

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Sulfidoleukotrienbestimmung  
bei Patienten mit atopischer Dermatitis  
und Nahrungsmitteladditiva-Intoleranz**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Wanja Katharina Vieth

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Worm

Gutachter: 2. Priv.-Doz. Dr. med. B. Wedi

Gutachter: 3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Kleine-Tebbe

Datum der Promotion: 19.09.2008

## Zusammenfassung

Die atopische Dermatitis ist eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung multifaktorieller Genese. Neben allergischen Mechanismen tragen auch nicht-allergische Mechanismen wie die nicht-allergische Hypersensitivitätsreaktion (pseudoallergische Reaktion) zur Krankheitsentstehung bei. Auslöser pseudoallergischer Reaktionen sind neben nicht-steroidalen Antiphlogistika häufig auch Nahrungsmitteladditiva. Für die atopische Dermatitis konnte eine Verschlechterung des Hautzustandes nach oraler Provokationstestung mit Nahrungsmitteladditiva in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. Ein in-vitro-Verfahren zur Diagnosestellung steht bisher nicht zur Verfügung.

In dieser Arbeit wurde im Cellulären-Antigen-Stimulationstest (CAST-ELISA) die Sulfidoleukotrienfreisetzung der basophilen Granulozyten von Patienten mit atopischer Dermatitis und positiver Provokationstestung auf Nahrungsmitteladditiva untersucht. Dazu wurden die Blutleukozyten isoliert und nach Aktivierung mit IL-3 mit gelösten Nahrungsmitteladditiva in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Anschließend erfolgte die Messung der freigesetzten Sulfidoleukotriene mittels ELISA-Technik.

Unterschieden wurden Diätansprecher (Verbesserung des Hautzustandes unter pseudoallergenarmer Diät), Kapselansprecher (Diäterfolg und positive orale Provokationstestung) sowie Nicht-Ansprecher.

Es wurde eine höhere Sulfidoleukotrienfreisetzung der Kapselansprecher nach Stimulation der Leukozyten mit Nitrit, Benzoat und Tartrazin gefunden. In der Kontrollgruppe, der Diätansprechergruppe und Nicht-Ansprechergruppe fand sich für keine der getesteten Substanzen eine erhöhte Leukotrienfreisetzung. Die basale Leukotrienfreisetzung ohne Stimulation war in der Kapselansprechergruppe und in der Diätansprechergruppe erhöht. Nach Inkubation mit der Stimulationskontrolle lag die Sulfidoleukotrienfreisetzung der Kapselansprechergruppe deutlich höher.

Damit ließ sich für die Probanden der Kapselansprechergruppe eine höhere Sulfidoleukotrienproduktion der basophilen Granulozyten nach Stimulation mit bestimmten Nahrungsmitteladditiva zeigen. Die Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung der Sulfidoleukotriene bei der Krankheitsentstehung schließen und weisen auf Nahrungsmitteladditiva als einen aggravierenden Faktor bei dieser Subgruppe von Patienten mit atopischer Dermatitis hin.

Dennoch waren Sensitivität und Spezifität der Messungen insgesamt zu niedrig, um die Bestimmung der Sulfidoleukotrienfreisetzung in-vitro als prädiktiven Test für einen möglichen Diäterfolg zu etablieren.



# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>3</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>9</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>10</b>
<b>2 STAND DER FORSCHUNG</b>	<b>10</b>
2.1 ATOPISCHE DERMATITIS	10
2.1.1 DEFINITION	10
2.1.2 EPIDEMIOLOGIE	11
2.1.3 KLINIK	11
2.1.3.1 Komplikationen	12
2.1.4 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE	12
2.1.4.1 Genetische Faktoren	12
2.1.4.2 Immunologische Faktoren	13
2.1.4.2.1 Rolle der T-Zellen	13
2.1.4.2.2 Zytokin-Profil der Haut	14
2.1.4.2.3 Keratinozyten	14
2.1.4.2.4 Antigen-präsentierende Zellen	14
2.1.4.2.5 Gestörte Barrierefunktion der Haut	15
2.1.4.3 Aggravierende Faktoren	16
2.1.4.3.1 Allergene	16
2.1.4.3.2 Autoallergene	16
2.1.4.3.3 Mikrobielle Einflüsse	17
2.1.4.3.1 Nicht-allergische Hypersensitivitätsreaktionen [siehe 2.2]	17
2.1.4.4 Rolle der Leukotriene [siehe 2.3]	17
2.1.4.5 unspezifische Provokationsfaktoren	18
2.1.5 DIAGNOSE DER ATOPISCHEN DERMATITIS	18
2.1.5.1 Testdiagnostik	19
2.1.5.1.1 Hauttestungen	19
2.1.5.1.2 Provokationstestungen	19
2.1.6 THERAPIE DER ATOPISCHEN DERMATITIS	19
<b>2.2 NICHT-ALLERGISCHE HYPERSENSITIVITÄTSREAKTION (PSEUDOALLERGISCHE REAKTION)</b>	<b>20</b>
2.2.1 NAHRUNGSMITTELADDITIVA	22

2.2.1.1	Nahrungsmitteladditiva und atopische Dermatitis	23
<b>2.3</b>	<b>LEUKOTRIENE</b>	<b>23</b>
2.3.1	BIOLOGISCHE WIRKUNGEN	24
2.3.2	BIOSYNTHESE	24
2.3.3	LEUKOTRIEN-REZEPTOREN UND REZEPTOR-ANTAGONISTEN	26
2.3.4	ROLLE DER LEUKOTRIENE BEI ATOPISCHEN ERKRANKUNGEN UND DER PSEUDOALLERGISCHEN REAKTION	26
2.3.5	WIRKUNG VON REZEPTOR-ANTAGONISTEN BEI ATOPISCHER DERMATITIS	27
<b>2.4</b>	<b>CELLULÄRER-ANTIGEN-STIMULATIONSTEST (CAST-ELISA)</b>	<b>27</b>
2.4.1	INHALATIONSALLERGENE	28
2.4.2	INSEKTENGIFTE	28
2.4.3	NAHRUNGSMITTELALLERGIEN	28
2.4.4	ALLERGISCHE UND PSEUDOALLERGISCHE ARZNEIMITTELREAKTIONEN	28
2.4.5	NAHRUNGSMITTELADDITIVA	29
<b>2.5</b>	<b>NAHRUNGSMITTELZUSATZSTOFFE UND TOMATEN</b>	<b>29</b>
2.5.1	ACCEPTABLE DAILY INTAKE (ADI-WERT)	29
2.5.2	FARBSTOFFE	29
2.5.2.1	Azofarbstoffe	29
2.5.2.1.1	Amaranth E123	30
2.5.2.1.2	Azorubin E122 (Carmoisin)	30
2.5.2.1.3	Cochenillerot A E124 (Ponceau 4R)	30
2.5.2.1.4	Gelborange S E110 (Sunsetgelb FCF)	30
2.5.2.1.5	Brilliant schwarz BN E151 (Schwarz BN)	31
2.5.2.1.6	Tartrazin E102	31
2.5.2.2	Weitere Farbstoffe	31
2.5.2.2.1	Chinolingelb E104	31
2.5.2.2.2	Eisenoxid E172 (Eisenhydroxid)	32
2.5.2.2.3	Erythrosin E127	32
2.5.2.2.4	Indigotin E132 (Indigokarmin)	33
2.5.2.2.5	Patentblau V E131	33
2.5.3	BENZOESÄURE E210, BENZOATE E211-213	33
2.5.4	NATRIUMNITRIT E250	34
2.5.5	KALIUMMETABISULFIT E224 (KALIUMDISULFIT)	34
2.5.6	NATRIUMSALICYLAT	35
2.5.7	KALIFORNISCHE FREILANDTOMATEN	35

