden anschließende Sicherheitsbeobachtung teilstationär notwendig ist, was neben der „Gefahr“ für den Patienten eine Reaktion zu erleiden, auch gesundheitsökonomisch kostspielig ist.

Labordiagnostik

Die Probleme klinischer Diagnostik veranlassen zur Durchführung von Laboruntersuchungen. Dazu dient in erster Linie dem Patienten entnommenes Blut zur Erfassung von Laborparametern. Zur Routinediagnostik haben sich dabei maßgeblich zwei Verfahren etabliert: RAST und die Serum-Tryptase.

Der „Radio Allergo Sorbent Test“ (RAST) misst das Vorhandensein von allergenspezifischen IgE Antikörpern und hat eine hohe Spezifität sowie Sensitivität [48], [41].

Die Serum-Tryptase wird vor allem beim anamnestischen Vorhandensein von schweren Allgemeinreaktionen zur Diagnosesicherung und Differenzierung gegenüber der Mastozytose empfohlen [59], [3], [39].

Diese zwei Verfahren haben sich neben anderen, aus der Forschung rund um die Aufklärung zur Pathogenese von Allergien entwickelt und in den Laboren etabliert - sind jedoch allein nicht aussagekräftig genug um auf die klinische Diagnostik zu verzichten. Daher besteht die Bestrebung verlässliche in-vitro Begleitparameter bzw. Verfahren zur Untersuchung solcher, die die Entscheidungsfindung vereinfachen und sichern, anzubieten.

Allgemein kann man solche, zur Zeit verfügbare, kommerzielle und experimentelle Verfahren wie folgt einteilen:

- die Messung durch Allergenstimulation freigesetzter Mediatoren und Zytokine, wie bspw. Leukotrien mittels „Cellular Antigen Stimulation Test“ (CAST-System) oder Histamin mittels RadiimmunoAssay (RIA);

EINLEITUNG

- die Bestimmung spezifischer IgE Antikörper gegen Insektengiftbestandteile im Patientenserum (RAST-Test oder der gelelektrophoretische Immunoblot-Test);
- die Quantifizierung von Oberflächenmarkern auf Effektorzellen, wie bspw. der CD 63 basierte „Basophile Activation Test“ (BAT) mittels Flowcytometrischer Untersuchungen (s. Kapitel 1.4.2)

Da die ersten 2 Möglichkeiten bisher keine allein verlässlichen Ergebnisse erzielten stellt die letztere seit der verbreiteten Verfügbarkeit von Flowcytometrie für die Allergiediagnostik hoch sensitive und spezifische Tests bereit. Nur wenige der größtenteils noch experimentellen Verfahren besitzen „Serienreife“ für den täglichen Routineeinsatz. Die sind allerdings soweit durchführbar wichtige Ergänzungen zu den etablierten Verfahren [16], in dem sie eben durch ihre hohe Sensitivität helfen Diagnosen zu sichern.

Der Nachteil der bisherigen in-vitro-Allergietests ist zum Einen durch die „Nonresponder-Problematik im klinischen Sinne“ gekennzeichnet, bei der Patienten trotz positiver Laborwerte keine klinischen Reaktionen auf in-vivo Allergenexposition (z.B. im Hauttest) zeigen, was an der Tatsache liegt, dass auch Menschen ohne klinisch manifeste Allergie spezifische IgE-Antikörper im Serum haben können [20]. Zum anderen besteht in-vitro die „Problematik der Nonresponder“ in der Form, daß Patienten ohne auffällige Laborbefunde imposante klinische Reaktionen aufweisen können. Momentan wohnt somit allen etablierten Verfahren also das hohe Risiko „falsch-positiver“ sowie „falsch-negativer“ Befunde inne [79]. Doch nicht nur letztgenannte Nonresponder, die in der Literatur auf ca. 9% aller Allergiker bezifferte sind, stellen die Verlässlichkeit verfügbarer Standarddiagnostika in Frage. Ganz zu schweigen von der Möglichkeit einen Laborparameter zur Korrelation mit dem (zu erwartenden) klinischen Schweregrad der Allergie zu besitzen, konzentrieren sich die Forschungen zur Diagnostik auf flowcytometrische Verfahren [19], [51]. Die Expressierung von Zelloberflächen auf Effektorzellen, die Anhalt für „Kommunikation“ in der Reaktionskaskade der Allergischen Reaktion sind, konnten schon als verlässliche Parameter ausgezeichnet werden. Unter diesen sind CD 11b, CD13 , CD63, CD 107a und CD 164, CD 203c, [68], [9], [42]. Für all diese liegen experimentelle, teils schon standardisierte, in-vitro-Tests vor. CD 203c als Augenmerk dieser Arbeit ist als

hochspezifisch- und sensitiv beschrieben worden, wenn er flowzytometrisch auf Basophilen Granulozyten nach Stimulation mit einem Allergen untersucht wird.

1.4.2 Flowcytometrische Verfahren

Flowcytometrie ist ein bereits 10-15 Jahre altes Verfahren, welches seither ständig verbessert und erweitert wurde. Durch seine vielfältigen Einsatzmöglichkeiten (Zellsortierung, DNA-Analyse, Chromosomenuntersuchung, Funktionsstudien) hat es schnell den Weg in die Forschungslabore gefunden. Es ist ein spezialisiertes Fluoreszenzmikroskop, welches gleichzeitig physikalische wie auch chemische Eigenschaften von (in einem Medium fließenden) Zellen untersuchen kann. Realisiert wird dies durch eine Lichtquelle in Form eines blauen Argon-Lasers mit 488nm Wellenlänge und eines roten Diodenlaser mit 635nm Wellenlänge, die über eine Fokussierungslinse kombiniert in die Messkammer strahlt. In dieser befinden sich, durch Druck zu einem Flüssigkeitsfaden ausgezogen, aneinander gereihete Zellen der Probe. Eine Diode erfasst das Streulicht in Strahlenrichtung (FSC = Forward Scatter). Seitlich gestreutes Licht passiert eine Fluoreszenz-Sammellinse und wird nun vielfach durch Spiegel geteilt und gefiltert. So ermöglicht ein „Brewster Spiegel“ die Lenkung orthogonal gestreutes Licht zur sog. „Side Scatter“ – (SSC) Diode. Die Erfassung spezieller Emissionsspektren für Fluorochrommarkierungen übernehmen die nachstehenden Dioden (FL1, FL2, usw.). Im unserem Fall kann das Licht des Farbstoffs Phycoerythrin (PE) mit einem Fluoreszenzspektrum von 560-605nm (Maximum 585nm) über FL2 gemessen werden. Vergleiche hierzu auch Abbildung 1 in Anlehnung an die Technische Beschreibung des FACSCalibur durch den Hersteller.

EINLEITUNG

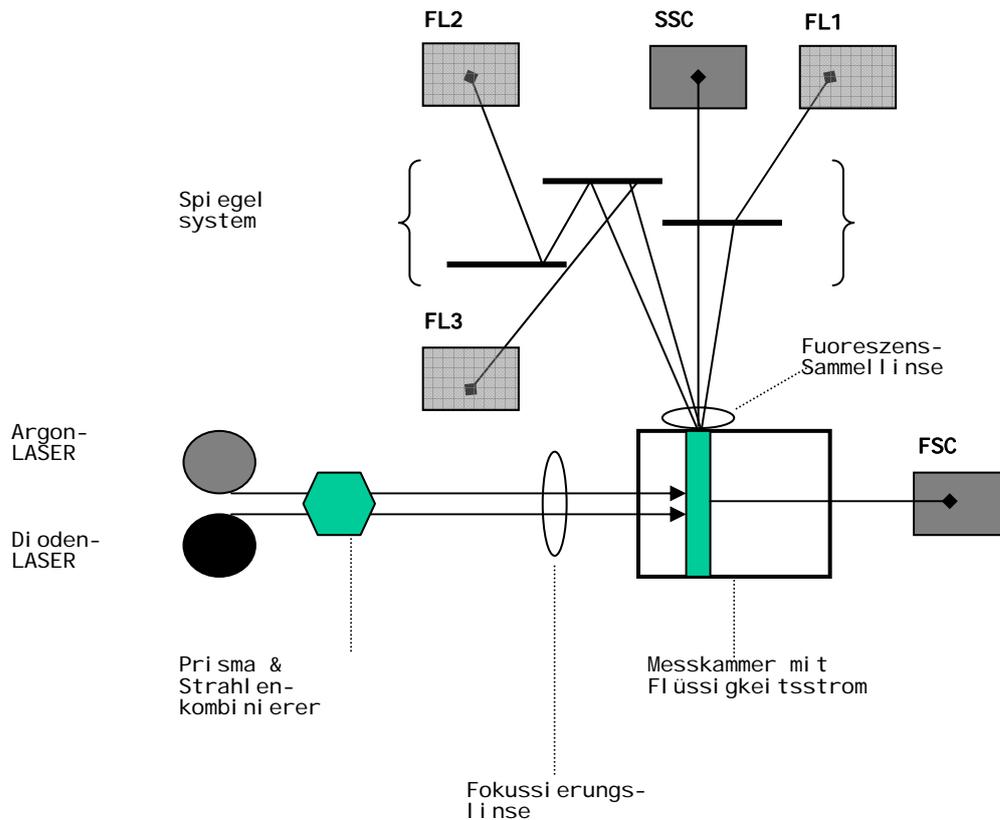


Abbildung 1 Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines Flowcytometers am Beispiel des FACSCalibur (Fa. BD Biosciences). Die zwei Laser (blauer Argon- und roter Diodenlaser) strahlen kombiniert und fokussiert auf den Flüssigkeitsstrom in die Messkammer. Vorwärts gestreutes Licht empfängt die FSC – Diode. Die orthogonalen Anteile seitwärtsgestreutes Lichtes (nach Teilung in einem Brewster-Spiegel) emittiert die SSC–Diode und Streulicht besonderer Wellenlängen wird durch ein Spiegel/ Filtersystem auf spezielle Fluorochrom-Dioden mit spezifischen Emissionsspektren (FL1, FL2, FL3) verteilt. Die Messung jeder Diode wird fortlaufend als Datensatz an den angeschlossenen PC weitergegeben und dort verarbeitet.

Die während der Messung kontinuierlich erfassten Daten an den Dioden werden an den Messcomputer weitergeleitet. Dieser übernimmt die Darstellung der Messdaten für die Zellen nach den individuellen Wünschen des Benutzers. So ist es möglich über gezielte Präparation des Serums Informationen über Zellgrößen, intrazelluläre Situationen wie auch vorhandene Oberflächenmerkmale i.S. von Clusters of Differentiation (CD) darzustellen. Im Zuge der steigenden Verbreitung, Nutzung und Weiterentwicklung der Flowcytometrie werden neue CDs gefunden und nach Markierung das „Beobachten deren Verhaltens“ auf einem oder mehreren Zelltypen möglich.

Diese verstärkte Nutzung der Untersuchung von Oberflächenmarkern, zeigte in klinischen Studien eine hohe Korrelation zwischen in-vitro Ergebnissen und dem klinischen Bild des Patienten, so dass mittlerweile von verschiedenen Seiten empfohlen wird, für die Diagnosestellung zusätzlich sensible flowcytometrische Verfahren mit heranzuziehen [88], [16]. Als zentrale Effektorzellen der IgE vermittelten Allergie sind die Vielzahl von Rezeptoren auf den Oberflächen der im Blut zirkulierenden basophilen Granulozyten im Fokus all dieser Untersuchungen. Daher wurden in den letzten Jahren mittels Flowzytometrie eine Vielzahl von Abläufen der Reaktionskaskaden entdeckt und neben einem besseren Verständnis, Marker hoher Sensitivität bei der Bewertung zum Vorliegen einer Allergie gefunden. Einer dieser ist die E-NPP3 (CD 203c) und wird in Bezug auf die basophilen Blutzellen im Kapitel 1.7. besprochen.

1.5 Therapiemöglichkeiten bei Insektengiftallergie

Die spezifische Immuntherapie (im folgenden SIT) ist das Mittel der Wahl, um Insektengiftallergiker oder andere Allergiker vom IgE-vermittelten Typ, seit der ersten Immuntherapien von Noon & Freeman 1911, sowie von Hunt 1978 im Bezug auf die Insektengiftallergie, erfolgreich zu behandeln [26], [75], [47], [10]. Die heutige Indikation für eine Hyposensibilisierung ist in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinischen Immunologie (DGAI) festgehalten und „besteht bei nachgewiesener IgE-vermittelter Sensibilisierung mit korrespondierenden klinischen Symptomen durch Allergene, bei denen eine Karenz nicht oder schwer möglich ist und ein geeigneter Extrakt vorhanden ist“ [55] . Diese ist konform den Forderungen des WHO Papiers zur Hyposensibilisierungsbehandlung [10]. Für die Durchführung einer SIT mit standardisierten Allergenen am Patienten gibt es im Besonderen für die Insektengiftallergie verschiedene Therapieverfahren bzw. Protokolle [96],[6]. Eine häufig und in Europa verbreitet genutzte Möglichkeit ist es, den Patienten in einer Schnellhyposensibilisierung (kurz: „rush SIT“) innerhalb von 3-5 Tagen von 0,01µg Gift / ml zur Zieldosis von 100µg Gift / ml zu führen und anschließend über eine Erhaltungsdosis von 100µg Gift / ml in anfangs wöchentlichen, dann zwei- später vier-wöchentlichen Abständen zu versorgen

EINLEITUNG

[97], [65]. Eine andere, konventionelle Möglichkeit wäre, die Zieldosis über einen Zeitraum von 57 Tagen zu erreichen. Ganz im Gegensatz dazu wird bei der „ultrarush SIT“ innerhalb von 7 Stunden eine Zieldosis von 80µg Gift / ml erreicht, worauf zwei Erhaltungsdosen von 100µg Gift / ml im Abstand von 4 Stunden am zweiten Tag folgen. Danach werden dann in sich immer vergrößernden Abständen (nach 8, 15, 29, 43 Tagen usw.) Erhaltungsdosen verabreicht [21]. Die Verträglichkeit der „Rush-“ und „Ultrarush-“ Protokolle wird als gut bis sehr gut beschrieben [36], [58], [27].

In Bezug auf die Nebenwirkungen und die Sicherheit einer solchen Therapie sollte man bemerken, dass die der Insektengiftallergiker zu den best verträglichsten sowie erfolgreichsten aller Immuntherapien gehört [64], [77]. Die Abbruchquote wegen zu starker Nebenreaktionen liegt bei den Bienengiftallergikern bei nur 3-5%, bei den Wespengiftallergikern noch darunter [72].

Nach einer erfolgreichen Initialtherapie erfolgt im gängigen „rush-Protokoll“ die fortwährende Injektion von standardisiertem Gift ambulant durch einen Arzt in regelmäßigen, meist vier- bis sechswöchentlichen Abständen.

Über die Dauer dieser Erhaltungsdosen ist man sich uneinig – ein sicherer Therapieerfolg stellt sich bei manchen Autoren erst nach 2-3, bei anderen nach 5-7 Jahren ein und ist verbunden mit dem Beenden der regelmäßigen Gaben der Erhaltungsdosis. Andere halten eine lebenslange Gabe von Erhaltungsdosen für sicher, da bei noch 10% aller Patienten die Gefahr besteht, mit einer systemischen Reaktion auf ein Stichereignis zu reagieren. Immerhin reagieren aber nach 5 Jahren 25% nach 7-10 Jahren sogar 60%- 70% nicht mehr positiv auf den Hauttest [30]. Diese verwaschenen Angaben in der Literatur rühren daher, dass sich die Therapieerfolgskontrolle als Abschluss der Behandlung eben genauso, wenn nicht schwerer gestaltet als die Diagnose. Somit ist auch hier die Entscheidung zum Beenden der Erhaltungstherapie dem Regime des behandelnden Arztes überlassen, wie es auch im Falle der Diagnostik nur aus kombinierten Befunden und Erfahrungswerten passiert. Siehe dazu Kapitel 1.7.

1.6 Pathogene Mechanismen der spezifischen Immuntherapie

Die Wirkung der SIT greift in den nicht umfassend bekannten Mechanismus der Pathogenese (s. Kap. 1.3) ein und modifiziert den Ablauf der Immunantwort auf ein Allergen, soweit bisher bekannt, wie folgt:

Man weiß, dass diese Behandlung stark auf die T-Lymphozyten wirkt, welche bei atopischen Erkrankungen bzw. diesen Reaktionen vom Soforttyp eine Schlüsselrolle spielen. Große Bedeutung haben in diesem Zusammenhang die bereits beschriebenen T-Helferzellen.

T_H1-Zellen vermitteln über die genannten Zytokine vorwiegend die Produktion von IgG Antikörper, während T_H2-Zellen vorwiegend an der Forcierung der IgE-Antikörperproduktion beteiligt sind.

Mit dem Verlauf der Behandlung geht durch das von regulatorischen T-Lymphozyten (T_{Reg}) vermehrt gebildete IL-10 eine steigende Unempfindlichkeit dieser T_H2 Zellen einher [49], [2]. Genauer wird die Aktivierung von T_H2-Zellen gehemmt. Diese Unterdrückung der inflammatorischen T_H2 zugunsten der T_H1-Zellpopulation wurde eine zeitlang unter Annahme einer Proliferationsveränderung als „T-Cell-Shift“ von T_H2 zu T_H1 bezeichnet [73], [89]. Durch eine in Studien letztendlich gezeigte „globale Suppression“ der T_H2 Zellen [95], [25] sinkt die Zytokinbildung durch T_H2. Folglich steigen aber unter anhaltender T_H1 Zytokinsekretion allergenspezifische IgG₁ und IgG₄ Spiegel und der IgE Spiegel fällt. IL 10 wirkt so anti-inflammatorisch.

Eine Zunahme der Ausschüttung von IL 12 und Tumornekrosefaktor (TNF) α aus Monozyten ist höchstwahrscheinlich für einen Anstieg der Interferon (INF) γ Konzentration im Rahmen der SIT verantwortlich [60]. Zusätzlich verstärkt IL12 die T_H1 Polarisation. Nach der Behandlung fällt auf, dass IL 10 in Coaktion mit dem häufig diskutierten Interferon γ [63],[50],[90] die Ausschüttung von Histamin und Sulfid-Leukotrienen aus den Leukozyten absenkt, also ebenfalls anti-inflammatorisch wirkt. Kürzlich konnte auch die Interaktion von T_H2 – Zellen mit eosinophilen und basophilen Granulozyten über eine T_H2-assoziierte Oberfläche gefunden werden. Kurz nennen sich diese CRTH2 (chemoattractant homologous molecule expressed on TH2-cells) oder auch DP2 [14], [37]. Welche Auswirkungen die Immuntherapien und Wandel auf diese oder andere Zelloberflächen wie CD 203c und CD 63 haben ist bisher nicht bekannt. Eine

Unterbrechung von Reaktionskaskaden durch Unterdrückung oder Verstärkung der Exprimierung von Oberflächenmerkmalen ist denkbar, allerdings nicht hinreichend untersucht.

1.7 Möglichkeiten der Therapieerfolgskontrolle

Um eine Erfolgskontrolle durchzuführen stehen dem behandelnden Arzt nur die schon aufgeführten diagnostischen Möglichkeiten (s. Kapitel 1.4) zur Verfügung. Da diese allerdings auch nach vielfältigen Untersuchungen keine eindeutigen Veränderungen in den Befunden liefern, ist am Ende der umfangreichen Behandlung die klinische in-vivo „Prüfung“ des Patienten mit einer „Stichprovokation“ noch heute Bestandteil der Erfolgskontrolle. Sie wird durchgeführt, indem der Patient unter Aufsicht eines Arztes eine lebende Biene bzw. Wespe in einem Netz auf die Haut gesetzt bekommt und das Tier, beispielsweise mit einer Pinzette, so lange gereizt wird, bis es den Patienten sticht. Bei dieser Simulation ist jedoch nicht sichergestellt wieviel Gift das Insekt abgibt und in welche Hautschicht es dieses appliziert. Hierbei sei darauf hingewiesen, dass auch die Stichprovokation nur im Falle einer positiven Reaktion des Patienten eine sichere Aussage treffen kann. In dem Fall eines eintretenden anaphylaktischen Schocks des Behandelten kann mit Sicherheit der Misserfolg der Therapie bekundet werden. Die Indikation einer solchen, unter Vorbereitung von Notfallmaßnahmen durchgeführten Stichprovokation wird entweder gestützt von Laborparametern nach 1-2 oder ohne diese nach 3-5 Jahren „gut vertragener“ Erhaltungstherapie gestellt. Patienten, die schwere Allgemeinreaktionen im Therapieverlauf oder anamnestisch eine schwere Allgemeinreaktion aufweisen, haben das größte Risiko einer erneut schweren Reaktion auf einen unerwarteten Hymenopterstich (Feldstich) [35], [57], [53].

Von daher wird oft die RAST-Klasse vor Indikationsstellung mit erhoben [70], um das bekannte langfristige Absinken der IgE Konzentration (s. Kap. 1.6) als vermeintlichen Parameter des Therapieerfolgs zu erhalten. Aber selbst bei den klinisch sensitiven Hauttests kann, nach sich einstellenden negativen Befunden, eine Stichprovokation zur systemischen Reaktion führen [33]. Über ein Monitoring einer SIT mittels etablierter diagnostischer Verfahren (Hauttest, BAT, Histamin release) berichtete Brown et.al. , mit dem Ergebnis keinerlei Aussagen

über den Therapieerfolg treffen zu können [11]. Diese Standardverfahren der Laboruntersuchungen könnten wie in der Eingangsdagnostik denkbar, durch die neuen flowcytometrischen Verfahren ergänzt werden - ist es doch von großer Bedeutung, einen verlässlichen und objektiven Parameter zu finden, der den Behandlungserfolg der SIT auszusagen vermag. Allerdings ist aber bei allen Methoden bekannt, dass sie sich zur Beurteilung des Therapieerfolges nach Hyposensibilisierung nicht eignen [22]. Hoffnung ruht noch auf einzelnen hochspezifisch Oberflächen, die zwar in ihrer Rolle bei der allergischen Reaktion nur schwer einzuordnen sind, aber prädiktable Werte bei der Eingangsdagnostik liefern. Eine solche exprimierte Oberfläche, die binnen Minuten nach Allergenkontakt von den basophilen Granulozyten (und nur diesen Blutzellen) ausgeprägt wird, ist die E-NPP3, bekannt als CD 203c.

1.8 CD 203c auf basophilen Granulozyten

Wie in Kapitel 1.4.2. dargestellt ermöglicht die Flowcytometrie eine sensitive Untersuchung mittels Allergie-assoziiertes Marker. Das Review von Boumiza et.al. gibt einen Überblick zu den letzten Entwicklungen im Erkennen der Basophilen Aktivierung via flowcytometrischer Untersuchungen [9], [24]. Eine dieser Oberflächenstrukturen, die – im Gegensatz zu bspw. CD 63 – ausschließlich auf basophilen Blutzellen und ihren Vorläuferzellen sowie auf Zellen der Prostata gefunden wurde, ist das Transmembran- Protein „Ectonukleotid pyrophosphatase/phosphodiesterase 3“ (E-NPP3) [12]. Es gehört zum Cluster CD 203c. Ein von Buehring et. al. entwickelter Monoklonaler Antikörper (MoAk) mit PE Farbstoff „97A6“ ist in der Lage das Protein zu markieren [13]. Nach Untersuchungen von Platz und Binder konnte gezeigt werden, dass es ein geeignetes in-vitro-Diagnostikverfahren bei Insektengiftallergikern ist [78]. Gezeigt wurde auch, dass mit Hilfe des neuen Markers 97A6 die Oberfläche E-NPP3 bei Insektengiftallergikern nach Allergenexposition verstärkt exprimiert wird. Dabei wurde auch die optimale Konzentration und die optimale Stimulationszeit untersucht und dargestellt [5]. In weiterer Folge konnte nachgewiesen werden, dass dieses Verfahren zur Analyse von sensibilisierten Allergikern genutzt werden kann. Die hohe Sensitivität wurde in der Literatur bestätigt [19], [18]. Wie oder ob sich die Exprimierung dieses Proteins auf

Basophilen im Zuge einer Immuntherapie verändert ist bisher nicht untersucht und bekannt. Sollte eine Veränderung eintreten wäre es denkbar, durch Korrelation mit bisherigen Behandlungserfolgsdiagnosen und –erfahrungen, einen Therapiekontrollparameter für SIT an der Hand zu haben.

Da sich die Allergen-assoziierte Oberfläche CD 203c auf Basophilen Granulozyten momentan als der zuverlässigste Parameter bei der Labordiagnostik herausgestellt hat und das nicht-kommerziell erhältliche Verfahren in der Anwendung bekannt, standardisiert und etabliert ist, wäre einer langfristige Verlaufskontrolle der Exprimierung während der Behandlung sinnvoll.

1.9 Zielsetzung der Studie

In der vorliegenden Arbeit wird geprüft,

1.) ob die Hochregulierung des Aktivitätsmarkers CD203c auf allergenstimulierten Basophilen zum Nachweis einer bestehenden Sensibilisierung auf Bienen- und Wespengift als Diagnostikparameter verlässlich ist.

2.) ob im Verlauf der Hyposensibilisierungsbehandlung diese Hochregulierung quantitativ variiert – also verstärkt oder vermindert wird oder auch unverändert bestehen bleibt.

3.) ob somit ein möglicher in-vitro Test zur Kontrolle des Therapieerfolgs entwickelt werden könnte.

Außerdem sollen die Ergebnisse dieser Arbeit zum Besseren Verständnis der Reaktionsmechanismen einer IgE vermittelten allergischen Sofortreaktion beitragen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Standardisierung des Studienprotokolls

Zur Standardisierung des Studienprotokolls, zur Kalibrierung der Einstellung des Flowcytometers, zur Festsetzung der Lage der Gates wurde vor Aufnahme der ersten Studienprobanden eine Pilotstudie durchgeführt um im Studienablauf gleiche Untersuchungsbedingungen zu garantieren. Diese Pilotstudie wurde mit dem Blut von 6 Mitarbeitern des Laboratoriums der Hautklinik durchgeführt, wobei auch 2 Probanden mit bekannter Hymenopteren-Allergie mit eingeschlossen wurden. Diese wurden wie die Studienprobanden auch über Risiken und Umfang der Untersuchung aufgeklärt. Die Präparation richtete sich nach dem Protokoll von Bühring et.al. zur Stimulation und Flowcytometrischen Untersuchung von CD203c auf Basophilen Granulozyten [5]. Der genaue Ablauf wird unter 2.5. näher erläutert werden. Für die Kalibrierung der Messeinstellungen am Flowcytometer wurde ein eigenes Messblatt angelegt und in mehreren Setup-Messungen wurden die Parameter bis zu einer optimalen Diskriminierung der CD 203c positiven und –negativen Basophilen-Populationen justiert. In dieser Darstellung wurden dann die Gates zur späteren Zellzählung im Auswertungsblatt angelegt.

Die Einstellungen, das endgültige Messdatenblatt und das Auswertungsblatt wurden als Vorlage für die weitere Verwendung in der Studie gespeichert.

Das Studienprotokoll zu Patientenaquise und Durchführung wurden der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität am Universitätsklinikum Tübingen, Schleichstrasse 8, 72076 Tübingen, vor Beginn der Untersuchungen vorgelegt und erhielt ein positives Votum.

2.2 Patienten

Die Studienprobanden wurden im Rahmen der an der Universitäts-Hautklinik durchgeführten Hyposensibilisierungsbehandlung von Insektengiftallergikern gewonnen. Die Indikationsstellung zur Therapie einer Schnell-Hyposensibilisierungsbehandlung (Rush-Schema) war bei allen Patienten am Tag der Aufnahme in die Studie bereits gestellt. Alle Patienten wurden stationär aufgenommen und bei dieser Aufnahme über die Möglichkeit zur Teilnahme an

Studie informiert sowie über Studienablauf, -umfang und Risiken aufgeklärt. Danach erfolgte die Unterzeichnung der Einwilligungserklärung. Beide Formulare blieben jeweils ein Mal in Kopie beim Patienten und wurden im Original dem Personaldatenbogen im Case Report Form (CRF) zugeordnet.

Es wurden konform den Anforderungen der Ethikkommission nur volljährige Probanden jeden Geschlechts aufgenommen, die vollständig über die Studie aufgeklärt waren und in die Teilnahme einwilligten.

2.3 Studienprotokoll

Das Blut eines jeden Probanden wurde vor dem Beginn der Hyposensibilisierung, am Tage der Entlassung aus der stationären Initialbehandlung und nach 6-33 Monaten bei fortgeführten Erhaltungsdosen untersucht.

Daraus ergaben sich drei Untersuchungsgruppen:

Baseline (vor Initialtherapie) = Entnahme 1

Follow up (nach Initialtherapie) = Entnahme 2

Recall (6-33 Monate nach Initialtherapie) = Entnahme 3 , 4, ... n

Im Rahmen dieser Aufnahme wurde für den Probanden ein Case Report Form (CRF) zur Erfassung sämtlicher Daten aus Anamnese, Befund und Laboruntersuchung erstellt. Allein der „Personalbogen“ mit persönlichen Grunddaten und Klinik-ID, wurde nach Studienende getrennt von den CRFs zusammen mit den Einwilligungs- und Aufklärungsformularen gelagert wird, da nur über diesen der Studiencode und Name des Probanden zugeordnet werden kann. Die gesamte Datenerfassung erfolgte so in über den Studiencode anonymisierten Studienbögen des CRF.

Im „Aufnahmebogen“ wurde neben Datum der Aufnahme auch das Datum des letzten Stichs und das identifizierte Insekt sowie die nun durchzuführende Behandlung befragt. In Anlehnung an die AWMF-Leitlinie Nr. 061/001 „Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie“ erfolgte zusätzlich

die Erhebung von Wohnraum und beruflicher Tätigkeit sowie die Umstände zum Stichereignis [86].

Von Interesse waren auch weitere bekannte Allergien des Patienten. Die Befunddaten der Diagnose- und Indikationsstellung des Allergielabors wurden ebenfalls übertragen um die Einschlusskriterien zu sichern.

Bei der ersten Entnahme nach Aufklärung und Einwilligung des Probanden wurden im Saugkolbenprinzip 10ml Venenvollblut in ein Lithium-Heparinröhrchen (Monovette®) entnommen.

Datum und Uhrzeit dieser Entnahme wurden in Bogen E-1 notiert und ergänzt durch Datum und Uhrzeit von Beginn und Ende der Laboruntersuchung. Die Blutprobe wurde mit Studiencode, Entnahmedatum und Uhrzeit mittels eines Aufklebers versehen.

Am Ende der standardisierten Behandlung in der Hautklinik Tübingen wurde am Tage der Entlassung (circa 12-14 Stunden nach der letzten Dosis Gift) nochmals in o.g. Weise Blut entnommen und untersucht.

6 bis 33 Monate nach dem Abschluss der stationären Initialbehandlung im Klinikum wurde ein Wiedervorstellungstermin vereinbart, bei dem die Patienten über ihre konsequente Durchführung der Erhaltungsdosen nach Protokoll der Hyposensibilisierungsbehandlung sowie mögliche Stiche seit Abschluss der stationären Behandlung befragt wurden. Nur im Falle einer regulär verlaufenen Erhaltungstherapie wurde nochmals ebenso Blut entnommen und untersucht und die Daten analog zur vorherigen Vorgehensweise in den ReCall-Bögen des CRF dokumentiert. Bei bereits erfolgter Stichprovokation wurde das Ergebnis erfragt.

2.4 Blut

Für jede Untersuchung wurde dem Probanden ein 10ml Lithium-Heparin-Röhrchen (Monovette®) Venenvollblut im Saugkolbenprinzip entnommen.

2.5 Markierung der Basophilen des Patientenserums

Die Untersuchung des Blutes erfolgte, gemäß dem Hinweis zur Anwendung der Erythrozyten-Lyse-Reagenz (Whole Blood Lysing Reagent Kit®) innerhalb von 8

MATERIALIEN UND METHODEN

Stunden nach Abnahme, um eine vollständige Auflösung der Erythrozyten zu ermöglichen. Folgende Reagenzien wurden zur Bearbeitung verwendet:

- PBS with Ca²⁺ , Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, UK
- PBS w/o Ca²⁺ / Mg²⁺ , Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, UK
- EDTA 20mMol , Sigma-Aldrich Chemicals, München, BRD
- Reless® Bienengift – Lsg 1µg/ml, Fa. ALK-Scherax, Hamburg, BRD
- Reless® Wespengift – Lsg 1µg/ml, , Fa. ALK-Scherax, Hamburg, BRD
- Spezifisches Anti-Human-IgE (Dε2) 242µg/ml, , Cat.No. 0277, Immunotech; Marseille, Frankreich
- IOTest® Anti-CD203c-PE (97A6) 200µg/ml-PN IM3575 , Immunotech; Marseille, Frankreich
- Whole Blood Lysing Reagent Kit® (bestehend aus Lyse, Fixative und FACS-PBS), Coulter Corporation, Miami / FL, USA

Zur Bearbeitung waren insbesondere folgende Geräte und Laborausstattung von Bedeutung:

- Flowcytometer: FACS-Calibur (Seriennummer.: E 97500055 / IC: 27 773) von Becton Dickinson, San Jose / CA, USA
- Messcomputer: PowerMac G4 , Apple Computer Int., Cork,Irland
- Analysesoftware: CellQuest Pro Vers. 4.0.2, Becton Dickinson, San Jose / CA, USA

Es wurden 4 Reagenzröhrchen (Falcon®-2053) mit Studiencode und Entnahmenummer (Bsp: B-06 E2) sowie der „Probenqualität“ (siehe Tabelle 3) markiert. Jedes Röhrchen entsprach so einer Probe sowie einem Datensatz.

MATERIALIEN UND METHODEN

Tabelle 3 Beschriftung der Reagenzröhrchen. Die Abkürzungen verschlüsseln die Eigenschaft der Probe bzw. deren Stimulation und resultierende Bedeutung in der Messreihe. Im Datensatz wird durch das standardisierte Messprotokoll jeder Einzelmessung eine spezifische Endung von „001“ bis „004“ angehängt und kann so zurückverfolgt werden.

Markierung	Reagenz / Bedeutung	Datensatz
NEG	PBS (with Ca ²⁺) / Negativkontrolle	001
POS	Anti -IgE – Ak (Dε2) / Positivkontrolle	002
BEE	Standardisiertes rohes Bienengift-Extrakt / Stimulation Bienengift	003
WASP	Standardisiertes Wespengift-Extrakt / Stimulation Wespengift	004

In die Röhrchen wurden steril je 80µl des Probanden-Venenvollblutes pipettiert und je nach Markierung 20µl des entsprechenden Reagenz zugegeben. Danach folgte eine 5 minütige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Nach dieser wurde den Proben zur Markierung der Basophilen-Oberfläche ENPP3 (CD 203c) auf der Sterilbank 20µl des 97A6-PE zugegeben und weitere 10 Minuten unter o.g. Bedingungen inkubiert.

Im Anschluss daran wurde die kalziumabhängige Reaktion der PE-Markierung mit 150µl 20 mM EDTA auf Eis gestoppt. Es erfolgte die Lyse der Erythrozyten mit der Zugabe von je 1ml Lyse-Lösung, welche innerhalb von 2 Minuten mit 125µl des zugehörigen Fixatives versetzt wurde. Daran schloss sich bei Raumtemperatur eine Lyse-Zeit von 20 Minuten an. In dieser Zeit wurde die Gefrierzentrifuge (C4000, Fa.Beckman) auf 4°C temperiert und die Proben daraufhin für 7 Minuten bei 1200 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zentrifugat mit 2ml FACS- PBS gewaschen und nochmals bei gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Zur anschließenden Messung am Flowcytometer erfolgte die Aufmengung des Zentrifugats mit 250µl FACS-PBS des LysingKits.

Die weitere Lagerung der Präparation in den Röhrchen erfolgte auf Eis bis zum Abschluss der Messungen.

2.6 Messung

Die Vorbereitung des Flowcytometers erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers zur Reinhaltung und Qualitätssicherung. Die Proben wurden mit den kalibrierten Einstellungen gemessen und zur Datenverarbeitung dem Messcomputer zugeführt. Jedes Röhrchen erhielt einen genau zugeordneten Datensatz. Im Messprotokoll war folgender Messablauf programmiert: 001 = Negativkontrolle ; 002 = Bienengift ; 003 = Wespengift ; 004 = Positivkontrolle (s. Abbildung 2). Der Dateiname setzte sich aus Studiencode, Entnahme und Probe zusammen (Bsp: B-02-e2.001).

Die Einzelmessung für einen Datensatz endete automatisch nach 150.000 gezählten Zellen. Nach Messung aller 4 Proben endete die Untersuchungsmessung für diesen Patient und diese Entnahme.

2.7 Auswertung

Am Ende der Messungen wurde der Datensatz eines Probanden und einer Entnahme bestehend aus je 4 Einzelmessungen in das standardisierte Auswertungsprotokoll (s. Kap. 2.1) importiert.

Dieses Auswertungsblatt (Analysis and Statistics) enthielt die Darstellung jeder Probe mit einem Gate zur Messung der Basophilen und berechnete die Verteilung der insgesamt gemessenen Zellen im Gate. Dies erreichte man durch die Darstellung von Seitwärtsstreuung (SSC) gegen PE-Fluoreszenzintensität auf FL2 in Form eines Punktdiagramms.

Beispiel für einen dargestellten Datensatz (hier Patient B-18, Entnahme 3) findet sich in Abbildung 2.

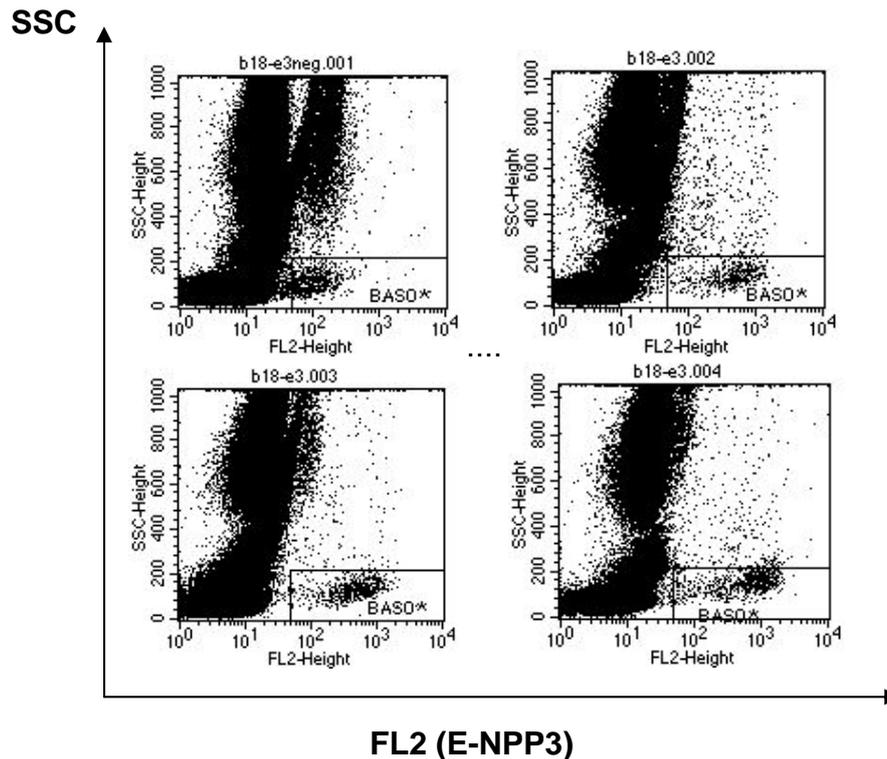


Abbildung 2 CD 203c Expression eines Bienen und Wespengiftallergikers (B-18) bei der Untersuchung 6 Monate nach Ende der Initialtherapie. 80µl des präparierten Blutes mit PBS als Negativkontrolle (oben links), Anti-IgE-Ak als Positivkontrolle (oben rechts) sowie Bienen- und Wespengiftextrakt (unten links und rechts). Gezählte Zellen 150,000 in Darstellung von Seitwärtsstreulicht (SSC) und Fluoreszenz 585/42 (FL2) als Punktdiagramm. Man bemerke die Hochregulierung der Basophilenpopulation der drei Stimulationen im Vergleich zur Negativkontrolle

2.8 Datenerfassung und -verarbeitung

Außerdem wurde die Fluoreszenzintensität der Basophilenpopulation erfasst und deren Verteilung, Median und Mittelwert von der Analysesoftware wie in Abbildung 3 dargestellt.