<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>AUSWAHL DER PATIENTEN</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>EINTEILUNG DER STUDIENTEILNEHMER</b>	<b>36</b>
3.2.1	KONTROLLGRUPPE (KG)	36
3.2.2	DIÄTRESPONDER (DR)	37
3.2.3	KAPSELRESPONDER (KR)	37
3.2.4	NONRESPONDER (NR)	37
<b>3.3</b>	<b>CELLULÄRER-ANTIGEN-STIMULATIONSTEST (CAST-ELISA)</b>	<b>37</b>
3.3.1	TESTPRINZIP	37
3.3.2	VERWENDETE SUBSTANZEN UND VORVERSUCHE	39
3.3.2.1	Vorgefertigte Additiva	39
3.3.2.2	Inhaltsstoffe der Kapsel-Provokation	39
3.3.2.3	Tomate	41
3.3.2.3.1	Tomate-Rückstand	41
3.3.2.3.2	Tomate-Destillat	42
3.3.2.4	Festlegung der Grenzwerte	42
3.3.2.5	Vorversuche	43
<b>3.4</b>	<b>SOFTWARE UND MATHEMATISCHE FORMELN</b>	<b>43</b>
3.4.1	VIERFELDERTAFEL	43
<b>3.5</b>	<b>DURCHFÜHRUNG</b>	<b>43</b>
3.5.1	VERWENDETE REAGENZIEN (BÜHLMANN LABORATORIES AG, SCHWEIZ)	43
3.5.2	WEITERE REAGENZIEN	44
3.5.3	VERWENDETE GERÄTE UND MATERIALIEN	44
3.5.4	ISOLATION DER LEUKOZYTEN	44
3.5.5	ZELLSTIMULATION	45
3.5.6	BESTIMMUNG DER LEUKOTRIEN-KONZENTRATIONEN	46
3.5.7	BERECHNUNG DER LEUKOTRIEN-KONZENTRATIONEN	46
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>BASALE sLT-FREISETZUNG</b>	<b>47</b>
<b>4.2</b>	<b>STIMULATIONSKONTROLLE MIT ANTI-IGÉ-REZEPTORANTIKÖRPER</b>	<b>47</b>
<b>4.3</b>	<b>FARBSTOFF-MISCHUNG 1</b>	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>FARBSTOFF-MISCHUNG 2</b>	<b>49</b>
<b>4.5</b>	<b>TARTRAZIN</b>	<b>50</b>
4.5.1	STIMULATION MIT TARTRAZIN-KONZENTRATION VON 0,2µG/ML	50

4.5.2	STIMULATION MIT TARTRAZIN-KONZENTRATION VON 2µG/ML	51
4.5.3	STIMULATION MIT TARTRAZIN-KONZENTRATION VON 20 µG/ML	51
4.5.4	STIMULATION MIT TARTRAZIN-KONZENTRATION VON 200µG/ML	52
4.5.5	AUSWERTUNG ALLER KONZENTRATIONEN UND BEWERTUNG	52
<b>4.6</b>	<b>BENZOAT</b>	<b>53</b>
4.6.1	STIMULATION MIT BENZOAT-KONZENTRATION VON 0,2µG/ML	53
4.6.2	STIMULATION MIT BENZOAT-KONZENTRATION VON 2µG/ML	54
4.6.3	STIMULATION MIT BENZOAT-KONZENTRATION VON 20µG/ML	54
4.6.4	STIMULATION MIT BENZOAT-KONZENTRATION VON 200µG/ML	55
4.6.5	AUSWERTUNG ALLER KONZENTRATIONEN UND BEWERTUNG	55
<b>4.7</b>	<b>NITRIT</b>	<b>56</b>
4.7.1	STIMULATION MIT NITRIT-KONZENTRATION VON 0,2µG/ML	56
4.7.2	STIMULATION MIT NITRIT-KONZENTRATION VON 2µG/ML	57
4.7.3	STIMULATION MIT NITRIT-KONZENTRATION VON 20µG/ML	57
4.7.4	STIMULATION MIT NITRIT-KONZENTRATION VON 200µG/ML	58
4.7.5	AUSWERTUNG ALLER KONZENTRATIONEN UND BEWERTUNG	58
<b>4.8</b>	<b>METABISULFIT</b>	<b>59</b>
<b>4.9</b>	<b>SALICYLAT</b>	<b>60</b>
<b>4.10</b>	<b>STOFFE DER KAPSEL-PROVOKATIONSTESTUNG</b>	<b>61</b>
<b>4.11</b>	<b>TOMATE RÜCKSTAND</b>	<b>62</b>
<b>4.12</b>	<b>TOMATE-DESTILLAT</b>	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>66</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>		<b>73</b>
<b>DANKSAGUNG</b>		<b>79</b>
<b>ERKLÄRUNG</b>		<b>79</b>



## Abkürzungsverzeichnis

AD	Atopische Dermatitis
ADI	Acceptable daily intake
ASS	Acetylsalicylsäure
CAST	Cellulärer-Antigen-Stimulationstest
CCL	C-C Chemokin-Ligand
CCR	C-C Chemokin-Rezeptor
CLA	Cutaneus lymphocyte-associated antigen
Cys-LT	(Cysteinyl-)Leukotrien-Rezeptor
DR	Diätresponder
DZ	Dendritische Zelle
ECP	Eosinophilic cationic protein
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HETE	Hydroxy-Eicosatetraensäure
HPETE	Hydroperoxy- Eicosatetraensäure
IDEC	Inflammatorische dendritische epidermale Zelle
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KG	Kontrollgruppe
KR	Kapselresponder
LO	Lipoxygenase
LT (A4-E4)	Leukotrien (A4-E4)
LZ	Langerhans-Zelle
MCP	Monocyte chemotactic protein
MDC	Macrophage-derived chemokin
MIP	Monocyte inflammatory peptid
NR	Nonresponder
NSAID	Nicht-steroidale Antiphlogistika
OD	Optische Dichte
PAR	Pseudoallergische Reaktion
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (C-C Chemokin)
sLT	Sulfidoleukotrien
TARC	Thymus and activation regulated cytokin
TIM	Topische Immunmodulatoren
TNF	Tumor necrosis faktor
TSLP	Thymic stromal lymphopietin

# 1 Einleitung

Die atopische Dermatitis ist eine dem Formenkreis der Atopie zugehörige chronisch-entzündliche, pruriginöse Hauterkrankung, deren Inzidenz in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen hat. Die Ätiologie ist multifaktoriell. Neben einer genetischen Disposition spielen immunologische Veränderungen mit veränderter T-Zellfunktion, abberierendem Zytokinmuster und gestörter Barrierefunktion der Haut eine Rolle. Bei 80% der Patienten liegen IgE-vermittelte Sensibilisierungen vor. Neben den allergischen Mechanismen nehmen bei einem Teil der Patienten auch nicht-allergische Mechanismen wie die nicht-allergische Hypersensitivitätsreaktion (Pseudoallergische Reaktion) Einfluss auf die atopische Dermatitis. Auslöser sind neben nicht-steroidalen Antiphlogistika häufig auch Nahrungsmitteladditiva.

Besonders für die chronische Urtikaria, aber auch für die AD konnte eine Verbesserung des Hautzustandes nach Vermeidung von Nahrungsmitteladditiva belegt werden [42,115,110,102]. Der Nachweis erfolgt meist über Auslassdiäten und anschließenden oralen Provokationstestungen. Ein zuverlässiges in-vitro-Testverfahren steht bisher noch nicht zur Verfügung.

Für die pseudoallergische Reaktion (PAR) ist die Schlüsselrolle der Leukotriene seit langem bekannt und in den letzten Jahren auch für die atopische Dermatitis in das Interesse der Forschung gerückt. Für beide Erkrankungen ist eine Aktivierung basophiler Granulozyten nachgewiesen worden.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich bei Patienten mit atopischer Dermatitis und im oralen Provokationstest nachgewiesener Intoleranz gegenüber Nahrungsmittelzusatzstoffen eine erhöhte Sulfidoleukotrienfreisetzung nach Stimulation der basophilen Granulozyten mit diesen Substanzen zeigen lässt. Verwendet wurde der Celluläre-Antigen-Stimulationstest (CAST-ELISA), ein Verfahren, in dem die Sulfidoleukotrienfreisetzung der Basophilen nach Stimulation mit Allergenen oder Pseudoallergenen gemessen wird.

## 2 Stand der Forschung

### 2.1 Atopische Dermatitis

#### 2.1.1 Definition

Die atopische Dermatitis (AD) wurde erstmals 1882 von Besnier umfassend beschrieben [4].

Sie ist definiert als ekzematös-pruriginöse Hauterkrankung, die in der Morphologie altersabhängig ist, ausgesprochen variabel sein kann und in der Regel einen chronisch-rezidivierenden Verlauf nimmt [8,2].

Kennzeichnend sind relativ unspezifische Hautsymptome wie ekzematöse Veränderungen, trockene Haut und der starke Juckreiz [8].

Ätiopathogenetisch spielen bei ihrer Ausbildung genetische Faktoren eine Rolle. So finden sich in der Familienanamnese häufig Typ I Allergien, allergisches Asthma bronchiale oder die allergische Rhinokonjunktivitis, die zusammen den Formenkreis der Atopie bilden. Neben der genetischen Disposition wird die Erkrankung entscheidend von einem breiten Spektrum endogener und exogener Faktoren moduliert [11].