Die Daten jeder Messung wurden über die Softwareschnittstelle in eine MS Excel Tabelle exportiert und dort gesammelt. Somit konnten mögliche Eingabefehler durch manuelles Übertragen verhindert werden. Zur Erstellung der Master-Datentabelle wurde jeder Messdatensatz mit einer Kennung versehen, die später eine eindeutige Zuordnung zuließ, die sich aus Studiencode, Entnahmenummer und Röhrchen zusammensetzte (zum Beispiel: B18-e1-001 für Patient 18, Entnahme1, PBS-Negativkontrolle).

Die nachfolgenden Datensätze wurden bezüglich der Medianen Fluoreszenzintensitäten aufbereitet. Der Medianwert wurde für jede Messung von der Meß- und Analysesoftware übergeben und war in dem Analyse&Statistics-Blatt des CRF dargestellt. (s.Anlage...)

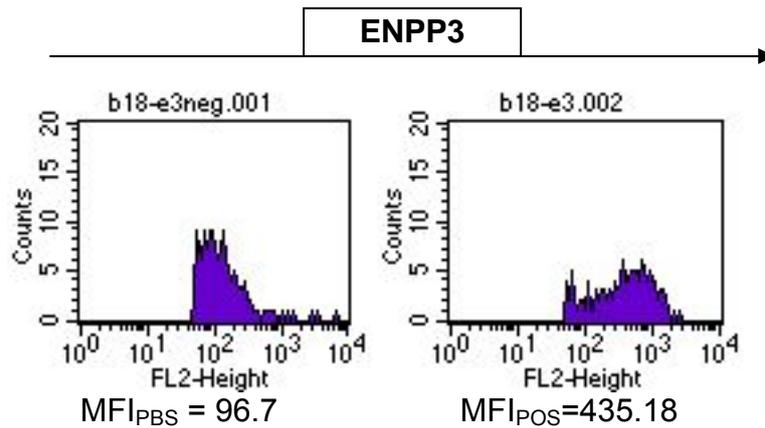


Abbildung 3 Histogramme der PE Fluoreszenzen in der Basophilen-Population. Negativkontrolle mit PBS (links) und Positivkontrolle mit Anti-IgE (rechts) bei Patient B-18 Entnahme 3. Die von der Software errechneten Mediane der Fluoreszenzintensitäten (MFI) sind hier unter den Histogrammen angegeben (s.Tabelle 10 in Kapitel 3)

Die so dargestellte mediane Fluoreszenzintensität (MFI) ist ein Maß für die Expression von CD 203c auf den Oberflächen der Basophilen.

Im Anschluss daran wurde der Datensatzes um den „Stimulationsindex“ (SI) erweitert. Dieser Index dient als Rechengröße zur relativen Darstellung der Modulation von CD-203c-Expression. Für diese Darstellung wurden die erfassten Mediane der Fluoreszenzhistogramme relativiert, indem jede Messung gegen die eigene Negativkontrolle (PBS-Probe [001]) dividiert wurde:

$$\text{Stimulationsindex der Probe (SI}_{\text{Probe}}) = \frac{MFI_{\text{Probe}}}{MFI_{\text{PBS}}}$$

2.9 Statistische Methoden

Zur Auswertung der Rohdaten wurden diese in Tabellen der Statistiksoftware JMP 4.0 (SAS Institut, Heidelberg, BRD) kopiert und damit verarbeitet.

Die Kenngrößen Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) und Stimulationsindex (SI) verhalten sich nach Logarithmieren "hinreichend" normal verteilt. Das rechtfertigt, statistische Tests für unabhängige normalverteilte Stichproben anzuwenden.

Das Ergebnis aller Signifikanzuntersuchungen wurde mit dem Testniveau von 5% (Irrtumswahrscheinlichkeit erster Art $p=0.05$) beurteilt.

Untersucht wurde, ob sich während der Hyposensibilisierungsbehandlung die Fluoreszenzintensität, als Maß der Stimulation der Basophilenpopulation, bei wiederholten Untersuchungen im zeitlichen Verlauf verändert.

Dazu wurden die Stimulationsindices der Untersuchungen mit Dunett's-Test verglichen, wobei Nachuntersuchungen (Follow-Up und Recall) gegen die Baseline geprüft wurden.

Dunett's Test vergleicht nicht jeden einzelnen Mittelwert gegeneinander, sondern die Mittelwerte der Testgruppen gegen eine Kontrollgruppe, soweit die Gruppen, wie in unserem Fall voneinander unabhängig sind. Dabei wird die versuchsbezogene Irrtumswahrscheinlichkeit mit einbezogen, wobei die Basis der Berechnung ein t-Test zwischen den Test- und der Kontrollgruppe ist. Der kritische Wert $|d|$ für das zweiseitige Signifikanzniveau von 5% kann man über die Freiheitsgrade aus einer Dunnett's Tabelle erhalten. Ergebnis ist eine Wertetabelle der Testergebnisse gegen die Kontrollgruppe. Werte, die kleiner als $|d|$ oder negativ sind, weisen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf. Siehe dazu auch die Formel zur Berechnung der Einzelwerte in Abbildung 4.

$$t_d = \frac{M_i - M_c}{\sqrt{\frac{2MSE}{n_h}}}$$

Abbildung 4 Dunnett's Test (t_d) zur Berechnung eines Vergleichswertes zwischen dem Mittelwert der Testgruppe (M_i) und der Kontrollgruppe (M_c) mit Hilfe des quadratischen Vorhersagefehlers (MSE) und dem harmonischen Mittelwert der Messwerte (n_h). *Quelle:* <http://davidmlane.com>

Zur Ermittlung des Grenzwertes für SI, dessen Überschreitung eine positive Stimulation der Basophilen anzeigt wird, wurde mit Hilfe von ROC-Kurven für Wespengift errechnet und betrug 1.23 bei einer maximalen Spezifität von 100% (Konfidenzintervall 87.3 – 100%) und korespondierender Sensitivität von 97,6% (Konfidenzintervall 75.7 – 100%). Dieser Grenzwert wurde für Bienengift übernommen. So war auch eine Darstellung der Häufigkeiten von positiven Reaktionen in der Studienpopulation möglich.

Da die Gruppe der Bienen- und Wespengiftallergiker nur aus 2 Probanden bestand wurden diese keiner eigenen statistischen Auswertung unterzogen. Die Ergebnisse in Bezug auf die Wespengiftallergie dieser Patienten fügten sich statistisch in die der Gruppe der Wespengiftallergiker ein und wurden deshalb abschließend zu vergleichenden Betrachtungen mit in die Gruppe der Wespengiftallergiker integriert.

Auf die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den Parametern der Standarddiagnostik (RAST-Klasse, Mueller-Grad, Hauttest) und den ermittelten SI wurde im Rahmen der Zielsetzung der Studie verzichtet.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Eingangsdiagnostik

Es konnten 19 Patienten mit der Diagnose einer Hymenopterenallergie in die Studie aufgenommen werden. Zwei Patienten fielen aus der Auswertung:

Bei Patientin B-01 konnten durch eine insuffiziente Lyse der Erythrozyten keine korrekte Messung durchgeführt, bzw. die Basophilenpopulation nicht dargestellt und ausgewertet werden und bei Patient B-15 wurde die Hyposensibilisierungstherapie nach 2 Tagen aufgrund zu starker Unverträglichkeit abgebrochen und nicht wieder aufgenommen.

17 Patienten konnten nach erfolgreicher Initialtherapie am Tag der Entlassung, also 12 Stunden nach der letzten erhaltenen Therapiedosis untersucht werden. An einer ersten Nachuntersuchung nach 6 Monaten nahmen 5 Patienten teil, an einer zweiten Nachuntersuchung nach 18-24 Monaten 7 Patienten. Ein Patient nahm sowohl an der Nachuntersuchung nach 6 Monaten als auch an der nach 18-24 Monaten teil.

5 Patienten nahmen an keiner der Nachuntersuchungstermine teil. Gründe hierfür waren: Langer Anfahrtsweg (Patient B-11, B-12), mangelnde Bereitschaft zur Wiedervorstellung aus zeitlichen Gründen (Patient B-05, B-13), Abbruch der Hyposensibilisierung in der Erhaltungsphase (Patient B-07).

Es lagen Daten zur Stichtanamnese, Ergebnissen der Hauttests sowie der spezifischen IgE-Antikörper aus der Allergieambulanz vor.

In Tabelle 4 sind alle eingeschlossenen Patienten und die Ergebnisse der Standarddiagnostik ausgeführt.

ERGEBNISSE

Tabelle 4 Ergebnisse der Standarddiagnostik aller 17 in die Studie aufgenommener Patienten und die Diagnosestellung (Diagnose: B =Bienengiftallergiker, W=Wespengiftallergiker, BW=Bienen und Wespengiftallergiker) sowie der laufende Studiencode (B-02...B-19), Geschlecht (F=weiblich, M=männlich) das Alter (in Jahren), die Schwere der allergischen Reaktion (Mueller-Grad), das Ergebnis des Hauttests (Prick-Test) bei 10^{-1} µg/ml Gift (- = negativ, + = positiv, ++=zweifach positiv), die spezifischen IgE-Antikörper gegen Bienen-/ Wespengift (als RAST-CLASS von 0...6) und die Teilnahme an der Nachuntersuchung (o= nicht erfolgt, x=erfolgt) nach erfolgreicher Initialtherapie.

Patient ID / Code	Geschl.	Alter	Mueller Grad	Hauttest B/W (10 ⁻¹ µg/ml)	RAST-Klasse B/W	Diagnose	6 Monats Nachuntersuchung (o/x)	-24 Monats Nachuntersuchung (o/x)
B-02	M	41	I	-/+	0/3	W	O	X
B-03	F	35	I	-/+	0/3	W	X	O
B-04	M	34	I	+/+	4/3	BW	X	O
B-05	M	35	II	-/++	2/4	W	O	O
B-06	F	62	IV	-/++	0/3	W	X	O
B-07	M	38	III	-/+	0/2	W	O	O
B-08	M	39	II	-/+	0/2	W	X	O
B-09	M	46	I	-/+	1/1	W	X	X
B-10	M	45	III	-/++	0/3	W	O	X
B-11	M	23	II	-/+	3/3	W	O	O
B-12	F	32	III	-/++	2/3	W	O	O
B-13	F	43	III	-/++	0/3	W	O	O
B-14	M	18	II	-/++	0/0	W	O	X
B-16	M	41	III	-/+	0/3	W	O	X
B-17	M	67	I	-/+	4/6	W	O	X
B-18	F	49	II	++/+	2/2	BW	O	X
B-19	M	51	III	-/+	0/4	W	O	X

Zur Voruntersuchung

Alle 18 Patienten wurden im Rahmen von Freizeitaktivitäten von einem Insekt gestochen. 8 von 10 Patienten konnten frühere Stichergebnisse benennen. Diese lagen zwischen 8 Monaten und 10 Jahren zurück und waren anamnestisch in einem Fall mit schweren Lokal- und in keinem Fall mit Allgemeinreaktionen verbunden.

ERGEBNISSE

Zur Nachuntersuchung

Bei 2 der Patienten kam es zu einem weiteren Stichereignis nach 8 und 12 Monaten nach Ende der Initialbehandlung. In einem Fall (B-19) erfolgte eine prophylaktische Einlieferung in das regionale Krankenhaus, in welchem die Patientin ambulant mit Cortison i.v. versorgt worden sei und sogleich Linderung erfuhr. Bei Patient B-11 kam es durch seine Hobbytätigkeit als Imker zu mehreren Stichen, welche nur von leichten Lokalreaktionen begleitet gewesen sein sollen.

Die 5 Frauen und 12 Männer verteilten sich wie in Tabelle 5 gezeigt in der Studienpopulation.

Tabelle 5 Häufigkeitsverteilung des Geschlechtes Männlich und Weiblich in der Studiengruppe, getrennt nach Diagnose Wespengiftallergie (W) sowie Bienen- und Wespengiftallergie (BW)

Geschlecht	Therapie		Gesamt
	BW	W	
Weiblich	1	4	5
Männlich	1	11	12
Summe	2	15	17

Die Altersstruktur der Männer lag zwischen 18 und 67 Jahren (MW 40, Median 40) und die der Frauen zwischen 32 und 62 Jahren (MW 44; Median 43). Beide Geschlechter zusammen betrachtet war die Population im Mittel und Median 41 Jahre alt und das Alter normalverteilt.

3.1.1 Allergenspezifische IgE-Antikörper (CAP-RAST-Test) im Serum

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen (vgl. Tabelle 4 Spalte 6) zeigen bei 13 von 14 als Wespengiftallergikern klassifizierten Probanden spezifische Antikörper gegen Wespengift auf. Bei B-14 war die RAST-Klasse gegen beide Gifte „0“, allerdings lag bei diesem Probanden ein zweifach-

ERGEBNISSE

positiver Hauttest (s. Kap. 3.1.2.) vor. 10 der 15 Wespengiftallergiker hatten keine (Klasse 0) oder sehr wenig (Klasse 1) Antikörper gegen Bienengifte. Die beiden Patienten mit Bienen- und Wespengiftallergie haben RAST-Klassen zwischen 2 und 4 gegen beide Gifte. außerdem hatten diese spezifische IgE-Antikörper gegen beide Gifte und reagierten in den Hauttests ebenfalls positiv (Tabelle 6).

Tabelle 6 Die RAST-Klassen für spezifische Antikörper gegen Bienen- und Wespengifte.

(Bienen/Wespengift) getrennt nach Diagnose Wespengiftallergie (W) sowie Bienen- und Wespengiftallergie (BW)

Allergie	RAST-CLASS gegen Bienen-/ Wespengift							
	0	1	2	3	4	5	6	Gesamt
BW (n=2)	0/0	0/0	1/1	0/1	1/0	0/0	0/0	2/2
W (n=15)	9/1	1/1	3/2	1/8	1/2	0/0	0/1	15/15
Summe	9/1	1/1	4/3	1/9	2/2	0/0	0/1	17=17

3.1.2 Hauttests mit standardisierten Insektengiften

Alle 15 Wespengiftallergiker reagierten im Hauttest positiv auf Wespengift, keiner von ihnen positiv auf Bienengift.

Die 2 Probanden mit Bienen- und Wespengiftallergie reagierten jeweils positiv auf die getrennte Bienen- und Wespengiftinjektion.

3.1.3 Schweregrad der allergischen Reaktion in der Studiengruppe

Von 17 Probanden zeigten 7 schwere (Grad III) bis sehr schwere (Grad IV) Systemische Reaktionen auf ein Stichereignis. Alle diese Patienten waren Wespengiftallergiker mit entsprechender Anamnese. Die weiteren 8 Wespengiftallergiker zeigten in Folge eines Stiches nur leichte (Grad I) bis mittelschwere (Grad II) Reaktionen. Die beiden Bienen- und Wespengiftallergiker zeigten erlitten Reaktionen von Grad I beziehungsweise Grad II. (Tabelle 7)

Tabelle 7 Schweregrad der allergischen Reaktionen der verschiedenen Allergikergruppen. Es wurde die Klassifikation nach „Mueller“ verwendet. Im Falle einer klinisch gemittelten Einschätzung des Schweregrades (z.B. I-II) wurde der Patient dem höheren Allergiegrad zugeordnet.

Diagnose	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV	Gesamt
Wespen Giftallergie	4	4	6	1	15
Bienen+Wespen Giftallergie	1	1	0	0	2
Summe	5	5	6	1	17

3.2 Flowcytometrische Untersuchungen der CD 203 Expression auf Basophilen Granulozyten

3.2.1 Ergebnisse der Voruntersuchung (Baseline)

Bei 17 Patienten wurde vor deren Hyposensibilisierungsbehandlung nach einem „Rush-Protokoll“ unter stationären Bedingungen der Basophilenaktivationsmarker CD203c untersucht.

Die Expression von CD203c in der Negativkontrolle mit PBS (NEG), also ohne Allergenstimulation, wurde dargestellt mittels der medianen Fluoreszenzintensität (MFI). Die Werte hierfür sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 jeweils in Spalte 2 zu finden. Die MFI_{NEG} ist Grundlage zur Berechnung des Stimulationsindex (SI) der Allergene ($SI = MFI_{NEG} : MFI_{WASP/BEE}$, siehe Kapitel 2.3.4). Die Messung der medianen Fluoreszenzintensität in der Negativkontrolle (MFI_{NEG}) bei den 15 Wespen Giftallergiker ergab Werte von 38.2 bis 171.54 (MW: 97.01). Die 2 Bienen- und Wespen Giftallergiker hatten eine MFI_{NEG} von 73.68 und 198.43 (MW 136.04).

Die geometrischen Mittelwerte der 2 Allergikergruppen zeigen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich miteinander.

3.2.1.1 Allergeninduzierte Hochregulierung CD 203c bei Wespengiftallergikern

Die MFI nach Stimulation mit Reless Wespengift 100µg/ml (WASP) ergaben Werte von MFI_{WASP} 58.3 bis 1134.2 (MW 472.22 ± SD 343.6, Median 410.5) mit Stimulationsindices SI_{WASP} von 0.96 bis 14.6 (MW 4.9 ± SD 3.8, Median 4.7). Siehe *Tabelle 8* Spalte 5

Dem gegenüber stehen in der Positivkontrolle mit spez. IgE Antikörper Dε2 Werte für MFI_{POS} von 42.9 bis 1104 (MW 520.96 ± SD 369.7, Median 468.8) mit Stimulationsindices von SI_{POS} gleich 0.94 bis 15.13 (MW 5.7 ± SD 4.7, Median 4.6). Siehe *Tabelle 8* Spalte 3

Die Reaktionen auf rohe Bienengifte von Reless (BEE) in Konzentration 100µg/ml ergab bei der Wespengiftallergikergruppe MFI_{BEE} Werte von 41.05 bis 276.32 (MW 124.77 ± SD 55.47, Median 109.41) mit korrespondierenden SI_{BEE} von 0.79 bis 1.86 (MW 1.27 ± SD 0.29, Median 1.25). Siehe *Tabelle 8* Spalte 4

Dabei zeigte sich, dass der Marker in allen Fällen, bis auf Patient B-06, mit der Diagnose aus den Standardbefunden korrespondierte. Bei B-02 fiel die Positivkontrolle geringer aus als die durch Wespengift. Bei 6 Patienten war eine positive Stimulation ($SI > 1.3$) auf Bienengift zu verzeichnen. Allerdings sind diese im geometrischen Mittel bei 1.56, also 0.26 über dem Stimulationsgrenzwert von 1.3, so statistisch signifikant näher an der Negativgruppe.

ERGEBNISSE

Tabelle 8 Baseline der Wespengiftallergiker: Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) und Stimulationsindex der 97A6-positiven Zellen nach Inkubation mit PBS (Negativkontrolle=NEG), Anti-IgE-Ab Dε2 10µg/ml (Positivkontrolle = POS), Reless Bienengift 100µg/ml (BEE) und Reless Wespengift 100µg/ml (WASP) sowie Markierung mit CD203c-PE. Positive Reaktionen in Bezug auf den Stimulationsindex (SI>1.3) sind grau unterlegt. Zur Berechnung und Methode s. Kapitel 2.3.4

Patient (W)	Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) / Stimulationsindex (SI)			
	NEG	POS	BEE	WASP
B-02-e1	38.20 / 1	42.94 / 1.12	41.05 / 1.07	58.29 / 1.53
B-03-e1	122.98 / 1	222.67 / 1.81	129.8 / 1.06	615.27 / 5.00
B-05-e1	77.74 / 1	1094.11 / 14.07	119.71 / 1.54	1134.19 / 14.59
B-06-e1	91.4 / 1	85.82 / 0.94	85.82 / 0.94	87.38 / 0.96
B-07-e1	88.17 / 1	406.79 / 4.61	164 / 1.86	410.47 / 4.66
B-08-e1	91.81 / 1	1055.45 / 11.50	109.41 / 1.19	831.61 / 9.06
B-09-e1	171.54 / 1	567.42 / 3.31	276.32 / 1.61	956.02 / 5.57
B-10-e1	72.99 / 1	1104 / 15.13	108.43 / 1.49	532.8 / 7.30
B-11-e1	104.6 / 1	210.97 / 2.02	130.97 / 1.25	161.08 / 1.54
B-12-e1	89.77/1	633.40 / 7.06	112.85 / 1.26	759.73 / 8.46
B-13-e1	88.17/1	743.18 / 8.43	91.4 / 1.04	339.82 / 3.85
B-14-e1	93.47/1	468.77 / 5.02	102.90 / 1.10	124.54 / 1.33
B-16-e1	110.62/1	782.33 / 7.07	87.34 / 0.79	655.43 / 5.93
B-17-e1	79.99/1	207.22 / 2.59	108.90 / 1.36	127.40 / 1.59
B-19-e1	133.7/1	189.39 / 1.42	202.65 / 1.52	289.33 / 2.16

ERGEBNISSE

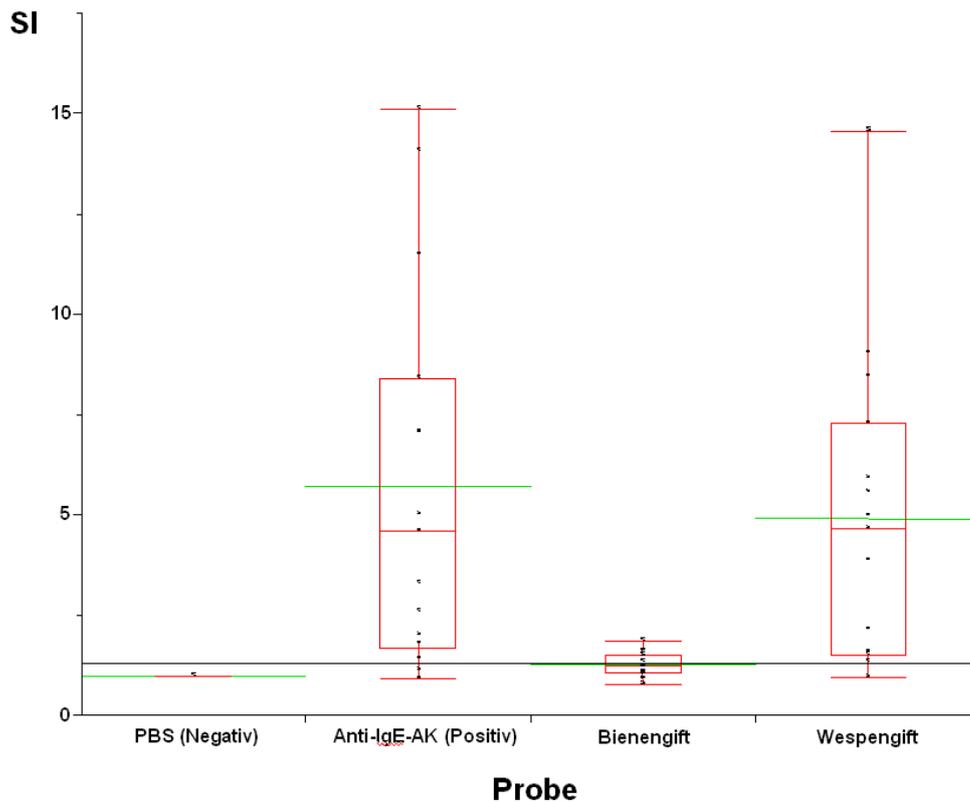
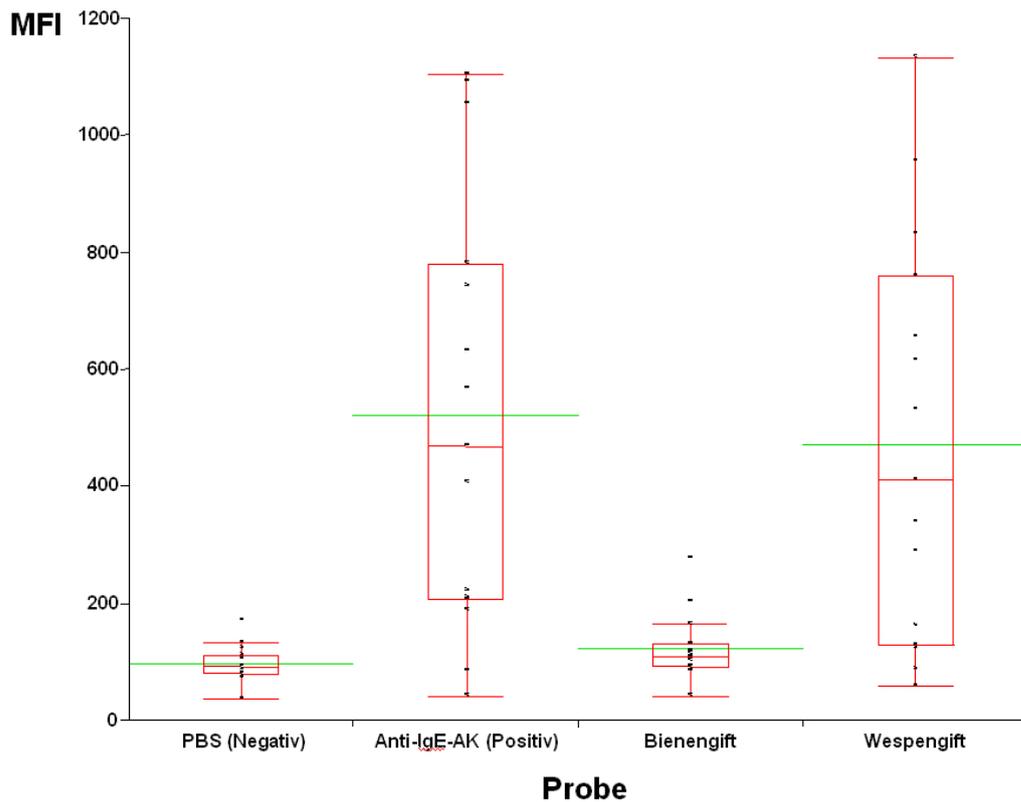


Abbildung 5 Verteilung der MFI-Werte der basophilen Granulozyten (oben) sowie der errechneten Stimulationsindices SI (unten) bei den 15 Wespengiftallergikern nach vorheriger Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder Bienen- und Wespengift. Für jedes Stimulans sind im Balken des Werteintervalls von 25% bis zur 75% Perzentile der Median (durchgezogene Linie) sowie das Maximum und Minimum dargestellt. Im unteren Diagramm ist der Schwellenwert zur positiven Stimulation von $SI=1.3$ eingezeichnet (dicke durchgezogene Linie)

ERGEBNISSE

3.1.2.2 Allergeninduzierte Hochregulierung CD203c bei Bienen- und Wespengiftallergiker

Die MFI nach Stimulation mit Reless Wespengift 100µg/ml (WASP) ergab eine MFI_{WASP} von 181.6 und 330.77 (MW 255.92 ± SD 105.9, Median 255.92) mit Stimulationsindices SI_{WASP} von 1.07 und 4.9 (MW 2.8 ± SD 2.4, Median 2.8), siehe *Tabelle 9* Spalte 5.

Dem gegenüber stehen in der Positivkontrolle mit spez. IgE Antikörper Dε2 Werte für MFI_{POS} von 327.81 und 842.91 (MW 585.36 ± SD 364.23) mit Stimulationsindices von SI_{POS} gleich 4.45 und 4.98 (MW 4.71 ± SD 0.37), siehe *Tabelle 9* Spalte 3.

Die Reaktionen auf Bienengifte von Reless (BEE) in Konzentration 100µg/ml ergab bei der Bienen- und Wespengiftallergikergruppe MFI_{BEE} Werte von 41.05 und 261.80 und 258.66 (MW 310.23 ± SD 68.49) mit korrespondierenden SI_{BEE} von 2.12 und 3.55 (MW 2.84 ± SD 1.01), siehe *Tabelle 9* Spalte 4.

Dabei zeigte sich, dass der Marker in allen Fällen mit der Diagnose aus den Standardbefunden korrespondierte.

Tabelle 9 Bienen-und Wespengiftallergiker: Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) und Stimulationsindex der 97A6-positiven Zellen nach Inkubation mit PBS (Negativkontrolle=NEG), Anti-IgE-Ab Dε2 10µg/ml (Positivkontrolle = POS), Reless Bienengift 100µg/ml (BEE) und Reless Wespengift 100µg/ml (WASP) sowie Markierung mit CD203c-PE. Positive Reaktionen in Bezug auf den Stimulationsindex ($SI > 1.3$) sind grau unterlegt. Zur Berechnung und Methode s. Kapitel 2.3.4

Patient (BW)	Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) / Stimulationsindex (SI)			
	NEG	POS	BEE	WASP
B-04-e1	73.65 / 1	327.81 / 4.45	261.8 / 3.56	330.77 / 4.49
B-18-e1	198.4 / 1	1344.7 / 6.78	568.92 / 2.87	497.34 / 2.51

ERGEBNISSE

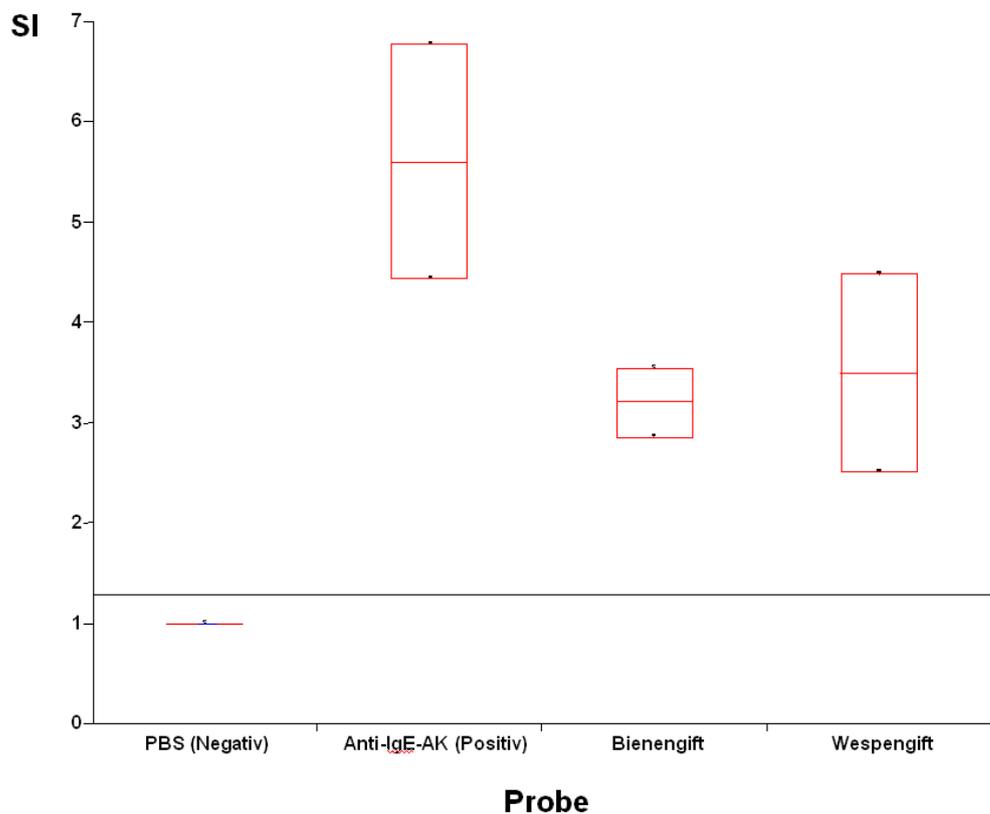
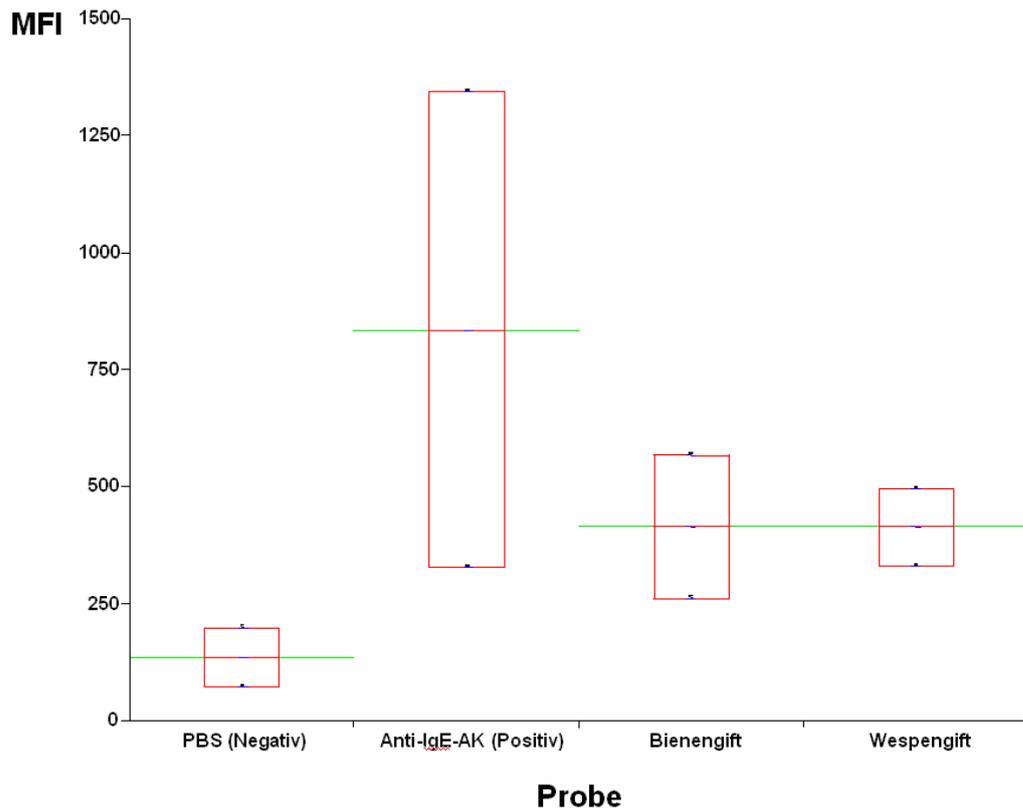


Abbildung 6 Verteilung der MFI-Werte der basophilen Granulozyten (oben) sowie der errechneten Stimulationsindices SI (unten) bei den 2 Bienen- und Wespengiftallergikern nach vorheriger Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder Bienen- und Wespengift. Für jedes Stimulans sind im Balken des Werteintervalls von 25% bis zur 75% Perzentile der Median (durchgezogene Linie) sowie das Maximum und Minimum dargestellt. Im unteren Diagramm ist der Schwellenwert zur positiven Stimulation von $SI=1.3$ eingezeichnet (dicke durchgezogene Linie)

ERGEBNISSE

3.2.2 Ergebnisse nach Initialtherapie (Follow up)

3.2.1.1 *Allergeninduzierte Hochregulierung CD203c bei Wespengiftallergikern*

Insgesamt konnten 14 Probanden der 15 Wespengiftallergiker einer Untersuchung des Basophilenparameters nach erfolgreicher Initialbehandlung unterzogen werden. Diese Untersuchung erfolgte bei allen Probanden 3 Tage nach der Baseline. Patient B-17 konnte nicht nachuntersucht werden, da die Initialtherapie nach 5 Tagen abgebrochen werden musste und zu späterem Zeitpunkt begonnen wurde. Aufgrund dieser Tatsache wurde er in der Studiengruppe belassen und ebenfalls in das Follow up nach 22 Monaten mit einbezogen.

Die MFI der Negativkontrollen schwankten zwischen 71.69 und 315.67 (MW 139.37 \pm SD 64.27, Median 123.26), siehe Tabelle 10 Spalte 2.

Nach Stimulation mit Reless-Wespengift stellten sich MFI_{WASP} von 104.6 bis 1207.9 (MW 550.19 \pm SD 356.55, Median 481.1) bei korrespondierenden SI_{WASP} von 1.17 bis 9.82 (MW 4.13 \pm 2.85, Median 3.82) dar, siehe Tabelle 10 Spalte 5. Nur B-12 blieb im Stimulationsindex für Wespen wie auch Bienengift unter 1.3 und somit weitab der Positivkontrolle mit Anti-IgE-Antikörper. Bei der Stimulation mit Bienengift reagierte genau die Hälfte der Wespengiftallergiker mit einer erhöhten MFI. Insgesamt variierten die MFI_{BEE} von 47.4 bis 482.61 (MW 198.7 \pm SD 110.74, Median 182.22) .

Gleichfalls erhielten die Stimulationsindices Werte von 0.4 bis 3.9 (MW 1.63 \pm SD 1.04, Median 1.53), siehe Tabelle 10 Spalte 4.

Somit waren trotz 8 erhöhter Werte für $SI_{BEE} > 1.3$ die Bienengiftstimulationen signifikant unter der Positivkontrolle sowie der Wespengiftstimulation.

Die Positivkontrolle bewegte sich mit MFI_{POS} Werten von 113.4 bis 1345.6 (MW 626.34 \pm SD 379.18, Median 565.4) und Stimulationsindices SI_{POS} von 1.08 bis 10.37 (MW 4.72 \pm SD 2.88, Median 4.4). Siehe Tabelle 10 Spalte 3. Bei B-05 und B-06 konnte trotz Reaktion von CD203c auf Bienen- und Wespengift keine signifikante Stimulation durch die Positivkontrolle erfolgen ($SI < 1.3$)

ERGEBNISSE

Tabelle 10 FollowUp der Wespengiftallergiker: Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) und Stimulationsindex der 97A6-positiven Zellen nach Inkubation mit PBS (Negativkontrolle=NEG), Anti-IgE-Ab Dε2 10µg/ml (Positivkontrolle = POS), Reless Bienengift 100µg/ml (BEE) und Reless Wespengift 100µg/ml (WASP) sowie Markierung mit CD203c-PE. Positive Reaktionen in Bezug auf den Stimulationsindex (SI>1.3) sind grau unterlegt. Zur Berechnung und Methode s. Kapitel 2.3.4

Patient (W)	Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) / Stimulationsindex (SI)			
	NEG	POS	BEE	WASP
B-02	171.54 / 1	567.42 / 3.308	276.32 / 1.611	956.02 / 5.573
B-03	85.82 / 1	176.24 / 2.054	278.81 / 3.249	371.8 / 4.332
B-05	122.98 / 1	132.16 / 1.075	241.44 / 1.963	1207.9 / 9.822
B-06	103.66 / 1	113.42 / 1.094	181.06 / 1.747	139.49 / 1.346
B-07	71.69 / 1	743.18 / 10.367	121.88 / 1.7	104.6 / 1.459
B-08	130.39 / 1	1345.57 / 10.32	189.38 / 1.452	378.55 / 2.903
B-09	117.57 / 1	469.76 / 3.996	47.4 / 0.403	673.17 / 5.726
B-10	230.82 / 1	1298.02 / 5.624	102.74 / 0.445	991.05 / 4.294
B-11	123.54 / 1	491.37 / 3.977	482.61 / 3.907	414.18 / 3.353
B-12	102.42 / 1	563.29 / 5.5	113.02 / 1.103	119.67 / 1.168
B-13	94.75 / 1	504.81 / 5.328	252.55 / 2.665	930.57 / 9.821
B-14	145.76 / 1	897.3 / 6.156	136.22 / 0.935	289.25 / 1.984
B-16	134.6 / 1	643.88 / 4.784	104.22 / 0.774	578.35 / 4.297
B-19	315.67	822.3 / 2.605	254.2 / 0.805	548 / 1.736

Dabei zeigte sich, dass der Marker in allen Fällen, bis auf Patient B-06, mit der Diagnose aus den Standardbefunden korrespondierte. Bei B-02 fiel die Stimulation mit spez. anti-IgE (Positivkontrolle) geringer aus als die durch Wespengift.