### 2.1.2 Epidemiologie

Die atopische Dermatitis ist vor allem eine Erkrankung des Kindes und Jugendalters. In diesem Lebensalter tritt sie mit einer Prävalenz von 10-20% auf [70]. Der Gipfel der Inzidenz liegt in den ersten drei Lebensmonaten [80].

Für die Gesamtbevölkerung wird eine Prävalenz von 1-3% angegeben [80,70]. Die Inzidenz ist stark zunehmend, man geht von einer Verdoppelung bis Verdreifachung in den letzten drei Jahrzehnten aus [70].

Für diese Steigerung sind auch sozioökonomische Faktoren von Bedeutung. Die urbane Bevölkerung ist stärker betroffen als die ländliche, es besteht eine erhöhte Prävalenz bei den höheren sozialen Klassen. Als Ursache werden nach der Hygiene-Hypothese [88] der höhere Lebensstandard mit den verbesserten hygienischen Verhältnissen, verminderten Infektionen, Einsatz von Antibiotika und Impfstrategien vermutet, sowie das veränderte Wohnklima, welches das Wachstum von Hausstaubmilben und die Anreicherung von Schadstoffen begünstigt.

In 65% der Fälle wird die Erkrankung im Säuglingsalter manifest, 90% der Patienten entwickeln Symptome bis zum 5. Lebensjahr. Häufig ist ein chronisch-phasenhafter Verlauf mit möglichen Spontanremissionen, 30-40% der kleinen Patienten sind im weiteren Verlauf beschwerdefrei [8,11]; die Rückbildungsrate bis zur Adoleszenz beträgt bis zu 80% [11].

### 2.1.3 Klinik

Das klinische Bild ist nicht einheitlich und variiert in Abhängigkeit von Lebensalter und Dauer der Erkrankung. Insgesamt ist der Verlauf phasisch. Es können zum Teil jahrelange symptomarme oder symptomfreie Intervalle auftreten.

Wesentliches Kennzeichen der atopischen Dermatitis und in allen Lebensaltern auftretend ist der starke Juckreiz. Neben den chronischen Hautveränderungen trägt auch er durch das konsekutive Kratzen zur Lichenifikation bei [2]. Die Hautveränderungen sind meist symmetrisch lokalisiert.

Im Säuglings und Kleinkindalter überwiegt ein exsudativ-entzündliches Bild mit Rötung, Bläschen und Krusten (Leiteffloreszenz: Papulovesikel) vor allem im Bereich der Wangen und des Kapillitiums. Im akuten Intervall bilden sich Bläschen. Diese Läsionen nässen; das Exsudat trocknet ein und bildet mit den Schuppen Verkrustungen. Von der morphologischen Ähnlichkeit mit verbrannter Milch leitet sich die Bezeichnung „Milchschorf“ ab (Wichmann 1794 [5]). Selten sind auch die Streckseiten der Arme und Beine betroffen [11,7,2].

Im Kindesalter bis 12 Jahren ist der Verlauf subakut-chronisch; es sind vorwiegend die großen Gelenkbeugen wie Ellenbogen, Kniekehlen, Hand- und Fußgelenke, der Hals, Gesicht und häufig die Hände betroffen. Es überwiegen papulöse Veränderungen mit starkem Juckreiz und beginnender Lichenifikation; die Haut ist sehr trocken (Sebostase beziehungsweise Asteatose) [11,2,4].

Im Jugend- und Erwachsenenalter steht meist ein chronisch-lichenifiziertes Ekzem-Bild mit akuten Exazerbationen im Vordergrund. Oft ist zusätzlich der Oberkörper befallen, eventuell auch die Kopfhaut [11]. Es finden sich flächenhaft entzündlich-infiltrierte Herde bei verdickter Haut und vergrößerter Hautfelderung (Lichenifikation) sowie Schuppung, auch hier ist die Haut trocken und nicht selten hyperkeratotisch [8]. Neben entzündlicher Rötung und Lichenifikation finden sich Prurigopapeln, die den Erwachsenen-Typ dominieren.

Bei Jugendlichen und Erwachsenen kommen neben dem Vollbild häufig mehr lokalisierte Formen und Minimalvarianten zum Ausdruck wie das nummuläre atopische Ekzem (umschriebene, gering entzündlich infiltrierte, gerötete Herde mit pityriasiformer Schuppung, gelegentlich Depigmentierung), Ohrläppchenrhagaden, Cheilitis sicca und Pulpitis sicca, isolierte Ekzeme an Händen, Handrücken, Kopfeckzema mit Exkoriationen [2].

Häufig finden sich zusätzlich eine Reihe von assoziierten Symptomen, die aber nicht obligat vorhanden sein müssen:

- Laterale Reduktion der Augenbrauen (Hertoghe-Zeichen)
- typische Unterlidfalte (Dennie-Morgan-Zeichen)
- Fehlende Schläfenwinkel im Haaransatz
- Blässe des Gesichts mit infraorbitalen Schatten
- Pityriasis alba
- vermehrte Fältelung der Lippen (Pseudo-Parret-Furchen) [2]
- vermehrte und vertiefte Furchung palmar und plantar (Ichthyosishand)
- Juckreiz nach Schwitzen, Baden und Duschen, Seifenempfindlichkeit
- Wollunverträglichkeit
- IgE-Erhöhung im Serum
- Weißer Dermographismus und verzögerte und paradoxe Weißreaktion [2] als Zeichen einer neurovegetativen Regulationsstörung
- Augenveränderungen: Keratokonus, Neurodermitiskatarakt, sehr selten Ablatio retinae

#### *2.1.3.1 Komplikationen*

Besonders im Kleinkindalter kann es zu Sekundärinfektionen kommen, vor allem mit Streptokokken und Staphylokokken, aber auch Viren (Molluscum-contagiosum-Virus, Herpes-Simplex-Virus, Verrucae vulgares) und Pilzbesiedlung (Candida albicans) [8]. Gefürchtet ist das Ekzema herpeticatum, der disseminierte Befall mit Herpes-Simplex-Viren, der bei schwerem Verlauf lebensbedrohlich sein.

#### *2.1.4 Ätiologie und Pathogenese*

Die Ursachen für die atopische Dermatitis sind vielfältig. Neben der genetischen Disposition tragen Umweltfaktoren, immunologische Veränderungen und die gestörte Barrierefunktion der Haut zur Krankheitsentstehung bei.

##### *2.1.4.1 Genetische Faktoren*

Es besteht eine genetische Basis; der Erbgang ist vermutlich polygen, ein Einfluss des HLA-Systems konnte nicht nachgewiesen werden [8]. Vererbt wird nicht die atopische Dermatitis, sondern die Disposition zu Erkrankungen des atopischen Formenkreises. Besteht bei einem Elternteil eine atopische Erkrankung, so liegt die Erkrankungswahrscheinlichkeit für das Kind bei 25-30%. Sind beide Elternteile erkrankt, ist die Erkrankungswahrscheinlichkeit mit 60-70% wesentlich höher mit einem erhöhtem Risiko bei erkrankter Mutter (maternale Prägung) [88]. Die Konkordanzrate für die atopische Dermatitis liegt bei eineiigen Zwillingen bei 72-86%, bei zweieiigen Zwillingen bei 21-23% [70]. Bei 60-70% der Patienten ist die Familienanamnese positiv [2].

Neuere Untersuchungen haben unter anderem Kandidatengene für IgE und TH2-Zytokine identifiziert. Ein spezieller Fokus liegt dabei auf dem Chromosom 5q31-33, welches eine Genfamilie für TH2-Zytokine (zum Beispiel IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 und

GM-CSF) enthält [70].

Eine Untersuchung an deutschen und skandinavischen Kindern identifizierte ein Gen auf Chromosom 3q21, welches die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 kodiert und dadurch die T-Zell-Antwort modifiziert [70].

Gemeinsame Kandidatengene mit der Psoriasis konnten hauptsächlich auf den Chromosomen 1q21 und 17q25 lokalisiert werden, was für eine gemeinsame Regulation entzündlicher Hauterkrankungen spricht [80].

#### 2.1.4.2 Immunologische Faktoren

Es werden zwei Formen der AD unterschieden. Bei der *extrinsischen Form* (extrinsic atopic dermatitis, EAD), von der 70-80% der Patienten betroffen sind, liegt eine IgE-vermittelte Sensibilisierung, vor allem auf Nahrungsmittel- und Aeroallergene, vor. Bei der *intrinsischen Form* (intrinsic atopic dermatitis, IAD), die bei 20-30% der Patienten auftritt, sind solche Sensibilisierungen nicht nachzuweisen mit negativem spezifischem IgE und Prick-Test. Bei beiden Formen findet man eine periphere Eosinophilie.

Bei der extrinsischen Form produzieren antigenspezifische aktivierte T-Zellen, die den hautspezifischen Rezeptor CLA (cutaneus lymphocyte-associated antigen) aufweisen, vermehrt TH2-typische Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-13). Bei der intrinsischen Form findet man eine geringere Produktion von IL-4 und IL-13 als bei der extrinsischen Variante [70].

In Verlaufsstudien wurde nachgewiesen, dass Kinder, die zunächst von der intrinsischen Form der AD betroffen waren, im Verlauf von 5-10 Jahren Sensibilisierungen entwickelten und die AD damit in die extrinsische Form übergang. Dies legt nahe, dass die intrinsische Form die primäre Form der AD darstellt [80].

##### 2.1.4.2.1 Rolle der T-Zellen

T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der AD. Dies wird auch anhand anderer immunologischer Erkrankungen deutlich. Bei Patienten mit primärer T-Zell-Defizienz findet man erhöhte Serum-IgE-Spiegel und ekzematöse Hautveränderungen, die nach erfolgreicher Knochenmarkstransplantation rückläufig sind [70].

Im Rahmen des Atopie-Patch-Testes (siehe Hauttestungen) wurde der biphasische Charakter der AD belegt. Nach Applikation bei Patienten mit AD findet sich in der initialen Phase eine Immunantwort vom TH2-Typ mit Produktion hoher Mengen von IL-4, IL-5 und IL-13, wenig IFN $\gamma$ . Gleichzeitig nimmt die Zahl der IgE-tragenden Langerhans-Zellen und IDEC zu. Nach 48-72 Stunden kommt es zu einer Umwandlung der TH2-Antwort in eine Immunantwort vom TH1-Typ mit Produktion von IFN $\gamma$ . Dieser Wechsel ist vermutlich durch die Produktion von IL-12 durch einwandernde Eosinophile und IDEC gefördert [80].

IL-4 und IL-13 induzieren einen Isotypenwechsel der Antikörper von IgG4 zu IgE [7]; IL-5 wirkt aktivierend auf eosinophile Granulozyten [80]. IFN $\gamma$ , ein TH1-typisches Zytokin, inhibiert die TH2-Zellfunktion und die IgE-Synthese. IL-4, IL-5 und IFN $\gamma$  scheinen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung juckender Hautläsionen, Eosinophilen-Infiltration und Hautverdickung zu spielen, wie sich im Tierversuch mit Mäusen nachweisen ließ [70].

Der von aktivierten T-Zellen exprimierte Fas-Ligand induziert eine Apoptose von Keratinozyten. Dies führt zur Entstehung der Spongiose, die man bei der akuten AD beobachtet. Durch den Untergang der Keratinozyten werden zudem potentielle Autoal-

lergene freigesetzt. Dieses Phänomen steht unter dem Einfluß von  $\text{IFN}\gamma$ , welches die „Up-Regulation“ von Fas auf Keratinozyten fördert [80].

#### 2.1.4.2.2 Zytokin-Profil der Haut

In der atopischen Haut findet sich ein verändertes Zytokin-Profil. Gewebsständige Zellen wie Keratinozyten, Mastzellen und dendritische Zellen (DZ) setzen infolge von mechanischer Irritation und Stimulation durch proinflammatorische Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und IL-1 frei, die an Rezeptoren des vaskulären Endothels binden und die Migration inflammatorischer Zellen induzieren. Diese folgen im Gewebe den chemotaktischen Gradienten verschiedener Chemokine und Zytokine.

In akuten Läsionen finden sich erhöhte Level von IL-16, welches chemotaktisch auf  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen wirkt. Das mit der Haut assoziierte CCL27 (C-C Chemokin-Ligand 27) fördert die Einwanderung  $\text{CLA}^+$ -T-Zellen. Ebenfalls in den Hautläsionen erhöht sind die Chemokine RANTES, MCP4 (monocyte chemotactic protein) und Eotaxin, die zur Chemotaxis von Eosinophilen, Makrophagen und TH2-Zellen beitragen.

Die persistierende Entzündung in den chronischen Läsionen ist vermutlich auch durch das erhöhte IL-5 und GM-CSF vermittelt, welche die Lebensdauer von Eosinophilen, Makrophagen und Langerhans-Zellen erhöhen.

Gefunden worden sind auch erhöhte Level von TARC (thymus and activation regulated cytokin) und MDC (macrophage-derived chemokine), die die selektive Rekrutierung von CCR4 (C-C Chemokin-Rezeptor 4)-exprimierender TH2-Zellen vermitteln.

#### 2.1.4.2.3 Keratinozyten

Keratinozyten setzen nach mechanischer Stimulation wie Kratzen  $\text{TNF}\alpha$  und andere proinflammatorische Zytokine frei. In der atopischen Haut finden sich nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  stark erhöhte Konzentrationen von RANTES. Ebenfalls nur in atopischer Haut produzieren Keratinozyten das ‚thymic stromal lymphopoietin‘ aus Keratinozyten, welches dendritische Zellen zum Priming naiver T-Zellen zur TH2-Differenzierung aktiviert. Möglicherweise ist dieser Zusammenhang das Bindeglied zwischen der der TH2-vermittelten Hautentzündung und der mechanischen Irritation als Triggerfaktor.

Die Syntheseleistung der Keratinozyten für antimikrobielle Peptide (Defensine, Cathelicidin) ist herabgesetzt [70].

#### 2.1.4.2.4 Antigen-präsentierende Zellen

Neben den klassischen Langerhans-Zellen, die auch in normaler, nicht-atopischer Haut zu finden sind, wurden IgE-tragende dendritische Zellen identifiziert, die den hochaffinen IgE-Rezeptor ( $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ ) als IgE-bindende Struktur tragen und nur in atopischer Haut vorkommen. Eine zweite Population von DZ, die nur in entzündlich veränderter, läsionaler Haut gefunden wird, sind die inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDEC). Sie weisen die höchste  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -Expression in der Haut auf und werden in nicht-affizierter Haut von AD-Patienten und bei Gesunden nicht gefunden. In der akuten Phase werden sie aus dermalen oder zirkulierenden Vorläufern rekrutiert. Im akuten Schub nimmt daher die Anzahl zirkulierender IDEC-Vorläufer im Blut ab und steigt im Abheilungsprozess der Haut wieder an.

Über die gestörte Hautbarriere dringen inhalative Allergene in die Haut ein und werden an  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ / IgE-tragende DZ gebunden. An  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -gebundenes IgE erleichtert die Bindung und Internalisierung von Allergenen, die nachfolgend in den DZ prozessiert und den spezifischen T-Zellen in der atopischen Haut präsentiert werden. Dies führt

zu einer Zunahme der Entzündungsreaktion und zur Auswanderung der DZ in die regionären Lymphknoten, wo naive T-Zellen so zur TH2-Zell-Differenzierung stimuliert werden [80].

#### 2.1.4.2.5 Gestörte Barrierefunktion der Haut

Bei der atopischen Dermatitis ist die 6-Delta-Desaturase vermindert oder fehlt völlig. Dieses Enzym metabolisiert die Linolsäure zu  $\gamma$ -Linolensäure, die für die Bildung epidermaler Ceramide notwendig ist [7,2,56].

Ceramide dienen als die hauptsächlichsten wasserbindenden Moleküle im Extrazellulärraum der Haut. Die Barrierestruktur dieser komplexen Strukturen ist durch eine Matrix von Strukturproteinen gegeben, die an Ceramide gebunden sind. Eine geringere Menge von Ceramiden ist in den Läsionen sowie auch in nicht-affizierter Haut zu finden. Noch ist dabei ungeklärt, ob es sich um ein primäres Phänomen als Ausdruck eines intrinsischen Defektes der Keratinozyten oder die Folge der lokalen Entzündung handelt [80].

Der Mangel an Ceramiden verursacht die oft sehr trockene Haut (Xerodermie) und die beeinträchtigte Barrierefunktion der Haut, die mit transepidermale Wasserverlust und erleichterter Penetration von Antigenen einher geht.

Die kutane Abwehr ist dementsprechend beeinträchtigt; es findet sich eine vermehrte Hautbesiedlung mit *Staphylococcus aureus* sowie gehäufte bakterielle, virale und mykotische Infektionen [8]. Dem liegt neben der gestörten Barrierefunktion der Haut und der hohen mikrobiellen Besiedlung auch ein Mangel an Defensinen zugrunde. Defensine sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und für eine zügige und effektive Abwehr von eindringenden Mikroben und mikrobiellen Proteinen zuständig [80].

Als mögliche Ursache der verminderten Abwehr gegenüber Viren wird außerdem der Mangel an plasmazytoiden dendritischen Zellen in der Haut diskutiert. Sie bilden eine Untergruppe der DZ und produzieren Typ-1-Interferone zur Abwehr viraler Infektionen [80].