ERGEBNISSE

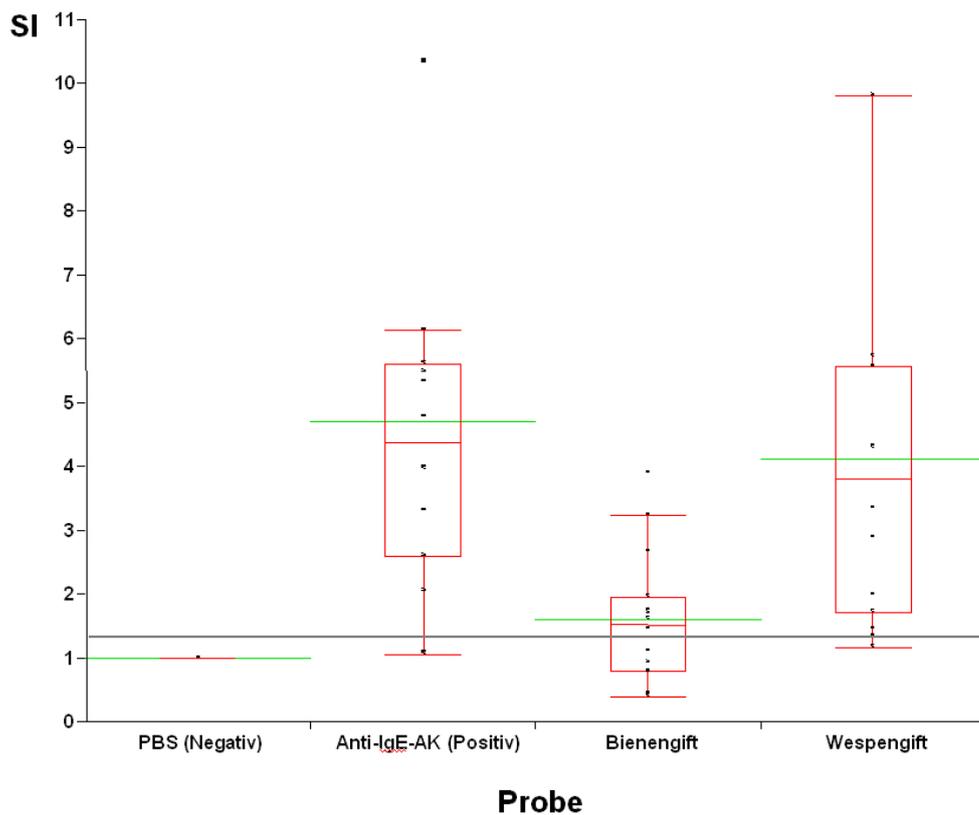
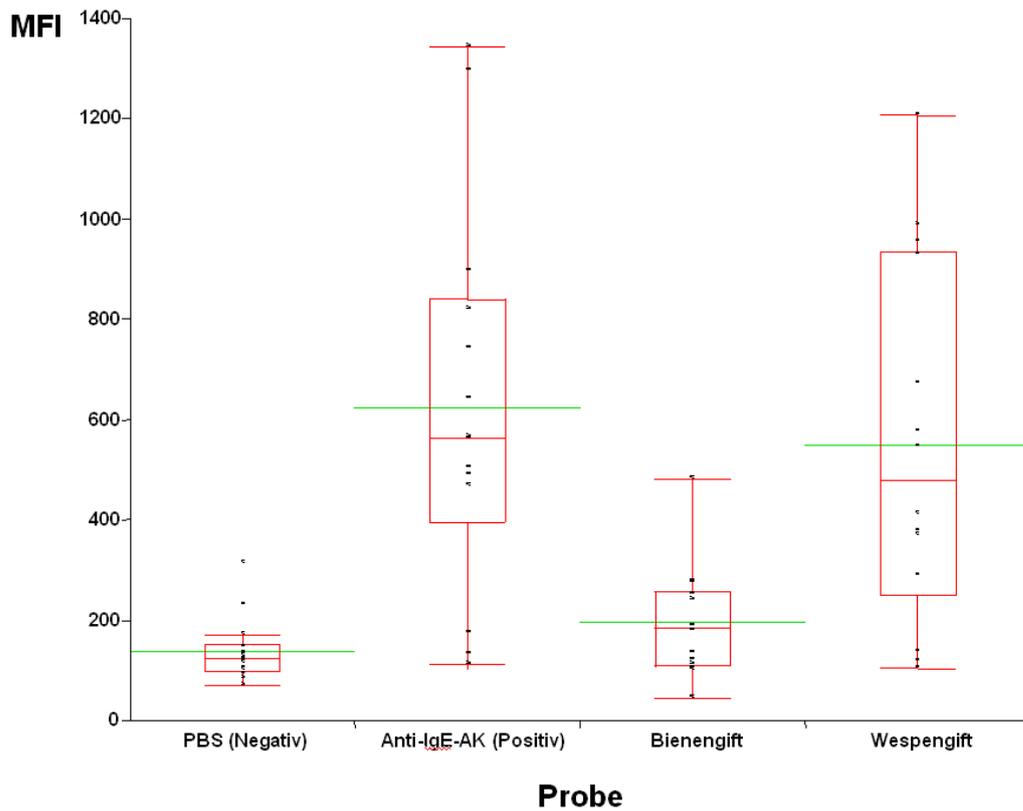


Abbildung 7 Verteilung der MFI-Werte der basophilen Granulozyten (oben) sowie der errechneten Stimationsindices SI (unten) bei den 14 Wespengiftallergikern am Tag des erfolgreichen Abschlusses der Initialtherapie nach vorheriger Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder Bienen- und Wespengift. Für jedes Stimulans sind im Balken des Werteintervalls von 25% bis zur 75% Perzentile der Median (durchgezogene Linie) sowie das Maximum und Minimum dargestellt. Im unteren Diagramm ist der Schwellenwert zur positiven Stimulation von SI=1.3 eingezeichnet (dicke durchgezogene Linie)

ERGEBNISSE

3.2.1.2 Allergeninduzierte Hochregulierung CD203c bei Bienen und Wespengiftallergikern

Die 2 Probanden, welche gegen Bienen- und Wespengiftallergie behandelt wurden sind zeigten in Positivkontrolle, sowie Bienen- und Wespengiftstimulation SI-Werte über 1.3. Die Aufführung der Werte sind in Tabelle 11 Spalte 1-4 zu finden, die geometrischen Mittelwerte der der MFI und SI lagen für MFI_{POS} bei 192.6 ($\pm SD$ 71.6) und SI_{POS} bei 2.1 ($\pm SD$ 1.2) , für MFI_{BEE} **233.8** ($\pm SD$ 145.6) und SI_{BEE} 2.3 ($\pm SD$ 0.9), für MFI_{WASP} bei 387.3 ($\pm SD$ 153.4) und SI_{WASP} bei 3.9 ($\pm SD$ 0.7).

Tabelle 11 FollowUp der Bienen- und Wespengiftallergiker: Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) und Stimulationsindex der 97A6-positiven Zellen nach Inkubation mit PBS (Negativkontrolle= NEG), Anti-IgE-Ab D ϵ 2 10 μ g/ml (Positivkontrolle = POS), Reless Bienengift 100 μ g/ml (BEE) und Reless Wespengift 100 μ g/ml (WASP) sowie Markierung mit CD203c-PE. Positive Reaktionen in Bezug auf den Stimulationsindex (SI>1.3) sind grau unterlegt. Zur Berechnung und Methode s. Kapitel 2.3.4

Patient	Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) / Stimulationsindex (SI)			
	NEG	POS	BEE	WASP
B-04	112.91 / 1	142.02 / 1.3	336.78 / 2.9	495.8 / 4.4
B-18	83.32 / 1	243.21 / 2.9	130.82 / 1.6	278.84 / 3.3

ERGEBNISSE

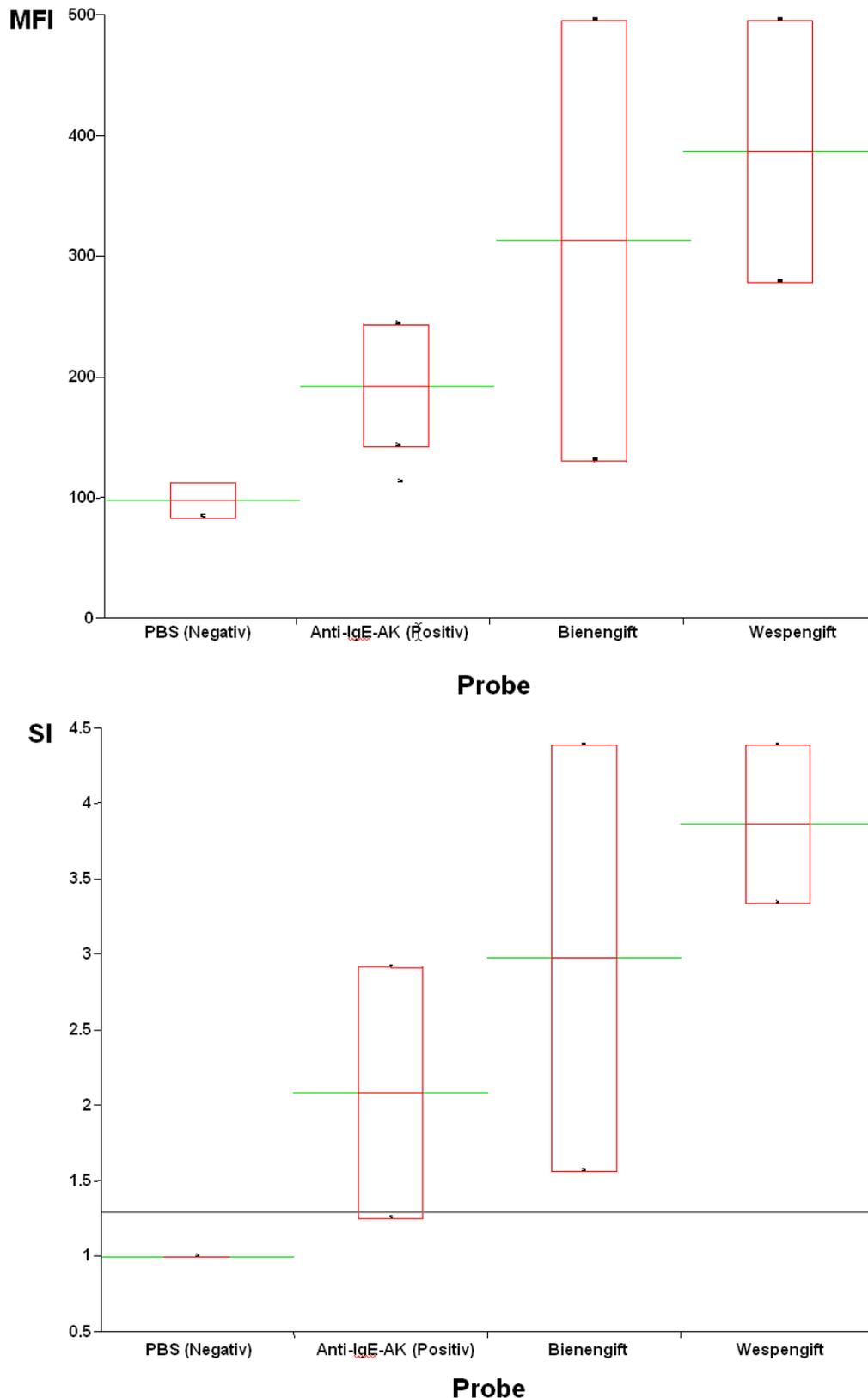


Abbildung 8 Ergebnisse der Nachuntersuchung: Verteilung der MFI-Werte der basophilen Granulozyten (oben) sowie der errechneten Stimulationsindices SI (unten) bei den 2 Bienen- und Wespengiftallergiker am Tag des erfolgreichen Abschlusses der Initialtherapie nach vorheriger Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder Bienen- und Wespengift. Für jedes Stimulans sind im Balken des Werteintervalls von 25% bis zur 75% Perzentile der Median (durchgezogene Linie) sowie das Maximum und Minimum dargestellt. Im unteren Diagramm ist der Schwellenwert zur positiven Stimulation von SI=1.3 eingezeichnet (dicke durchgezogene Linie)

3.2.2 Ergebnisse der Nachuntersuchung (Recall)

Nach 6 Monaten wurden 5 Patienten, nach 22-33 Monaten nochmals 8 Patienten nachuntersucht (Tabelle 12, Spalte 8 und 9). Patient B-09 wurde als einziger zwei Mal nachuntersucht. Seine letzte Nachuntersuchung wurde 33 Monate nach der erfolgreichen Initialtherapie durchgeführt.

Die MFI nach Stimulation mit Reless Wespengift 100µg/ml (WASP) ergab Werte für MFI_{WASP} von 176.2 bis 1142.3 (MW 437.50 ± SD 283.39, Median 296.9) mit Stimulationsindices SI_{WASP} von 1.55 bis 6.23 (MW 3.8 ± SD 1.72, Median 4.2), siehe Tabelle 12 Spalte 5.

Dem gegenüber stehen in der Positivkontrolle (POS) mit spez. IgE Antikörper $D_{\epsilon 2}$ Werte für MFI_{POS} von 136.4 bis 1398.2 (MW 512.53 ± SD 350.64, Median 453.2) mit Stimulationsindices von SI_{POS} gleich 1.55 bis 7.60 (MW 4.4 ± SD 2.0, Median 3.6), siehe Tabelle 12 Spalte 3.

Die Reaktionen auf Bienengifte von Reless (BEE) in Konzentration 100µg/ml ergab bei der Wespengiftallergikergruppe MFI_{BEE} Werte von 83.54 bis 204.78 (MW 134.34 ± SD 39.14, Median 135.77) mit korrespondierenden SI_{BEE} von 0.98 bis 1.50 (MW 1.19 ± SD 0.18, Median 1.15), siehe Tabelle 12 Spalte 4.

ERGEBNISSE

Tabelle 12 Recall der Wespengiftallergiker: Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) und Stimulationsindex der 97A6-positiven Zellen nach Inkubation mit PBS (Negativkontrolle=NEG), Anti-IgE-Ab Dε2 10µg/ml (Positivkontrolle = POS), Reless Bienengift 100µg/ml (BEE) und Reless Wespengift 100µg/ml (WASP) sowie Markierung mit CD203c-PE. Positive Reaktionen in Bezug auf den Stimulationsindex (SI>1.3) sind grau unterlegt. Zur Berechnung und Methode siehe Kapitel 2.3.4

Patient (W)	Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) / Stimulationsindex (SI)			
	NEG	POS	BEE	WASP
B-02-e3	59.35 / 1	136.38 / 2.298	83.54 / 1.408	250.29 / 4.217
B-03-e3	135.77 / 1	486.97 / 3.587	173.09 / 1.275	210.97 / 1.554
B-06-e3	108.43 / 1	743.18 / 6.854	109.41 / 1.009	542.47 / 5.003
B-08-e3	183.9 / 1	1398.22 / 7.603	204.78 / 1.114	1142.25 / 6.211
B-09-e3	106.5 / 1	691.58 / 6.494	135.77 / 1.275	572.55 / 5.376
B-09-e4	103.66 / 1	371.8 / 3.587	155.38 / 1.499	296.93 / 2.864
B-10-e3	112.4 / 1	567.42 / 5.048	113.42 / 1.009	667.14 / 5.935
B-14-e3	88.57 / 1	316.23 / 3.57	86.6 / 0.978	176.24 / 1.99
B-16-e3	87.38 / 1	453.16 / 5.186	99.1 / 1.134	385.42 / 4.411
B-17-e3	161.08 / 1	250.29 / 1.554	165.48 / 1.027	271.39 / 1.685
B-19-e3	110.4 / 1	222.67 / 2.017	151.25 / 1.37	296.93 / 2.69