Die dünne Hornschicht und die hohe Irritabilität führen zu einer verminderten Alkali-resistenz, d.h. zu einer Schädigung der Pufferkapazität [5] und Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich [80].

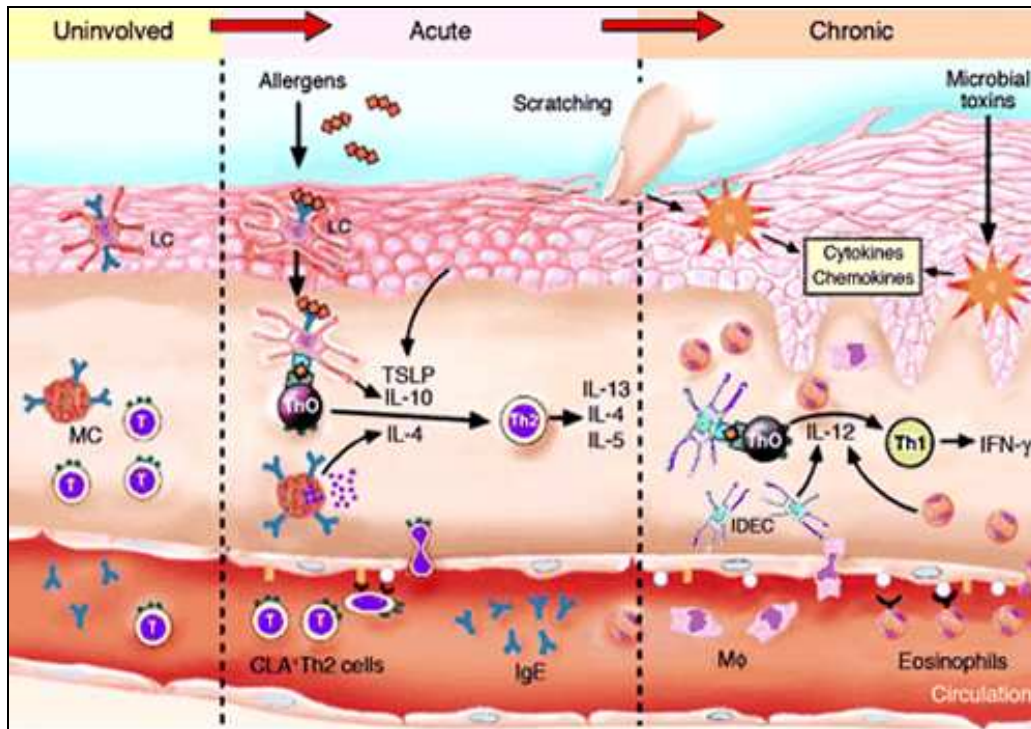


Abb. 1: CLA<sup>+</sup>-TH2-Zellen zirkulieren in nicht-affizierter Haut und können allergen-getriggert IgE-tragende LZ und Mastzellen aktivieren, die wiederum die TH2-Entwicklung verstärken. Durch Kratzen, Einfluss von Umweltallergenen oder mikrobiellen Toxinen werden Keratinozyten zur Freisetzung proinflammatorischer Zyto- und Chemokine angeregt, die die Expression von Adhäsionsmolekülen des vaskulären Endothels induzieren und so die Migration von Entzündungszellen fördern. Auch das von Keratinozyten produzierte TSLP und IL-10 (DZ) verstärken die TH2-Entwicklung. In den chronischen Läsionen ist die Anzahl von IDEC, Makrophagen und Eosinophilen erhöht. Das von diesen Zellen freigesetzte IL-12 fördert den Switch zu einem TH1-dominiertem Zytokinmilieu mit erhöhter Produktion von IFN $\gamma$ . LC: Langerhans-Zelle, MC: Mastzelle, M $\Phi$ : Makrophage. Quelle: [70], mit freundlicher Genehmigung des Copyright Clearance Center

#### 2.1.4.3 Aggravierende Faktoren

Es gibt eine Reihe von exogenen und endogenen Faktoren, die die Manifestation und den Verlauf der Erkrankung entscheidend mitbestimmen [11].

##### 2.1.4.3.1 Allergene

Bei der extrinsischen Form spielen Allergene eine wichtige Rolle. In der Frühphase bis etwa zum 3. Lebensjahr bestehen meist Nahrungsmittelallergien, die bei 40% der Kinder mit mittelschwerer AD zu einer Verschlimmerung der Erkrankung führen. Häufig finden sich Sensibilisierungen auf Milcheiweiß, einige Fischarten, Eier, Erdnuss, Soja, Weizen, Obst und Gemüse mit erhöhtem spezifischem IgE, positivem Prick- und Scratchtest. Im weiteren Verlauf verschwindet die Sensibilisierung auf die meisten Nahrungsmittelallergene, Sensibilisierungen auf Fisch und Erdnuss persistieren häufig lange [80].

Später nimmt die Empfindlichkeit gegenüber Inhalationsallergenen wie Hausstaubmilben, Tierhaaren und -epithelien, Pollen und Gräsern zu. Bei den erwachsenen Patienten mit AD, die eine Intoleranz gegenüber Nahrungsmitteln aufweisen, liegt häufig auch eine Kreuzreaktion mit inhalativen Allergenen zugrunde [93].

##### 2.1.4.3.2 Autoallergene

Besonders bei schwerer AD stellen Autoantigene einen Triggerfaktor dar. Als Autoantigene wurden hauptsächlich intrazelluläre Proteine identifiziert, gegen die IgE-Antikörper gebildet werden. Im Serum von Patienten mit schwerer AD ließen sich



intrazelluläre Proteine in IgE-Immunkomplexen nachweisen [70]. Zu diesen Proteinen zählen auch Autoantigene, die mit Inhalations- und Nahrungsmittelallergenen kreuzreagieren, sowie Atopie-assoziierte Autoantigene (ARA) und strukturell modifizierte Autoantigene, die als fremd erkannt werden [80].

Vermutet wird, dass durch die mechanische Schädigung (Kratzen) Autoallergene aus dem Zellinneren freigesetzt werden und Mastzellen, autoreaktive T-Zellen und dendritische Zellen aktivieren. Dies würde bedeuten, dass durch das heftige Kratzen ein Circulus vitiosus in Gang gesetzt wird mit primärer Sensibilisierung auf Umweltallergene und Unterhaltung der allergischen Entzündung durch Reaktion auf humane endogene Proteine [70].

#### 2.1.4.3.3 Mikrobielle Einflüsse

Haut und Nasenhöhlen von AD-Patienten sind häufig bis zu einer Dichte von 1 Million/cm<sup>2</sup> mit *Staphylococcus aureus* besiedelt. Das häufige Kratzen, die gestörte Hautbarriere und Adhäsine erleichtern das Eindringen der Bakterien in die Haut. *Staphylococcus aureus* produziert in hohen Mengen Enterotoxine (Superantigene), gegen die sich ein Teil der Patienten sensibilisiert. Die Menge des allergenspezifischen IgE gegen diese Enterotoxine korreliert direkt mit der Krankheitsaktivität. Die Superantigene aktivieren Makrophagen und T-Zellen, sie können regulär über die MCH-II-Domäne den T-Zellen präsentiert werden und eine antigenspezifische T-Zellproliferation induzieren. Auch eine direkte Stimulation der T-Zellen unabhängig von der Antigen-spezifität und mit Überbrückung der MCH-II-vermittelten Präsentation ist beschrieben worden. Es besteht außerdem der Verdacht, dass Superantigene über die Veränderung der Glucokortikoid-Rezeptoren zur Steroidresistenz einiger Patienten beitragen.

Besonders bei der „head and neck“-Form der AD kann spezifisches IgE gegen *Pityrosporum ovale* nachgewiesen werden. Auch allergenspezifisches IgE gegen *Candida albicans* wurde gefunden [80,70].

#### 2.1.4.3.1 Nicht-allergische Hypersensitivitätsreaktionen [siehe 2.2]

Neben den beschriebenen allergischen Mechanismen nehmen auch pseudoallergische Reaktionen, vor allem auf Nahrungsmittel und Nahrungsmitteladditiva, Einfluss auf die AD [siehe Nahrungsmitteladditiva und atopische Dermatitis].

Als Auslöser werden Konservierungsmittel (Benzoat, Nitrit, Nitrate, Sulfit), Geschmacksverstärker (Glutamat), Farbstoffe (vor allem Azofarbstoffe), Antioxidantien und Salicylat beschrieben.

In verschiedenen Studien wurde eine Verbesserung des Hautzustandes nach einer Eliminationsdiät mit pseudoallergenarmer Kost und eine Ekzemverschlechterung nach anschließenden offenen oder doppelblinden Provokation nachgewiesen [100,110,102,49,61].

#### 2.1.4.4 Rolle der Leukotriene [siehe 2.3]

Die Rolle der Leukotriene bei der Entstehung der AD wurde in den letzten Jahren zunehmend erforscht. Gefunden wurden erhöhte Leukotrien B<sub>4</sub>-Konzentrationen in der atopischen Haut, erhöhte Leukotrienspiegel im Urin in Korrelation mit dem klinischen Hautzustand sowie eine höhere Leukotrienproduktion der basophilen Granulozyten nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus*.

Auch die gute Wirksamkeit von Leukotrien-Rezeptorantagonisten weist auf die Beteiligung von Leukotrienen bei der atopischen Dermatitis hin.

#### 2.1.4.5 unspezifische Provokationsfaktoren

Als unspezifische Provokationsfaktoren können Irritanzien, Wolle und Luftschadstoffe und Fruchtsäuren (besonders Zitrusfrüchte) durch Kontaktirritation den Ekzemverlauf beeinflussen.

Auch Stress induziert immunologische Veränderungen und kann in Verbindung mit Kratzen zu einer Exazerbation führen [70].

#### 2.1.5 Diagnose der atopischen Dermatitis

Die Diagnosestellung erfolgt meist nach den klinischen Kriterien, die 1980 von Hanifin und Rajka [51] entwickelt wurden. Die Symptome wurden in Haupt- und Nebenkriterien unterteilt, von denen mindestens je drei erfüllt sein müssen [5].

##### Hauptkriterien:

- Pruritis
- typische Morphe und Lokalisation: Lichenifikation und vergrößerte Hautfalten der Beugen bei Erwachsenen; bei Kindern Gesichts- und Streckseitenbeteiligung
- chronischer oder chronisch-rezidivierender Verlauf
- positive Eigen- oder Familienanamnese für Atopie (Asthma bronchiale, allergische Rhinokonjunktivitis, atopische Dermatitis)

##### Nebenkriterien:

- Xerodermie
- Ichthyosis vulgaris (hyperlineare Palmar, folliculäre Hyperkeratosen)
- positive Hauttests vom Soforttyp
- erhöhtes Serum-IgE
- früher Erkrankungsbeginn
- Neigung zu Hautinfektionen (besonders Staphylococcus aureus und Herpes simplex)
- Neigung zu Hand- und Fußekzemen
- Mamillenekzem
- Cheilitis, Perioralekzem
- Pityriasis alba
- Rhagaden (Unterlippe, Mundwinkel, retroaurikulär)
- rezidivierende Konjunktivitis
- infraorbitale Lidfalte (Dennie-Morgan-Zeichen), Lidexzem
- laterale Reduktion der Augenbrauen (Hertoghe-Zeichen)
- Augenveränderungen (Keratokonius, Katarakt)
- halonierte Augen
- Gesichtsblässe, Gesichtsekzem
- Halsfalten
- Juckreiz durch Schwitzen
- Wollunverträglichkeit
- Nahrungsmittelunverträglichkeit
- weißer Dermographismus
- Verlauf abhängig von exogenen und emotionalen Faktoren

### 2.1.5.1 Testdiagnostik

Die Diagnosestellung erfolgt in erster Linie klinisch. Zur Untermauerung der Diagnose und zum Nachweis IgE-vermittelter Sensibilisierungen stehen eine Reihe weiterer Tests wie Hauttestungen und Bestimmung von Serum-IgE und ECP zur Verfügung.

Bei den Hauttestungen und der Bestimmung des IgE's muss beachtet werden, dass ein positives Testergebnis lediglich eine Sensibilisierung belegt, die nicht mit einer manifesten Allergie gleichzusetzen ist.

Mithilfe des Costa-Scores [32] und des SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis) kann die Schwere der Hautveränderungen beurteilt werden.

#### 2.1.5.1.1 Hauttestungen

Der Pricktest, Scratch-, Intradermal- und Epicutantest werden seit langem zum Nachweis IgE-vermittelter Sensibilisierungen verwendet.

Der *Atopie-Patch-Test* ist ein neuerer Test, bei dem Aeroallergene nach Art des Epicutantests auf nicht-affizierter Haut appliziert werden. Nach 48 Stunden kann bei Vorhandensein einer Sensibilisierung das Auftreten einer IgE-vermittelten ekzematösen Hautreaktion beobachtet werden. Die Entwicklung des Atopie-Patch-Tests ermöglichte erstmals molekularbiologische Analysen der frühen Hautläsionen mit Hinweisen auf den biphasischen Charakter der AD [88]. Die Spezifität des Atopie-Patch-Tests liegt mit 69-92% recht hoch; im Vergleich ergab sich für den Prick-Test (69-82%) und bei der Bestimmung des spezifischen IgE (65-94%) eine höhere Sensitivität [36].

#### 2.1.5.1.2 Provokationstestungen

Nach sorgfältiger Indikationsstellung können auch orale Provokationstestungen durchgeführt werden. Provokationstests bergen jedoch ein nicht unerhebliches Risiko und sollten gegebenenfalls unter stationären Bedingungen durchgeführt werden. Besonders bei der nicht-IgE-vermittelten Hypersensitivitätsreaktion sind orale Provokationstestungen häufig unumgänglich.

### 2.1.6 Therapie der atopischen Dermatitis

Die Behandlung der AD besteht aus einem multimodalen Ansatz und richtet sich nach dem klinischen Erscheinungsbild. Basis ist die konsequente *Rückfettung und Rehydrierung* der Haut durch Cremes und Salben, um die reduzierte Barriere- und Schutzfunktion der Haut zu verbessern. Ebenfalls grundlegend ist die Vermeidung von Irritantien und die Reduktion von Nahrungsmittel- und inhalativen Allergenen.

*Topische Corticosteroide* werden seit langem zur Behandlung der AD eingesetzt und eignen sich zur Behandlung akuter und chronischer Läsionen. Bei akuter Exazerbation können Cortikoide für begrenzte Zeit auch systemisch angewendet werden. Bei beiden Applikationsformen sind Nebenwirkungen und Langzeitschäden problematisch. Studien mit Fluticason-17-propionat haben gezeigt, dass nach Abklingen der akuten Läsionen durch eine Anwendung zwei mal pro Woche eine langfristige Stabilität erzielt werden kann [70].

Wichtig ist auch die *Behandlung von Superinfektionen* (Staphylococcus aureus, Pityrosporum ovale, Candida albicans, Herpes simplex). Nach antibiotischer oder fungistatischer Therapie lässt sich häufig eine Verbesserung des klinischen Hautzustandes erzielen. Besonders bei vermehrter Besiedlung der Haut mit Staphylococcus aureus profitieren die Patienten von einer kombinierten Therapie aus Glucokortikoiden und antibiotischer Behandlung.

Neuere Medikamente sind die sogenannten *topischen Immunmodulatoren* (TIM), zu denen Tacrolimus und Pimecrolimus zählen. Sie gehören zur Klasse der Makrolide und sind Abkömmlinge von Ascomycin, das systemisch in der Transplantationsmedizin schon lange verwendet wird. Als Lokalthapeutikum wirken sie nicht immunsuppressiv, sondern immunmodulierend. Sie binden hochselektiv an spezifische zytoplasmatische Immunophiline, die die Phosphatase Calcineurin inhibieren und so die Aktivierung verschiedener Schlüsselzellen wie T-Zellen und Makrophagen hemmen. Bei topischer Anwendung zeigen sie im Gegensatz zu Steroiden auch bei langfristiger Anwendung keine relevanten Nebenwirkungen. Die systemische Absorption dieser Verbindungen ist gering; Langzeitanwendung sollte aber sorgfältig überwacht werden [80,70]. Klinisch kommt es schon nach kurzer Anwendung zur Verbesserung der Hautveränderungen.

In jüngerer Zeit kommen zunehmend *Leukotrien-Antagonisten* wie Montelukast zum Einsatz, die selektiv die Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptoren (Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptor) blockieren. Der exakte Wirkungsmechanismus bei der atopischen Dermatitis ist noch ungeklärt [83]. Sie wurden zunächst zur Behandlung von Asthma bronchiale erforscht und eingesetzt, wo sie als deutlich effektiver als Placebo, aber weniger wirksam als inhalative Glucokortikoide eingeschätzt wurden [50,94]. Die Wirksamkeit bei der Behandlung der atopischen Dermatitis ist bisher umstritten. In einigen der dazu durchgeführten Studien konnte eine Verbesserung des Hautzustandes nachgewiesen werden [22,84,82]; in anderen Untersuchungen fand sich kein Hinweis auf eine Wirksamkeit [30,101]. Gemeinsam sind allen Arbeiten die eher geringen Fallzahlen.