ERGEBNISSE

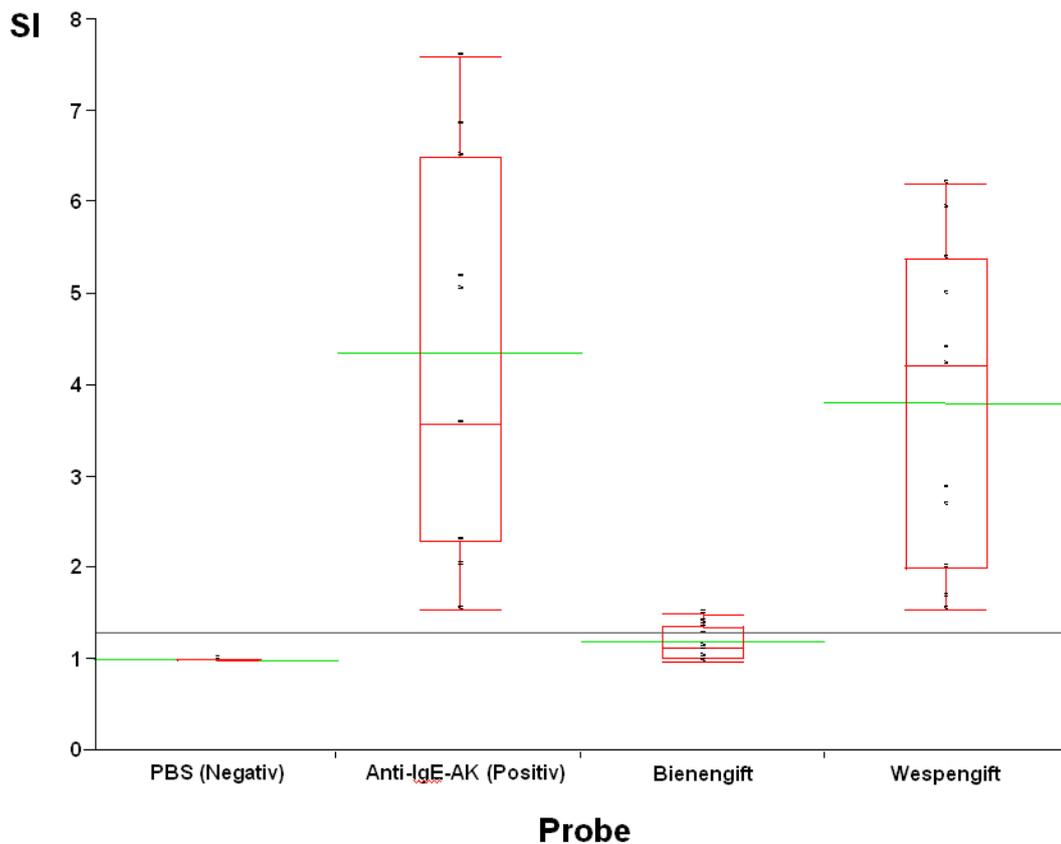
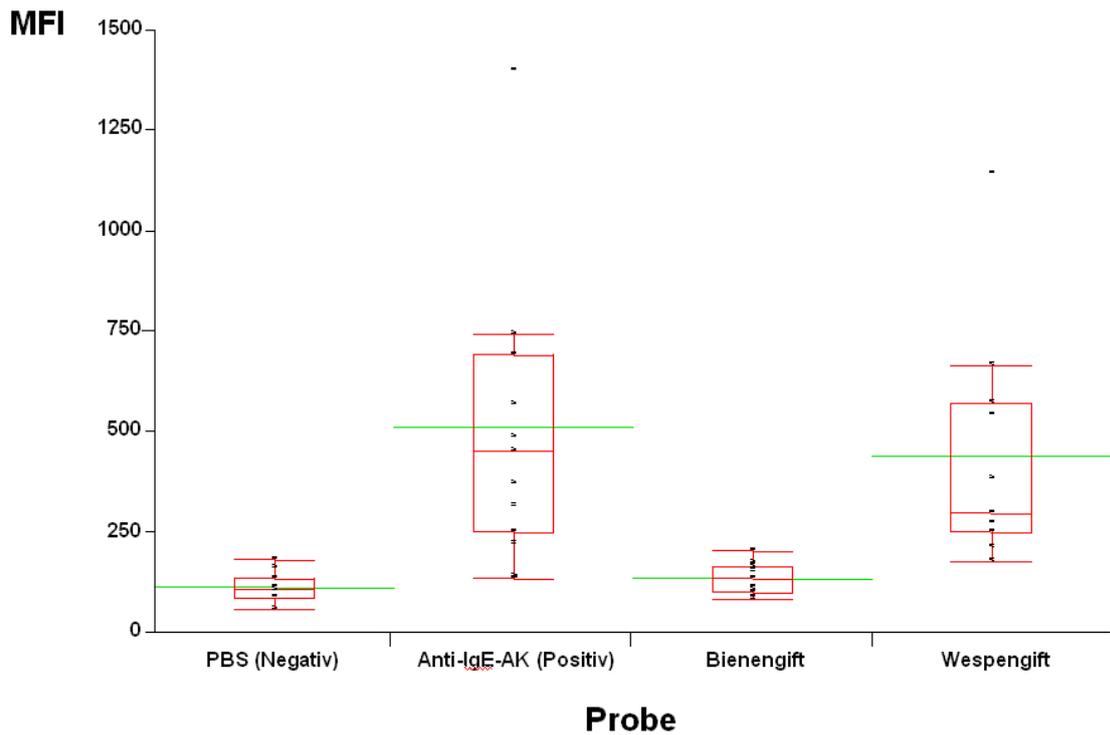


Abbildung 9 Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen (Recall): Verteilung der MFI-Werte der basophilen Granulozyten (oben) und der errechneten Stimulationsindices SI (unten) bei den 13 Wespengiftallergikern zum Kontrolltermin (Entnahme 3) bei fortgeführten Erhaltungsdosen. Nach vorheriger Stimulation mit PBS, Anti-IgE-Antikörper oder Bienen- und Wespengift. Für jedes Stimulans sind im Balken des Werteintervalls von 25% bis zur 75% Perzentile der Median (durchgezogene Linie) sowie das Maximum und Minimum dargestellt. Im unteren Diagramm ist der Schwellenwert zur positiven Stimulation von $SI=1.3$ eingezeichnet (dicke durchgezogene Linie)

3.3 Ergebnisse des Vergleichs der Untersuchungen

Es folgen die Ergebnisse der statistischen Auswertung zu den verschiedenen Untersuchungen, beschränkt auf die Gruppe der Wespengiftallergiker, da nur in sie genügend Datensätze für statistische Beurteilungen liefert. Verglichen wurden Stimulationsindices der Positiv-, Bienen- und Wespengiftstimulationen. Den dazu verwendeten Dunnett's-Test beschreibt der Abschnitt „Statistische Methoden“ in Kapitel 2.9. Getestet wurde unter $\alpha=0.05$, Diesem Testniveau entspricht einem Dunnett-Wert von $|d|=2.305$, der zusätzlich den/die Freiheitsgrad/e (FG=37) berücksichtigt, also vom Umfang (n=40) der Stichprobe abhängt.

3.3.1 Vergleich der Stimulationsindices der Positivkontrollen

Der Vergleich der Anti-IgE-Inkubation (Positivkontrolle) zu allen Entnahmezeitpunkten liefert nur negative Dunnetts-Testwerte „d“.

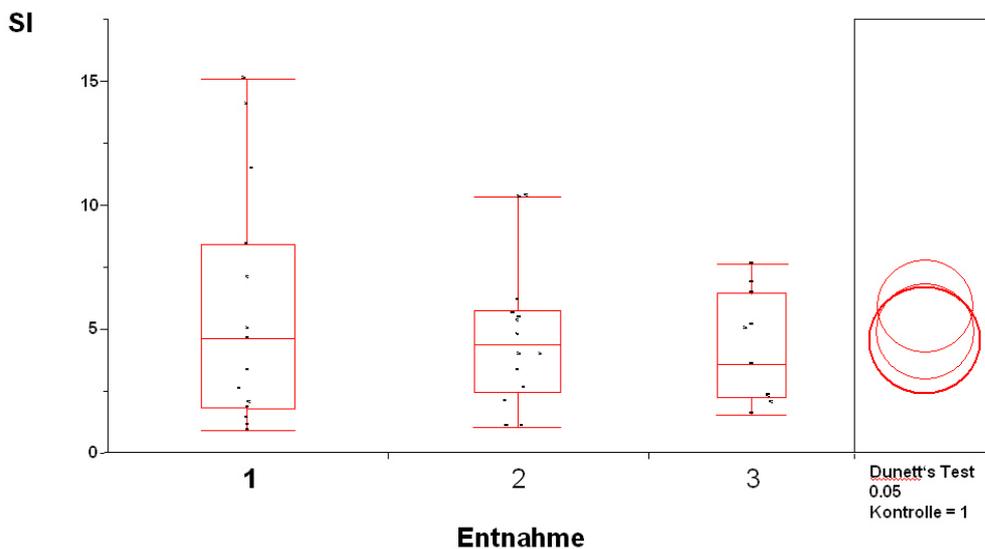


Abbildung 10 Vergleiche der Stimulationsindices der Positivkontrollen aller 3 Entnahmezeitpunkte. Für jede Entnahme sind die Werte der Stimulationsindices im Balken des Werteintervalls von 25% bis zur 75% Perzentile der Mittelwert sowie das Maximum und Minimum dargestellt. Die Kontrollgruppe des Vergleichs in Dunnett's Test ist die Baseline (Entnahme 1). Dargestellt wird der Test am rechten Rand des Diagramms mittels eines Kreises für jeden Entnahmezeitpunkt. Der Kontrollgruppe entsprechende Kreis ist „fett“ dargestellt.

Die Streuung dieser Testwerte in der Tabelle sind graphisch als Kreise im rechten Teil des Diagramms dargestellt. Überlappt ein Kreis mit dem der

ERGEBNISSE

Kontrollgruppe, heißt das, der mögliche quantitative Mittelwertsunterschied zwischen den beiden Gruppen kann nicht für statistisch signifikant erklärt werden. Das Weitere analog.

3.3.2 Vergleich der Stimulationsindices der Bienengift-Inkubation

Der Vergleich der Bienengiftinkubation zu allen Entnahmezeitpunkten liefert nur negative Dunnetts-Testwerte „d“.

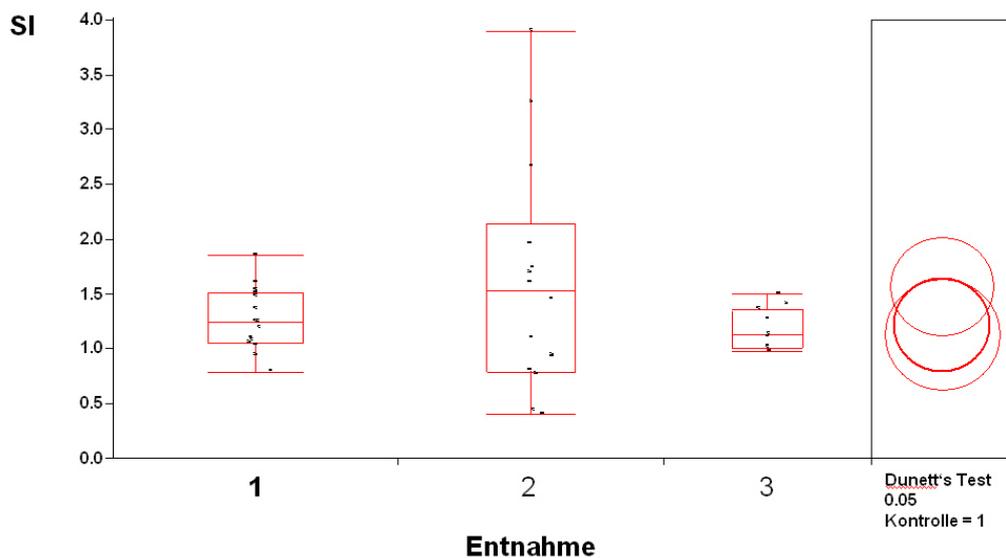


Abbildung 11 Vergleiche der Stimulationsindices der Bienengift-Stimulation aller 3 Entnahmezeitpunkte. Für jede Entnahme sind die Werte der Stimulationsindices im Balken des Wertintervalls von 25% bis zur 75% Perzentile der Mittelwert sowie das Maximum und Minimum dargestellt. Die Kontrollgruppe des Vergleichs in Dunnett's Test ist die Baseline (Entnahme 1). Dargestellt wird dieser am rechten Rand des Diagramms mittels eines Kreses für jeden Entnahmezeitpunkt. Der Kontrollgruppe entsprechende Kreis ist „fett“ dargestellt.

Die Streuung dieser Testwerte in der Tabelle sind graphisch als Kreise im rechten Teil des Diagramms dargestellt. Eine Überlappung der Kreise zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede der der Nachuntersuchungsgruppen zur Kontrollgruppe, also Baseline (Entnahme 1), besteht.

3.3.3 Vergleich der Stimulationsindices der Wespengift-Inkubation

Der Vergleich der Wespengiftinkubation zu allen Entnahmezeitpunkten liefert nur negative Dunnetts-Test –Werte „d“.

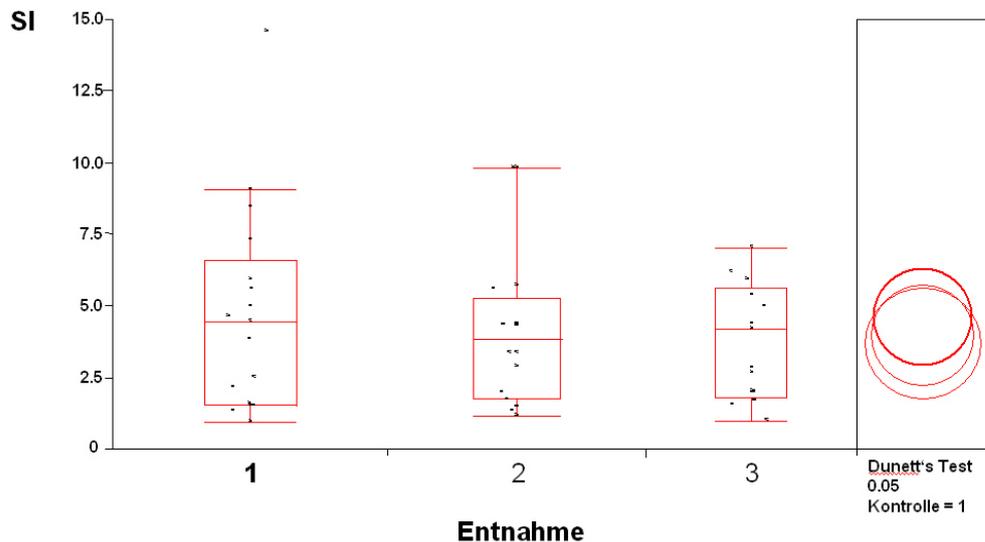


Abbildung 12 Vergleiche der Stimulationsindices der Wespengift-Stimulation aller 3 Entnahmezeitpunkte. Für jede Entnahme sind die Werte der Stimulationsindices im Balken des Werteintervalls von 25% bis zur 75% Perzentile der Mittelwert sowie das Maximum und Minimum dargestellt. Die Kontrollgruppe des Vergleichs in Dunnett's Test ist die Baseline (Entnahme 1). Dargestellt wird dieser am rechten Rand des Diagramms mittels eines Kreses für jeden Entnahmezeitpunkt. Der Kontrollgruppe entsprechende Kreis ist „fett“ dargestellt.

Die Streuung dieser Testwerte in der Tabelle sind graphisch als Kreise im rechten Teil des Diagramms dargestellt. Eine Überlappung der Kreise zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede der der Nachuntersuchungsgruppen zur Kontrollgruppe, also Baseline (Entnahme 1) besteht.

4 Diskussion

In dieser Studie wurde bei Insektengiftallergikern, die durch eine spezifischen Immuntherapie gegen Insektengifte behandelt wurden, über einen Zeitraum von bis zu 3 Jahren die Expression des Transmembranproteins E-NPP3 (CD 203c) auf basophilen Granulozyten, mittels eines etablierten flowcytometrischen Verfahrens, untersucht.

Da basophile Granulozyten eine Schlüsselrolle in der Pathogenese bei Allergien vom Soforttyp haben liegt das Hauptaugenmerk der flowcytometrischen Untersuchungen, auf dieser kleinen Gruppe von Leukozyten, die beim Gesunden nur ca. 0,5-1% aller Blutzellen ausmachen. Eine Besonderheit dieser Zellen sind die IgE – Rezeptoren, welche in Folge von Signaltransduktion, initiiert durch ein gebundenes Antigen (in unserem Fall dem Allergen des Giftes), das in den Zellen gespeicherte Histamin als Mediator, freisetzen. Außerdem beobachtet man auf diesen Effektorzellen vielfältige Expressionen von Oberflächenstrukturen. Dazu zählen z.B. CD 11b, CD13 , CD63, CD 107a und CD 164, CD 203c, [68], [9], [42].

In den letzten 3 Jahren haben sich einige Arbeiten mit der Bedeutung und dem Verhalten des Markers CD203c beschäftigt und ihn im Zusammenhang mit anderen Aktivationsmarker auf Basophilen untersucht. Die Veränderungen von Oberflächen auf basophilen Granulozyten während einer einwöchigen Immuntherapie wurden bereits 2000 von Siegmund et.al untersucht [91]. Letzthin konnte Hennersdorf durch seine Untersuchungen zeigen, dass sich bekannte basophile Oberflächen in ihrer „Reaktionsgeschwindigkeit“ auf Allergene unterscheiden. Es war möglich eine Unterteilung der Cluster of Differentiation in „fast responder“ innerhalb von wenigen Minuten (CD 203c, CD 164, CD 13) und „slow responder“ nach circa 20 Minuten (CD 63, CD 107a, CD 107b) zu treffen [42] . Diese Arbeiten trugen durch die Vielzahl der Untersuchten Parameter zum weiteren Verständnis der Interaktion der Blutzellen bei.

DISKUSSION

In keiner zum jetzigen Zeitpunkt vorliegenden Arbeit wurde die Oberfläche E-NPP3 bzw. CD 203c auf mögliche Veränderungen im Auftreten während einer Immuntherapie untersucht.

Bei der vorliegenden Untersuchung kam der fluoreszenzmarkierte Antikörper (97A6-PE) gegen die Oberfläche CD203c zum Einsatz. Die Ergebnisse der Ausgangsuntersuchung (Baseline) und der Kontrolluntersuchung (Recall) wurden miteinander verglichen. Zusätzlich wurde die Veränderung nach Abschluss der Initialtherapie (Follow up) berücksichtigt. Betrachtet wurde das Vorhandensein jeweils ohne und mit spezifischer Allergenstimulation der Zellen jedes Probanden. Dabei wurde das verfügbare Protokoll von Platz, Binder und Buehring et.al. verwendet, welches reproduzierbare Untersuchungsergebnisse ermöglicht. Die durchgeführte Messung der Oberfläche CD 203c liefert über den PE-Fluoreszenzmarker messbar erhöhte Intensitäten bei Vorhandensein dieses Proteins. In Relation zur Negativkontrolle kann ein Stimulationsindex erzeugt werden, der eine vergleichende Aussage der Ergebnisse für alle Datensätze zulässt.

Die Fragestellung war, ob sich bei Modulation der Immunantwort in Folge der Hyposensibilisierung die Expression des Oberflächenmarkers ändert.

Interessanterweise ergab der Vergleich der medianen Fluoreszenzintensitäten und Stimulationsindices der untersuchten Zellen im Verlauf keinerlei signifikante Veränderungen. Es konnte sogar gezeigt werden, dass zu keinem Untersuchungszeitpunkt über einen Zeitraum von 2-3 Jahren signifikante Veränderungen der Präsenz des basophilen Oberflächenmarkers CD203c auftreten. Das kann damit zusammenhängen, dass die Ausprägung der Zelloberfläche, analog zu anderen bereits untersuchten Clusters of Differentiation (z.B. CD 63), nicht das endgültige Verhalten der Zelle beeinflusst oder gar bestimmt. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse ist also nicht anzunehmen, dass bei der Hyposensibilisierungsbehandlung der Mechanismus der Immunantwort in Abläufe, die zur Expression des Transmembranprotein E-NPP3 auf basophilen Granulozyten führen, eingreift.

DISKUSSION

Zum Nachuntersuchungszeitpunkt konnte nicht bei allen Studienteilnehmern eine Stichprovokation zur Therapieerfolgskontrolle durchgeführt werden, da der entsprechenden Empfehlungen von Seiten der weiterbehandelnden Ärzte bzw. der Patienten nicht nachgekommen wurde. Bei 3 (B-13, B-16, B-18) Patienten wurde der Therapieerfolg durch Stichprovokation oder spontanes Stichereignis (Feldstich) kontrolliert, wobei es bei einer Patientin (B-13) zu einer leichten systemischen Reaktion in Form von Magenschmerzen kam. Diese Patientin ist allerdings durch ihre Anamnese und Befunde (Müller-Grad 3, Rast-Klasse 3, Prick ++) auch in unserer Studiengruppe mit dem höchsten Risiko einer solchen Reaktion nach Hyposensibilisierung zuzuordnen.

Um die Ergebnisse interpretieren zu können muss daher davon ausgegangen werden, dass die Behandlung der Mehrzahl der Probanden zum Nachuntersuchungszeitpunkt den bei dieser Therapie zu erwartenden Erfolg brachte. Eine erfolgreiche Behandlung liegt beim Ausbleiben einer systemischen Reaktion auf ein Stichereignis vor. Das Risiko einer solchen systemischen Reaktion nach spezifischen Immuntherapien (SIT) haben Golden et al. für verschiedene Therapieregime bei Insektengiftallergikern dargestellt [33]. Dabei kommen die Autoren zu dem Schluss, dass bei keinem erneuten Stichereignis im Laufe von 15 Jahren, das Risiko eines unbehandelten Patienten mit 20% nahezu gleich dem eines 5 Jahre in Folge einer initialen SIT mit Erhaltungsdosen behandelnden Patienten ist. Allerdings haben Letztere bis ein Jahr nach dem Ende ihrer Erhaltungsdosen ein Risiko von ca. 2%, was innerhalb der darauffolgenden 10 Jahre wieder stetig ansteigt. Bei unbehandelten Personen reduziert sich das Risiko einer systemischen Reaktion von anfänglich 70% über 15 Jahre regressiv auf 20%. Bei Abbruch der Erhaltungsdosen 2 Jahre nach Initialbehandlung erhöht sich das Risiko binnen des Folgejahres auf ca. 30% und sinkt regressiv auf gleichfalls 20% im 6ten Jahr nach Initialtherapie. Somit hat wie auch von Hafner und Kosnik 2006 veröffentlicht, die Dauer der gesamten Immuntherapie keine prognostische Relevanz für den Langzeittherapieerfolg [40].

DISKUSSION

Legt man diese Daten zugrunde und bezieht sie auf unsere Studienpopulation, so kann man davon ausgehen, dass bei fortgesetzten Erhaltungsdosen 2,5 Jahre nach Initialtherapie die Behandlung bei über 80% der Probanden erfolgreich gewesen sein müsste. Die Expression des untersuchten Markers CD 203c bleibt dabei jedoch im gesamten Verlauf unberührt.

Es muss allerdings beachtet werden, dass gewisse Faktoren das Risiko einer lebensbedrohlichen Reaktion deutlich erhöhen. Diese sind schwere Allgemeinreaktionen während des gesamten Therapieverlaufes, Vorliegen einer Bienengiftallergie und Anamnese einer sehr schweren Stichreaktion (Müller-Grad IV-V) [71], [35], [53], [82]. Die meisten Autoren empfehlen deshalb eine längere Erhaltungsdosis für anamnestisch „auffällige“ Patienten. Eine relative Sicherheit vor einer schweren Reaktion auf einen unerwarteten Stich (Feldstich) eines Hautflüglers kann bei einer Erhaltungstherapie über 2,5-3 Jahren erwartet werden.

Einer oder mehrere dieser Risikofaktoren lagen bei keinem unserer Patienten vor, deshalb konnten wir einen Nachuntersuchungszeitraum von 1-2 Jahren wählen.

Mit den verfügbaren diagnostischen Methoden sind verschiedene Anstrengungen unternommen worden um diese, nach erfolgter Initial- und Erhaltungstherapie, für Aussagen über den Therapieerfolg verwenden zu können. Dafür ist momentan, wie für die Eingangsdagnostik, ein Abwägen des behandelnden Arztes zwischen dem Ergebnis der klinischen Diagnostik und dem Resultat der zeitgleich durchgeführten Laborbefunde nötig. Berücksichtigt werden bei dieser Entscheidung zusätzlich Anamnese, eingangs erhobenen Laborbefunden und Verlauf der Therapie .

Die Reaktion eines behandelten Patienten auf einen Feldstich oder die Simulation dessen in Form eines intra- bzw. subkutan applizierten Giftes ist der Goldstandard der Allergiediagnostik bei Insektengiftallergikern.

Eine positive Hauttestung zeigt das Vorhandensein von allergen-spezifischen IgE Antikörpern, ist aber gleichfalls kein Indikator für das Risiko einer Allgemeinreaktion [31]. Eine Korrelation zwischen der Stärke der auftretenden Hautreaktion und der Stärke der zu erwartenden Allgemeinreaktion ist umstritten. Lediglich das erhöhte Risiko einer Allgemeinreaktion, wenn die Haut

DISKUSSION

stärker reagiert, ist gesichert [8] [94] [56] [81]. Golden et al. stellten 2006 neben dieser Tatsache auch heraus, dass die Verwendung verschiedener Spezies von Insekten bei Durchführung einer Stichprovokation eine Haupteinflussgröße auf das Ergebnis der Testung ist. Dies liegt an den großen Unterschieden zwischen verschiedenen Hymenopterenpezies [31].

Bei negativen Hauttests und einer anamnestisch auffällig starken Reaktion auf einen Insektenstich bei gleichzeitig in Standarddiagnostik nicht erhebaren spezifischen IgE-Titern bleibt wie Golden et. al. 2001 berichtet noch ein hohes Restrisiko auf eine Stichprovokation positiv zu reagieren [34]. Eindrucksvoll wurde demonstriert, dass allergen-spezifische IgE-Konzentrationen von nur wenigen ng/ml für systemische Reaktionen verantwortlich sein können und so die verfügbaren Labortests in ihrer Sensitivität unzureichend sind, solche Patienten zu detektieren.

All diese Erkenntnisse machen neben der Hauttestung die nun schon häufig angesprochene Stichprovokation unumgänglich. Des weiteren verlangen sie nach einem begleitenden verlässlichen laborchemischen Parameter. Das Interesse daran ist deshalb so groß, da man bei Verfügbarkeit einer verlässlichen in-vitro Methode eventuell sogar auf die notwendige und kostspielige stationären Aufnahmen sowie die gleichfalls teure, unter Notfallbereitschaft durchgeführte Stichprovokation mit einem lebenden Insekt verzichten könnte.

Somit liegt die Hoffnung neben etablierten nun auf zahlreichen experimentellen in-vitro Tests. Je nach Lage der Erkenntnisse sind bisher viele hoffnungsvolle Indikatoren aufgetaucht und entweder als nicht verlässlich genug verworfen oder im besten Fall als zu betrachtender Begleitparameter neben der Anamnese und dem etablierten klinischen Test empfohlen worden.

Viele der neuen Wege in der Erfolgskontrolle erfolgen durch die Messung von freigesetzten Mediatoren (z.B. Histamin), die Konzentration von Antikörpern (z.B. IgG) und die Ausprägung von Oberflächen auf Zellen. Ein Beispiel wäre der einst hoffnungsvolle IgG - Titer von über 3µg/ml nach einer 4 jährigen Behandlung, welcher vermeintliche Sicherheit zu bieten schien. Allerdings

DISKUSSION

zeigten auch Probanden mit niedrigerer IgG Konzentration keine klinische Symptomatik bei Stichprovokation [29]. Ferner wurde in einer Kontrollstudie die Therapie nach 2,5 Jahren bei einer Patientengruppe in Abhängigkeit vom Rückgang der spezifischen IgE-Werte und bei einer anderen Gruppe ohne Berücksichtigung des spezifischen IgE beendet; Der Vergleich zwischen beiden Gruppen zeigte keinen Unterschied in der Reaktionshäufigkeit auf einen erneuten Stich [83].

Deshalb ist es in Hinsicht auf die Sicherung der Entscheidung zum Verzicht auf Erhaltungsdosen die Durchführung klinischer und paraklinischer Tests vor Beendigung empfohlen [70], [32]. Im Falle einer positiven Reaktion auf diese (Stichprovokation), sollte nach Empfehlung von Rueff das Regime der Erhaltungsdosenkonzentration verändert, konkret gesprochen erhöht werden [87].

Monitoringstudien korrelieren Ergebnisse experimenteller Methoden mit evidenzbasierter klinischer Praxis, also dem etablierten Goldstandard. Diese Studien tragen entscheidend zum Verständnis des Immunsystems bei, konnten aber bisher keinen Marker ausmachen, welcher den Erfolg einer Immuntherapie vorhersagt.

So sind neben Immunglobulintitern und Mediatoren in letzter Zeit, wie in dieser Studie gleichfalls beobachtet, die Basophilen Granulozyten als Effektorzellen im Interesse der Forschung. Dies liegt an den unzähligen Oberflächen und der Möglichkeit der nun weit verbreiteten flowcytometrischen Untersuchung.

Seit Mitte der Neunziger Jahre hat sich die Oberfläche CD 63 als Diagnostikfokus etabliert. Seit geraumer Zeit sind auch kommerzielle Tests wie z.B. der Basotest[®] (Fa. Orpegen Pharma, Heidelberg, BRD) erhältlich um den Marker als Entscheidungshilfe heranzuziehen, da die überlegene Spezifität und Sensitivität gegenüber klassischen Diagnostika höhere Sicherheit bei der Befundung gewährleistet. Problematisch gestaltet sich bei diesem Test allerdings, dass CD 63 auch auf anderen Zellen, wie z.B. gewebeständigen Mastzellen, Makrophagen und Thrombozyten präsent ist. Deshalb ist zur sicheren Auswahl der basophilen Granulozyten in diesem Testverfahren eine mehrfache Markierung der Zellen über Anti-CD45- und Anti-IgE-Antikörper notwendig. Die Sensitivität der Testverfahrens wurde außerdem über eine

DISKUSSION

Zugabe von IL-3, einem entscheidenden Wachstumsfaktor für Basophile, erhöht ohne spontane Ausprägung der Oberfläche zu provozieren [15], [93].

Auf dem Weg der wissenschaftlichen Untersuchung konnte bereits ein Zusammenhang von CD 63 Ausprägung mit Histamin-Freisetzung und Degranulation der basophilen Granulozyten nach deren Aktivierung durch Allergene dargestellt werden [88], [66, 67]. Man kann CD 63 so in direkte Beziehung zur anaphylaktischen Reaktionskaskade setzen. Eine Aussage zum Behandlungserfolg von Immuntherapien konnte mittels diesen Markers jedoch in den angestregten Monitoringstudien nicht gezeigt werden [22],[18]. Neben CD 63 geriet kontrovers diskutiert, die Zelloberfläche CD 203c ins Interesse der Forschung. Das lag daran, dass diese Oberfläche ausschließlich auf Basophilen Granulozyten präsent ist. Somit war eine einfachere Markierung und Untersuchung bei teilweise besseren Ergebnissen in Spezifität und Sensitivität möglich. Problematisch im Vergleich ist allerdings das beschriebene unterschiedliche Verhalten der Marker in Bezug auf Anwesenheit von IL-3 und höhere Allergenkonzentrationen.

Allerdings ist die Kaskade zur Ausprägung der Oberfläche CD203c sowie ihre physiologische Bedeutung weitestgehend ungeklärt.

Deshalb ist es abschließend nicht zu klären mögliche Zusammenhänge zu untersuchen oder abzusehen, welche pathophysiologische Konsequenz aus der interessanten Beobachtung resultiert, dass CD203c nach einer erfolgreichen Hyposensibilisierung unverändert nachweisbar ist.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse dieser Studie ein Anhaltspunkt dafür, dass im Bereich der Immunmodulation bei erfolgreicher Hyposensibilisierungsbehandlung die untersuchte Oberfläche CD 203c keine Aussage über den Therapieerfolg zulässt. Es ist allerdings ein probates Mittel zur Eingangsdagnostik von Insektengiftallergikern. Mit einer Sensitivität von 97,8% und einer Spezifität von 100% ist es etablierten Diagnostika ebenbürtig. Eine Automatisierung dieses Untersuchungsprozesses, der bei unserem Verfahren circa 1,25 Stunden pro Untersuchung in Anspruch nimmt, birgt die Möglichkeit ein schnelles und sicheres Standardverfahren zu erstellen.

DISKUSSION

Ob die hier beschriebene Persistenz des Markers nach Hyposensibilisierungsbehandlung zu einem weiteren Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge beiträgt, müssen weitere Forschungen zeigen.

Auch wenn das Risiko nach erfolgreich verlaufener Immuntherapie eine schwere Stichreaktion zu erleiden eher gering erscheint, so bleibt hier doch eine erhebliche Restunsicherheit. Bedauerlicherweise konnte bisher kein laborchemischer Parameter identifiziert werden, mit dem sich das Risiko einer schweren Stichreaktion vorhersagen lässt. Daher wird derzeit unter Notfallbereitschaft eine klassische „Hauttestung“ oder eine Stichprovokation durchgeführt. Diese etablierten Verfahren stellen neben dem Risiko für den Patienten durch stationäre Aufnahme und Belegzeiten einen nicht unerheblichen Kostenfaktor dar.

5 Zusammenfassung

5.1 Einleitung

Durch den Stich eines Hautflüglers (Hymenopter) können 3-5% der mitteleuropäischen Bevölkerung durch eine allergische Reaktion auf Bestandteile des Insektengifts in eine lebensbedrohliche Situation geraten. Es ist seit vielen Jahren möglich mittels einer spezifischen Immuntherapie Patienten erfolgreich zu hyposensibilisieren und das Risiko einer solchen Reaktion bei einem erneuten Kontakt (Feldstich) zu senken. Dabei stellt sich die Schwierigkeit der Erfolgskontrolle, welche momentan nur durch eine sog. Stichprovokation mit einem lebenden Insekt in Notfallbereitschaft durchgeführt werden kann. Momentan besteht durch vielfältige Unklarheiten im Funktionsmechanismus der Hyposensibilisierung, keine Möglichkeit über einen verlässlichen „in-vitro“ / Laborparameter den Erfolg der Therapie zu überprüfen. Die für Allergiker spezifische CD 203c-Expression auf basophilen Granulozyten war Gegenstand der Untersuchung dieser Arbeit. Nachdem bisher gezeigt werden konnte, dass sich dieser Cluster of Differentiation in einer Standardisierten Untersuchung mit hoher Sensitivität und Spezifität zur Diagnostik einer Allergie eignet, sollte in dieser Arbeit herausgefunden werden, ob sich die Expression im Laufe einer spezifischen Immuntherapie verändert und ggf. eine Korrelation zum Therapieerfolg besteht.

5.2 Patienten, Materialien und Methoden

Bei 17 Patienten, welche sich einer Hyposensibilisierungsbehandlung an der Universitätshautklinik unterzogen, wurde vor und nach der initialen Therapie (Rush-Schema) - sowie nach 16-33 Monaten Erhaltungstherapie - mittels standardisiertem Protokoll die Expression des basophilen Aktivationsmarkers CD203c untersucht. Dazu wurde die Oberfläche durch einen fluorochrommarkierten spezifischen monoklonalen Antikörper (97A6-PE) in einem etablierten Verfahren mittels Durchflußcytometrie analysiert. Diesem ging die Stimulation der Zellen mit Wespengift und Bienengift sowie mit PBS als Negativkontrolle und mit dem Anti-IgE-Antikörper Dε2 als Positivkontrolle voran.

Die medianen Fluoreszenzintensitäten aller Messungen dienten zur Berechnung eines relativen Stimulationsindex, welcher zum statistischen Vergleich der Ergebnisse eines Untersuchungsintervalls sowie im Weiteren zwischen allen drei Untersuchungszeitpunkten diente. Die Ergebnisse der Anamnese, Standarddiagnostik und Stichprovokation aller Patienten wurden ebenfalls dokumentiert.

5.3 Ergebnisse

Der Vergleich der Ergebnisse des in-vitro Allergietests mit jenen der Standardverfahren zur Eingangsuntersuchung bestätigte bei 16 von 17 Patienten die gestellte Diagnose. Bei 13 von 14 Patienten mit Wespengiftallergie zeigte die Hochregulierung von CD203 auf Wespengift sowie die Positivkontrolle - bei 2 Bienen- und Wespengiftallergikern auf alle Stimulationen – eine Typ-I-Allergie an. Nach Initial- und Erhaltungstherapie der Hyposensibilisierung zeigten im Recall nach 22-33 Monaten, 12 der 13 nachuntersuchten Patienten noch die Hochregulierung der CD 203c Oberfläche gegen das Allergen. Die Basophilen eines Allergikers gegen Bienen- und Wespengift zeigte einen kleineren Stimulationswert in der Bienengiftinkubation, jedoch nicht in Wespengiftinkubation und Positivkontrolle. Die Unterscheidung der Stimulationen eines jeden Untersuchungsintervalls zwischen Positiv- und Negativkontrollen sowie den Allergenstimulationen war signifikant möglich.

Der statistische Vergleich der medianen Fluoreszenzintensitäten wie auch der Stimulationsindex der Positivkontrollen und Allergenstimulationen zwischen den drei Untersuchungszeitpunkten zeigte in Bezug auf die vorliegende Allergie keine signifikanten Unterschiede.

5.4 Diskussion

Die Ergebnisse der Expression des basophilen Aktivationsmarkers CD 203c wurden mit den Ergebnissen der Standarddiagnostik (Anamnese, spez. IgE, intracutan-Test) verglichen und bestätigen diese. Wie in bereits publizierten Studien, konnte gezeigt werden, dass es sich um eine hochspezifische und sensitive in-vitro Untersuchung für Insektengiftallergiker handelt. Allerdings

ZUSAMMENFASSUNG

konnten keine Veränderungen in der Expression der Oberfläche anhand des Stimulationsindex zwischen den 3 Befundzeitpunkten dargestellt werden. Dies galt für die Stimulation mit standardisierten Bienen- und Wespengift genauso wie auch für die anti-IgE-Positivkontrollen. Diese Beobachtungen decken sich mit den Beschreibungen zu der ebenfalls bei Allergikern auf Basophilen exprimierten Oberfläche CD 63 im Verlauf von Hyposensibilierungsbehandlungen.

Unter Maßgabe des hohen Behandlungserfolges der spezifischen Immuntherapie kann die untersuchte Expression von CD 203c im Verlauf einer solchen Behandlung nicht für eine Aussage zum Therapieerfolg genutzt oder als Hilfsparameter zur Therapieerfolgskontrolle herangezogen werden.

Welche Rolle die exprimierte Ectonukleotid Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase 3 in der Reaktionskaskade einer allergischen Reaktion besitzt bleibt unklar und welche möglichen Konsequenzen diese fortwährende Präsenz für den Funktionsmechanismus einer erfolgreichen spezifischen Immuntherapie hat, gilt es herauszufinden.

6 Anhang

6.1 verwendete Abkürzungen

Ak	Antikörper
BAT	Basophiler Aktivierungstest
CAST	Cellular Antigen Stimulation Test
CD	Cluster of Differentiation
DP-	Prostaglandin-D-(Rezeptor)
CRF	Case Report Form
EDTA	Ethylen Diamine Tetraacetic Acid, Ehtylendiamintetraessigsäure,
E-NPP3	Ectonucleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 3
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FG	Freiheitsgrad(e)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
GIS /GIT	Gastrointestinales-System / Gastrointestinal-Trakt
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
Lsg	Lösung
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MoAk	Monoklonaler Antikörper
MW	Mittelwert
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
RIA	Radioimmunoassay
ROC	Receiver Operating Characteristic
RT	Respirationstrakt
SD	Standardabweichung
SI	Stimulationsindex
SIT	spezifische Immuntherapie auch gen. „Hyposensibilisierung“
SSC	Side Scatter

TH / T_H	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation / World Health Organisation

Einheiten

Std. / h	Stunde(n)
Min. / m	Minute(n)
Sek. / s	Sekunde(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
kDa	Kilodalton

7 Literatur

1. *Position paper: Allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology.* Allergy, 1993. **48**(14 Suppl): p. 48-82.
2. Bellinghausen, I., et al., *Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects.* Eur J Immunol, 1997. **27**(5): p. 1131-9.
3. Biedermann, T., et al., *Mastocytosis associated with severe wasp sting anaphylaxis detected by elevated serum mast cell tryptase levels.* Br J Dermatol, 1999. **141**(6): p. 1110-2.
4. Bilo, B.M., et al., *Diagnosis of Hymenoptera venom allergy.* Allergy, 2005. **60**(11): p. 1339-49.
5. Binder, M., *Hochregulierung des Aktivationsmarkers E-NPP3 (CD203c) auf der Oberfläche basophiler Granulozyten nach In-Vitro-Stimulation mit definierten Bienen- und Wepengiftallergenen bei insektengiftallergikern.,* in *Dissertation aus der Medizinische Universitätsklinik Abt. Innere Medizin II.* 2005, Eberhard Karls Universität: Tuebingen.
6. Birnbaum, J., D. Charpin, and D. Vervloet, *Rapid Hymenoptera venom immunotherapy: comparative safety of three protocols.* Clin Exp Allergy, 1993. **23**(3): p. 226-30.
7. Bjorkander, J. and L. Belin, *Diagnostic Skin Testing in Hymenoptera Sensitivity,* in *Advances in allergology and applied immunology,* A. Oehling, Editor. 1980, Pergamon Press: New York, USA. p. 733.
8. Blauw, P. and L. Smithuis, *The evaluation of the common diagnostic methods of hypersensitivity for bee and yellow jacks venom by means of an in-hospital insect sting.* J Allergy Clin Immunol, 1982. **75**: p. 431-436.
9. Boumiza, R., A.L. Debard, and G. Monneret, *The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives.* Clin Mol Allergy, 2005. **3**: p. 9.
10. Bousquet, J., et al., *Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology.* Ann Allergy Asthma Immunol, 1998. **81**(5 Pt 1): p. 401-5.
11. Brown, S.G., et al., *In vitro testing to diagnose venom allergy and monitor immunotherapy: a placebo-controlled, crossover trial.* Clin Exp Allergy, 2004. **34**(5): p. 792-800.
12. Buhning, H.J., et al., *The basophil activation marker defined by antibody 97A6 is identical to the ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3.* Blood, 2001. **97**(10): p. 3303-5.
13. Buhning, H.J., et al., *The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors.* Blood, 1999. **94**(7): p. 2343-56.
14. Cosmi, L., et al., *CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease.* Eur J Immunol, 2000. **30**(10): p. 2972-9.