Zur Anwendung kommen auch *weitere Medikamente* wie Antihistaminika, die den Juckreiz vermindern; sedierende Antihistaminika können vor allem zur Nacht angewendet werden. Doxepin hat neben den antidepressiven und sedierenden Eigenschaften auch H<sub>1</sub>- und H<sub>2</sub>-Histamin-Rezeptor blockierende Wirkung. Interferon Gamma vermindert die TH<sub>2</sub>-Zellaktivität und die Blut-Eosinophilie, ist aber durch grippeähnliche Nebenwirkungen limitiert. Die Anwendung von Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, ein potenter Calcineurin-Inhibitor mit Wirkung vor allem auf T-Zellen, ist ebenfalls limitiert durch unerwünschte Wirkungen wie den Anstieg des Serum-Kreatinins sowie Hypertonus und nur bei schwerer AD indiziert [70]. Auch Antimetabolite wie Methotrexat und Azathioprin werden nur sehr selten und bei schweren Formen der AD eingesetzt.

Alternativ kann mit *Fototherapie* (UVA<sub>1</sub>, UVA/UVB, PUVA) behandelt werden. UV-Licht wirkt auf Langerhans-Zellen und Keratinozyten und vermindert die Expression bestimmter Aktivitätsmarker und Rezeptoren auf CLA<sup>+</sup>-T-Zellen [70]. UVA/UVB wirkt hauptsächlich auf die Epidermis und ist weniger effektiv als eine hochdosierte UVA<sub>1</sub>-Bestrahlung, die eine signifikante Reduktion von IgE-tragenden Zellen wie Langerhans-Zellen und dendritischen Zellen bewirkt. Auch die Migration von Langerhans-Zellen aus der Epidermis wird durch UVA<sub>1</sub> gehemmt [70]. Die Behandlung mit PUVA (Psoralen Ultraviolett A) ist die Behandlung von Patienten mit schwerer, großflächiger AD begrenzt.

## **2.2 Nicht-allergische Hypersensitivitätsreaktion (Pseudoallergische Reaktion)**

Erstmals wurde die pseudoallergische Reaktion (PAR) 1902 als ein Fall von Acetylsalicylsäure-Intoleranz von Hirschberg beschrieben [53]. In der Folge wurden verschiedene Begriffe benutzt wie Idiosyncrasie, Intoleranz, nicht-allergische Überempfindlichkeitsreaktion und schließlich Pseudoallergie oder nicht-IgE-vermittelte

Hypersensitivitätsreaktion, die sich als Bezeichnung durchsetzte [113].

In den letzten Jahrzehnten tritt sie zunehmend häufiger auf [23]; die Prävalenz variiert je nach Autor sehr stark mit Angaben zwischen 0,1-75% [25]. Ring geht von einer Prävalenz von 5% aus [12].

Klinisch ist die pseudoallergische Reaktion von der allergischen Reaktion nicht zu unterscheiden; sie geht oft mit Urtikaria, Angioödem, Bronchokonstriktion, Rhinitis, Konjunktivitis und anaphylaktoiden Reaktionen [9,34] einher. Grundsätzlich können pseudoallergische Reaktionen alle Typen der allergischen Reaktion imitieren, die meisten Autoren beziehen sich jedoch auf ein Krankheitsbild, das ähnlich der IgE-vermittelten Typ I –Reaktion abläuft [12].

Im Unterschied zur allergischen Reaktion ist die pseudoallergische Reaktion nicht IgE-vermittelt, eine Erhöhung von spezifischem IgE ist nicht nachweisbar. Eine vorangehende Sensibilisierung ist nicht notwendig; pseudoallergische Reaktionen treten bereits beim Erstkontakt auf. Ebenfalls im Gegensatz zur allergischen Reaktion besteht eine Dosisabhängigkeit mit relativ konstanter Dosis-Wirkungs-Beziehung [6], wobei die zur Auslösung notwendigen Dosen meist höher liegen als bei der Allergie [3]. Einfluss auf die Manifestation und Intensität einer PAR nimmt auch die Reaktionslage des menschlichen Organismus; Infekte, körperliche oder psychische Belastungen wirken prädisponierend [6]. Pseudoallergische Reaktionen werden häufig im Rahmen einer Virusinfektion manifest und können Jahre weiter bestehen [9]. Eine genetische Disposition wird vermutet [92].

Einer der Hauptauslöser sind nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID), darunter ist besonders die Reaktion auf Acetylsalicylsäure (ASS) häufig beschrieben worden [34,58,109,104]. Eine Reihe von weiteren Medikamenten können ebenfalls Intoleranzreaktionen auslösen (kolloidale Volumenersatzmittel, Röntgenkontrastmittel, Relaxantien, i.v.-Anästhetika, Antibiotika, Glucokortikoide, ACE-Hemmer), die klinisch alle Typen der allergischen Reaktionen nach Coombs und Gell imitieren [12]. Auch Nahrungsmittel und Nahrungsmitteladditiva sind häufige Auslöser pseudoallergischer Reaktionen [21,25].

Besonders häufig kommen PAR bei Patienten mit chronischer Urtikaria, Polyposis nasi, und Asthma bronchiale vor [21,66]. Bei chronischer Urtikaria sind PAR vor allem auf Nahrungsmitteladditiva und Aromastoffe als wesentlicher auslösender Faktor inzwischen allgemein akzeptiert [115,106,114,42]; NSAID können akute Schübe auslösen beziehungsweise das klinische Bild verschlechtern [9].

Der genaue Pathomechanismus ist bisher noch nicht geklärt, es werden verschiedene Wege diskutiert.

Übereinstimmend wird gesagt, dass Auslöser pseudoallergischer Reaktionen unabhängig von der Erkennung antigener Strukturen einen Effekt auf das Immunsystem ausüben beziehungsweise Effektor- und Amplifizierungsmechanismen aktivieren, die normalerweise durch spezifische immunologische Prozesse getriggert werden. Dabei lässt sich weder eine Sensibilisierung noch spezifisches IgE nachweisen [92].

Gefunden wurde eine Aktivierung von Mastzellen und basophilen Granulozyten mit direkter, nicht IgE-vermittelter Mediatorfreisetzung, eine Aktivierung des Komplementsystems [97], sowie eine Modulation von Enzymen und proteolytischer Kaskaden im Plasma [98].

Es konnte gezeigt werden, dass Individuen mit nachgewiesener ASS-Intoleranz hochreaktive basophile Granulozyten besitzen, die nach Stimulation mit ASS eine

wesentlich höhere Sulfidoleukotrienfreisetzung zeigen als bei ASS-toleranten Individuen [37,77]. Wedi, Kapp und Czech fanden eine erhöhte Empfindlichkeit der Basophilen bei ASS-Pseudoallergikern gegenüber inkompletten Basophilenagonisten (C5a, PAF, fMLP=Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) mit erhöhter Sulfidoleukotriensynthese nach Stimulation mit diesen Substanzen [21,34,104,105].

Seit langem ist bekannt, dass Sulfidoleukotriene bei der Pathogenese der pseudoallergischen Reaktion eine bedeutende Rolle spielen [37,89].

Es wurde eine Störung im Arachidonsäure-Stoffwechsel angenommen, die zu einem Shift vom Cyclooxygenase-Weg in den Lipoxygenase-Weg führt [105][siehe Leukotriene].

Kowalski führte dazu 2000 eine Studie durch, bei dem der lokale Eicosanoidstoffwechsel von Nasenepithelzellen ASS-sensitiver und ASS-toleranter Patienten verglichen wurde. Die Epithelzellen routinemäßig entnommener Nasenpolypen von Patienten mit Asthma und Rhinosinusitis wurden mit ASS stimuliert. Dabei zeigte sich, dass unstimulierte Epithelzellen der ASS-sensitiven Patienten signifikant weniger Prostaglandin E2 produzierten. Die basalen Level von 15-HETE (einem Arachidonsäuremetabolit [siehe 2.3]) differierten in beiden Gruppen nicht. Zellinkubation mit ASS zeigte einen signifikanten Anstieg von 15-HETE lediglich bei den ASS-sensitiven Patienten, hatte jedoch keinen Effekt bei den ASS-toleranten Individuen. Prostaglandin F2, Prostaglandin D2 und Leukotrien C4 war in beiden Gruppen gleich hoch. Aus den Ergebnissen läßt sich auf eine abnorme basale und ASS-induzierte Produktion von Eicosanoiden bei ASS-sensiblen Individuen schließen [66].