LITERATUR

15. Cozon, G., et al., *Detection of activated basophils using flow cytometry for diagnosis in atopic patients*. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 1999. **27**(4): p. 182-7.
16. Crockard, A.D. and M. Ennis, *Laboratory-based allergy diagnosis: should we go with the flow?* *Clinical and Experimental Allergy*, 2001. **31**(7): p. 975-7.
17. de Groot, H., C. de Graaf-in 't Veld, and R.G. van Wijk, *Allergy to bumblebee venom. I. Occupational anaphylaxis to bumblebee venom: diagnosis and treatment*. *Allergy*, 1995. **50**(7): p. 581-4.
18. Ebo, D.G., et al., *Flow-assisted quantification of in vitro activated basophils in the diagnosis of wasp venom allergy and follow-up of wasp venom immunotherapy*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2006.
19. Ebo, D.G., et al., *Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives*. *Allergy*, 2006. **61**(9): p. 1028-39.
20. Egner, W., et al., *The frequency and clinical significance of specific IgE to both wasp (*Vespula*) and honey-bee (*Apis*) venoms in the same patient*. *Clin Exp Allergy*, 1998. **28**(1): p. 26-34.
21. Elsner, J., A. Sack, and H. Petering, *Ultrarush SIT in venom allergy*. *Allergy*, 2000. **55**: p. 582-583.
22. Erdmann, S.M., et al., *The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy*. *Allergy*, 2004. **59**(10): p. 1102-9.
23. Fischer, P. and R. Külzer, *Zur Prävalenz der Insektengiftallergie in Deutschland*. *Allergo J*, 1993. **2**(Supp.2).
24. Florian, S., et al., *Detection of novel leukocyte differentiation antigens on basophils and mast cells by HLDA8 antibodies*. *Allergy*, 2006. **61**(9): p. 1054-62.
25. Francis, J.N., S.J. Till, and S.R. Durham, *Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(6): p. 1255-61.
26. Freeman, J., *Further observations on the treatment of hay fever by hypodermic inoculations of pollen vaccine*. *Lancet*, 1911. **II**: p. 814-817.
27. Goldberg, A. and R. Confino-Cohen, *Maintenance venom immunotherapy administered at 3-month intervals is both safe and efficacious*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. **107**(5): p. 902-6.
28. Golden, D.B.K., *Epidemiology of insect venom sensitivity*. 1989.
29. Golden, D.B.K., *Clinical correlation of the venom-specific IgG antibody level during maintenance venom immunotherapy*. *J Allergy Clin Immunol*, 1992. **90**: p. 386-393.
30. Golden, D.B.K., *Insect sting allergy and venom immunotherapy: a model and a mystery*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. **115**(3): p. 439-47; quiz 448.
31. Golden, D.B.K., et al., *Clinical and entomological factors influence the outcome of sting challenge studies*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(3): p. 670-675.
32. Golden, D.B.K., et al., *Risk and benefit of discontinuing venom immunotherapy [Abstract]*. *J Allergy Clin Immunol*, 1991. **87**: p. 237.
33. Golden, D.B.K., A. Kagey-Sobotka, and L.M. Lichtenstein, *Survey of patients after discontinuing venom immunotherapy*. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. **105**(2 Pt 1): p. 385-90.
34. Golden, D.B.K., et al., *Insect sting allergy with negative venom skin test responses*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. **107**: p. 897-901.

LITERATUR

35. Golden, D.B.K., et al., *Discontinuing venom immunotherapy: extended observations*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **101**(3): p. 298-305.
36. Golden, D.B.K., et al., *Regimens of Hymenoptera venom immunotherapy*. Ann Intern Med, 1980. **92**(5): p. 620-4.
37. Gyles, S.L., et al., *A dominant role for chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T helper type 2 (Th2) cells (CRTH2) in mediating chemotaxis of CRTH2+ CD4+ Th2 lymphocytes in response to mast cell supernatants*. Immunology, 2006. **119**(3): p. 362-8.
38. Habermann, E., *Bee and wasp venoms*. Science, 1972. **177**(46): p. 314-22.
39. Haerberli, G., et al., *Elevated basal serum tryptase and hymenoptera venom allergy: relation to severity of sting reactions and to safety and efficacy of venom immunotherapy*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(9): p. 1216-20.
40. Hafner, T. and M. Kosnik, *Long-term effectiveness of venom immunotherapy (VIT) [Abstract]*. J Allergy Clin Immunol, 2006(Feb.): p. S308.
41. Hamilton, R.G., *Diagnostic methods for insect sting allergy*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2004. **4**(4): p. 297-306.
42. Hennersdorf, F., et al., *Identification of CD13, CD107a, and CD164 as novel basophil-activation markers and dissection of two response patterns in time kinetics of ige-dependent upregulation*. Cell Res, 2005. **15**(5): p. 325-35.
43. Hirai, H., et al., *Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2*. J Exp Med, 2001. **193**(2): p. 255-61.
44. Hoffman, D.R., *Allergens in Hymenoptera venom XIII: Isolation and purification of protein components from three species of vespid venoms*. J Allergy Clin Immunol, 1985. **75**(5): p. 599-605.
45. Hoffman, D.R. and C.L. Wood, *Allergens in Hymenoptera venom XI. Isolation of protein allergens from Vespula maculifrons (yellow jacket) venom*. J Allergy Clin Immunol, 1984. **74**(1): p. 93-103.
46. Hoigne, R., *Allgemeinreaktionen auf Insektenstiche*. Schweiz Med Wochenschr, 1965. **95**: p. 1731-1738.
47. Hunt, K.J., et al., *A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity*. N Engl J Med, 1978. **299**(4): p. 157-61.
48. Jeep, S., et al., *Comparison of the Phadebas RAST with the Pharmacia CAP system for insect venom*. Allergy, 1992. **47**(3): p. 212-7.
49. Jutel, M., et al., *A regulatory T cell the target of venom immunotherapy?* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2005(5): p. 365-369.
50. Jutel, M., et al., *Ultra rush bee venom immunotherapy does not reduce cutaneous weal responses to bee venom and codeine phosphate*. Clin Exp Allergy, 1995. **25**(12): p. 1205-10.
51. Kahlert, H., O. Cromwell, and H. Fiebig, *Measurement of basophil-activating capacity of grass pollen allergens, allergoids and hypoallergenic recombinant derivatives by flow cytometry using anti-CD203c*. Clin Exp Allergy, 2003. **33**(9): p. 1266-72.
52. Kapsenberg, M.L., et al., *The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy*. Clin Exp Allergy, 1999. **29 Suppl 2**: p. 33-6.

LITERATUR

53. Keating, M.U., et al., *Clinical and immunologic follow-up of patients who stop venom immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, 1991. **88**(3 Pt 1): p. 339-48.
54. King, T., G. Lu, and M. Gonzales, *Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase. Sequence similarity and antigenic cross-reactivity with hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **98**: p. 588-600.
55. Kleine-Tebbe, J., *Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) mit Allergenen*, in AWMF online. 2000.
56. Lantner, R. and R.E. Reisman, *Clinical and immunologic features and subsequent course of patients with severe insect sting anaphylaxis*. J Allergy Clin Immunol, 1989. **84**: p. 900-906.
57. Lerch, E. and U.R. Muller, *Long-term protection after stopping venom immunotherapy: results of re-stings in 200 patients*. J Allergy Clin Immunol, 1998. **101**(5): p. 606-12.
58. Lockey, R.F., et al., *The Hymenoptera venom study. III: Safety of venom immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, 1990. **86**(5): p. 775-80.
59. Ludolph-Hauser, D., et al., *Constitutively raised serum concentrations of mast-cell tryptase and severe anaphylactic reactions to Hymenoptera stings*. Lancet, 2001. **357**(9253): p. 361-2.
60. Magnan, A., et al., *Venom immunotherapy induces monocyte activation*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(8): p. 1303-9.
61. Marone, G., L.M. Lichtenstein, and S. Galli, *Mast Cells and basophils*. 2000, San Diego: Academic Press.
62. Marone, G., M. Triggiani, and A. de Paulis, *Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma?* Trends Immunol, 2005. **26**(1): p. 25-31.
63. McHugh, S.M., et al., *Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a TH-2 to a TH-1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy*. Clin Exp Allergy, 1995. **25**(9): p. 828-38.
64. Møllerup, M.T., et al., *Safety of allergen-specific immunotherapy. Relation between dosage regimen, allergen extract, disease and systemic side-effects during induction treatment*. Clin Exp Allergy, 2000. **30**(10): p. 1423-9.
65. Mingomataj, E., et al., *Specific immunotherapy in Albanian patients with anaphylaxis to hymenoptera venoms*. BMC Dermatol, 2002. **2**: p. 11.
66. Miura, K. and D.W. MacGlashan, Jr., *Dual phase priming by IL-3 for leukotriene C4 generation in human basophils: difference in characteristics between acute and late priming effects*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 3026-34.
67. Moneret-Vautrin, D.A., et al., *Human basophil activation measured by CD63 expression and LTC4 release in IgE-mediated food allergy*. Ann Allergy Asthma Immunol, 1999. **82**(1): p. 33-40.
68. Monneret, G., et al., *Effects of prostaglandin D(2) and 5-lipoxygenase products on the expression of CD203c and CD11b by basophils*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(2): p. 627-34.
69. Mueller, H.L., *Diagnosis and treatment of insect sensitivity*. J Asthma Res, 1966. **3**(4): p. 331-3.
70. Muller, U., E. Berchtold, and A. Helbling, *Honeybee venom allergy: results of a sting challenge 1 year after stopping successful venom*

LITERATUR

- immunotherapy in 86 patients.* J Allergy Clin Immunol, 1991. **87**(3): p. 702-9.
71. Muller, U., A. Helbing, and E. Berchtold, *Immunotherapy with doneybee venom and yellowjacket venom is different regarding efficacy and safety.* J Allergy Clin Immunol, 1992. **89**: p. 529-535.
 72. Müller, U.R., *Insektengiftallergie. Klinik, Diagnostik und Therapie.* 1988, Stuttgart: Fischer.
 73. Muraille, E. and O. Leo, *Revisiting the Th1/Th2 paradigm.* Scand J Immunol, 1998. **47**(1): p. 1-9.
 74. Nittner-Marszalska, M., et al., *Prevalence of Hymenoptera venom allergy and its immunological markers current in adults in Poland.* Med Sci Monit, 2004. **10**(7): p. CR324-9.
 75. Noon, *Prophylactic inoculation for hay fever.* Lancet, 1911. **I**: p. 1572-1573.
 76. O'Hehir, R. and J.A. Douglass, *Stinging insect allergy - Safe, effective immunotherapy is available.* Medical Journal of Australia, 1999. **171**: p. 649-650.
 77. Pasaoglu, G., B.A. Sin, and Z. Misirligil, *Rush hymenoptera venom immunotherapy is efficacious and safe.* J Investig Allergol Clin Immunol, 2006. **16**(4): p. 232-8.
 78. Platz, I.J., et al., *Hymenoptera-venom-induced upregulation of the basophil activation marker ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 in sensitized individuals.* Int Arch Allergy Immunol, 2001. **126**(4): p. 335-42.
 79. Przybilla, B. and F. Rueff, *Desensitization of allergy to hymenoptera venoms.* Wien Med Wochenschr, 1999. **149**(14-15): p. 421-8.
 80. Reimer, A. and U. Mueller, *Bienen- und Wespengiftallergie (Allergie aux venins de guepes et d'abeilles).* Schweiz Med Forum, 2004(4): p. 661-665.
 81. Reisman, R.E., *Natural history of insect sting allergy: relationship of severity of symptoms of initial sting anaphylaxis to re-sting reactions.* J Allergy Clin Immunol, 1992. **90**: p. 1601-1603.
 82. Reisman, R.E., *Duration of venom immunotherapy: Relationship to the severity of symptoms of initial insect sting anaphylaxis.* J Allergy Clin Immunol, 1993. **92**: p. 831-836.
 83. Reisman, R.E. and R. Lantner, *Further observations of stopping venom immunotherapy: comparison of patients stopped because of a fall in serum venom-specific IgE to insignificant levels with patients stopped prematurely by self-choice.* J Allergy Clin Immunol, 1988. **83**(6): p. 1049-1054.
 84. Reisman, R.E., et al., *Studies of coexisting honeybee and vespid-venom sensitivity.* J Allergy Clin Immunol, 1984. **73**(2): p. 246-52.
 85. Reisman, R.E., J.I. Wypych, and M.I. Lazell, *Further studies of patients with both honeybee- and yellow-jacket-venom-specific IgE.* Int Arch Allergy Appl Immunol, 1987. **82**(2): p. 190-4.
 86. Ruef, F., *Diagnose und Therapie der Bienen- und Wespengiftallergie.* AWMF-Leitlinien-Register, 2000. **Nr. 061/001**.
 87. Rueff, F., A. Wenderoth, and B. Przybilla, *Patients still reavtion to a sting challenge while receiving Hymenoptera venom immunotherapy are protected by increased venom doses.* J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**: p. 1027-2032.

LITERATUR

88. Sainte-Laudy, J., et al., *Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin tests, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release.* Clinical and Experimental Allergy, 2000. **30**: p. 116-1171.
89. Schuerwegh, A.J., et al., *Wasp venom immunotherapy induces a shift from IL-4-producing towards interferon-gamma-producing CD4+ and CD8+ T lymphocytes.* Clinical and Experimental Allergy, 2001. **31**: p. 740-746.
90. Secrist, H., et al., *Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals.* J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2123-30.
91. Siegmund, R., et al., *Surface membrane antigen alteration on blood basophils in patients with Hymenoptera venom allergy under immunotherapy.* J Allergy Clin Immunol, 2000. **106**(6): p. 1190-5.
92. Straumann, F., C. Bucher, and B. Wuthrich, *Double sensitization to honeybee and wasp venom: immunotherapy with one or with both venoms? Value of FEIA inhibition for the identification of the cross-reacting ige antibodies in double-sensitized patients to honeybee and wasp venom.* Int Arch Allergy Immunol, 2000. **123**(3): p. 268-74.
93. Sturm, G.J., et al., *The CD63 basophil activation test in Hymenoptera venom allergy: a prospective study.* Allergy, 2004. **59**(10): p. 1110-7.
94. van der Linden, P., et al., *Insect-sting challenge in 324 subjects with a previous anaphylactic reaction: current criteria for insect-venom hypersensitivity do not predict the occurrence and the severity of anaphylaxis.* J Allergy Clin Immunol, 1994. **94**(151-159).
95. Wachholz, P.A., et al., *Grass pollen immunotherapy for hayfever is associated with increases in local nasal but not peripheral Th1:Th2 cytokine ratios.* Immunology, 2002. **105**(1): p. 56-62.
96. Wedi, B. and A. Kapp, *Spezifische Immuntherapie.* Der Hautarzt, 2004(4): p. 399-407.
97. Wenzel, J., et al., *Safety of rush insect venom immunotherapy. The results of a retrospective study in 178 patients.* Allergy, 2003. **58**(11): p. 1176-9.
98. Winningham, K.M., et al., *Hymenoptera venom protease allergens.* J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(4): p. 928-933.
99. Wypych, J.I., C.J. Abeyounis, and R.E. Reisman, *Analysis of differing patterns of cross-reactivity of honeybee and yellow jacket venom-specific IgE: use of purified venom fractions.* Int Arch Allergy Appl Immunol, 1989. **89**(1): p. 60-6.

DANKSAGUNG

Mein bester und herzlichster Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. G. Fierlbeck für die Überlassung des Dissertationsthemas und neben ihm auch Dr. med. Stefan Schanz für das in mich gesetzte Vertrauen, die Betreuung sowie die Möglichkeit der umfangreichen und sorgenfreien Nutzung des Labors und der Station.

Außerdem Frau Schiebel und ihren Kolleginnen, die jederzeit bereit waren, mir bei der Bewältigung alltäglicher „Laborproblemchen“ weiterzuhelfen und Marc Binder, der mir die Geheimnisse der Basophilen-Untersuchung eröffnete.

Auch danken möchte ich dem gesamten Team der Station 3 Ost/West sowie Herrn Prof. Dr. med. T. Biedermann und seinen Kollegen und Mitarbeiterinnen, für die freundliche Zusammenarbeit bei der Patientenaquise und Blutentnahme.

Herrn Dr. rer. nat. D. Axmann nicht nur für die Beratung in statistischen Fragen sondern auch die metaphysische Aufarbeitung der (Zahlen)welt.

Meiner Liebsten Daniela für ihr Verständnis, ihre Motivation und die Unterstützung als „fachfremde“ Vorkorrektorin.

Allen Patienten, die bereit waren an dieser Studie teilzunehmen und die notwendigen Blutabnahmen sowie Hausbesuche über sich ergehen ließen.

Und nicht zuletzt meinen Eltern, die mich stets unterstützt haben und mir meine Ausbildung und letztlich diese Arbeit ermöglichten.

Meinem Großvater, San.-Rat Dr. H. Heilmann[†], für die unzählbaren und unbeschreiblichen Hilfen für ein richtiges Leben(swerk).

LEBENS LAUF

Fabian Huettig

geboren am 22.01.1980 in Meerane / Sachsen

Eltern: Dr. Ulrike Hüttig, geb. 03.03.1955, Zahnärztin
Dr. Klaus-Peter Hüttig, geb. 24.05.1953, Zahnarzt

Schulbildung

1986-1994 Lehngrundschule Glauchau / Sachsen

1994-1998 Georgius-Agricola-Gymnasium Glauchau / Sachsen

04.06.1998 Abitur in Glauchau

Wehrdienst

Oktober 1998 – September 1999 Grundwehrdienst als
Stabsdienstsoldat in der Fernmeldeausbildungseinheit 6.St/FmRgt
4 des Kommandos Luftbewegliche Kräfte in Cham / Oberpfalz

2007/ 2008 Laufbahnwechsel zum Sanitätsdienst und Verfügung
als Stabsarzt am Sanitätszentrum Havelberg / Brandenburg

Studium

Oktober 1999 Zahnmedizin in Tübingen

September 2000 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

September 2002 Zahnärztliche Vorprüfung

Mai 2005 Staatsexamen Zahnmedizin

Juni 2005 Approbation als Zahnarzt

studentische Tätigkeiten

2000-2004 gewähltes Mitglied der Studienkommission
Zahnmedizin der Medizinischen Fakultät und Vorstandsmitglied
der Fachschaft Zahnmedizin Tübingen

Arbeitstätigkeit

Seit September 2005 Assistenz Zahnarzt an der Abteilung für
zahnärztliche Prothetik mit Propädeutik und Sektion „Medizinische
Werkstoffkunde und Technologie“ (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H.
Weber) am Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
des Universitätsklinikums Tübingen

Fortbildung als Prüfarzt für Klinische Studien nach GCP,
Qualitätsmanagementbeauftragter und int. Auditor sowie
Hygienebeauftragter Arzt des Landesgesundheitsamtes.