Nachweisbar sind auch erhöhte Leukotrienspiegel (LTE4) bei Pseudoallergikern im Serum und im Urin nach oraler Provokation mit ASS und anderen Cyclooxygenasehemmern [21,37,81].

Die Diagnosestellung erfolgt meist über die Anamneseerhebung, Eliminationsdiäten und anschließender Provokationsstestung und dem Nachweis fehlenden spezifischen IgE's. Ein suffizientes in vitro-Verfahren steht bisher noch nicht zur Verfügung.

### 2.2.1 Nahrungsmitteladditiva

Nahrungsmitteladditiva stehen seit langem im Verdacht, pseudoallergische Reaktionen auszulösen, besonders bei Patienten mit chronischer Urtikaria, Asthma bronchiale, chronischer Rhinopathie und atopischer Dermatitis [110,111,68]. Die Prävalenz in der Gesamtbevölkerung wird auf 0,1% geschätzt [68].

Beobachtet wurden vor allem Reaktionen auf Konservierungsstoffe (Sulfite, Benzoat, Nitrit und Nitrate), Farbstoffe, Geschmacksverstärker (Glutamat) und Antioxidantien. Tartrazin war bereits in den 70er Jahren in den Verdacht geraten, Unverträglichkeitsreaktionen wie Urtikaria, Asthma und Kontaktdermatitis auszulösen [41].

Für die chronische Urtikaria sind pseudoallergische Reaktionen auf Nahrungsmittelzusatzstoffe als einer der wesentlichen Auslöser inzwischen anerkannt [115,106,114,42].

Zum Nachweis pseudoallergischer Reaktionen auf Nahrungsmitteladditiva wurden verschiedene Studien durchgeführt, meist mit Eliminationsdiäten mit anschließender doppelblinder, placebo-kontrollierter Provokation mit vorangehender und abschließender Beurteilung des Hautzustandes und der Atemwegsobstruktion.

Wüthrich führte bereits 1981 eine Studie durch mit Patienten mit Urtikaria, Asthma bronchiale und chronischer Rhinitis, in der 2/3 der Pat. sich unter einer Eliminations-

diät verbesserten und nach der anschließenden Provokationstestung mit Tartrazin, und Benzoesäure Intoleranzen zeigten [111].

Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch in später durchgeführten Studien mit Reaktionen auf Farbstoffe, Konservierungsstoffe, Glutamat und Süßstoffe [115,87,23,114,24,42].

Substanzen wie Benzoat, Salicylsäure und Aromastoffe kommen natürlicherweise in Nahrungsmitteln wie Früchten, Gemüse, Gewürzen und Kräutern vor und können entsprechende pseudoallergische Reaktionen auslösen. Hypersensitivitätsreaktionen können auch biogene Amine wie Histamin, Serotonin und Tyramin, die vor allem vasoaktiv wirken, verursachen. Zuberbier zeigte 2002, dass an der Entstehung aversiver Reaktionen auf Tomate, Wein und Kräuter bei chronischer Urtikaria nicht nur, wie bisher angenommen, Histamin und Salicylat beteiligt sind, sondern auch flüchtige Aromastoffe [116].

#### *2.2.1.1 Nahrungsmitteladditiva und atopische Dermatitis*

Auch für die atopische Dermatitis konnte eine Verschlechterung des Hautzustandes nach Provokation mit Nahrungsmitteladditiva belegt werden.

Vieluf et al. führte 1999 eine Studie mit 64 Patienten mit AD durch, in der 11/57 Patienten positive Reaktionen auf eine sechstägige additiva-reiche Kost zeigten. In der doppelblinden, placebo-kontrollierten Provokationstestung mit Einzelstoffen zeigten 19/30 der positiv provozierten Patienten beziehungsweise Patienten mit anamnestisch bekannten aversiven Nahrungsmittelreaktionen positive Resultate; am häufigsten waren Reaktionen auf Sulfite (8/30), Farbstoffe (6/28), Salicylat (5/23) und Benzoat (4/30) [102].

In einer anderen Studie, in der 1994 bei Kindern mit atopischer Dermatitis Farbstoffe, Konservierungsstoffe, Zitronensäure und Geschmacks- und Aromastoffe untersucht wurden, zeigten 2% (doppelblinde Provokation) beziehungsweise 7% (offene Provokation) positive Resultate [49]. Eine kleinere Arbeit von 1994 ergab bei 9/11 Kindern positive Resultate auf verschiedene Geschmacks- und Aromastoffe [61].

Van Bever wies positive Reaktionen bei Kindern mit schwerer atopischer Dermatitis auf Tartrazin, Benzoat, Glutamat, Metabisulfit und Tyramin nach [100].

Worm et al. fanden ebenfalls eine Verbesserung des Hautzustandes nach pseudoallergenarmer Diät und Ekzemverschlechterung nach offener und doppelblinder Provokationstestung mit Nahrungsmitteladditiva [110].

Die zum Nachweis pseudoallergischer Reaktionen auf Nahrungsmittel und Nahrungsmitteladditiva sind aufwendig und zum Teil riskant; ein aussagekräftiges in-vitro-Verfahren steht bisher nicht zur Verfügung.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich bei Nahrungsmitteladditiva-sensitiven Patienten mit atopischer Dermatitis eine erhöhte Sulfidoleukotrienfreisetzung nach Stimulation der Basophilen mit den entsprechenden Additiva mittels des CAST-ELISA's nachweisen lässt.

## **2.3 Leukotriene**

Leukotriene gehören zur Gruppe der Eicosanoide und zählen zu den potentesten Entzündungsmediatoren, deren biologische Aktivität bereits 1938 beschrieben wurde. Als „slow reacting substances of anaphylaxis“ fanden sie Eingang in die Lehrbücher

[67]. Ihre Schlüsselrolle bei der Entstehung des Asthma bronchiale und der Rhinitis allergica ist seit langem bekannt [112] und wurde in den letzten Jahren auch für die AD nachgewiesen [31,54,83].

### 2.3.1 Biologische Wirkungen

Leukotriene gehören zu den potentesten Bronchokonstriktoren (LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) mit einer 1000fach stärkeren Wirkung als Histamin und einer etwa 4fach längeren Wirkdauer (30-40min.) Weitere Wirkungen der Cysteinyl-Leukotriene LTC<sub>4</sub> und LTD<sub>4</sub> sind Stimulation der Mucussekretion, Steigerung der vaskulären Permeabilität und Plasmaexsudation mit nachfolgender Ausbildung eines Gewebsödems. LTB<sub>4</sub> induziert eine zelluläre Infiltration hauptsächlich durch neutrophile und eosinophile Granulozyten [67], stimuliert ihre Anheftung an Endothelzellen und Degranulation lysosomaler Enzyme. Im Gegensatz zu Prostaglandinen, Prostacyclin und Thromboxan sind für Leukotriene keine physiologischen Wirkungen beschrieben, sie spielen lediglich in entzündlich verändertem Gewebe eine pathophysiologische Rolle [14,67].

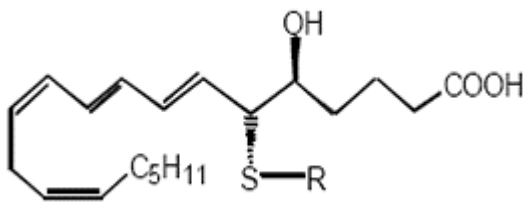


Abb. 2: Strukturformel Cysteinyl-Leukotriene

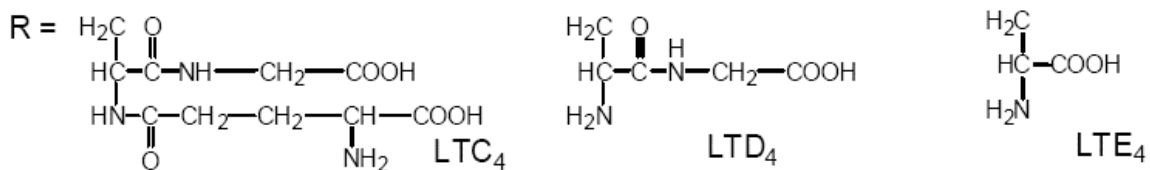


Abb. 3: R entsprechend LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub>

### 2.3.2 Biosynthese

Leukotriene leiten sich aus der Arachidonsäure ab, die in Form in von Phospholipiden in der Zellmembran verestert ist. Im Rahmen der Zellaktivierung wird sie durch die zytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> aus der Zellmembran abgespalten. Die weitere Metabolisierung erfolgt über zwei alternative Wege und mündet bei Metabolisierung über die Cyclooxygenase in der Gruppe der Prostanoiden, zu denen die Prostaglandine, Thromboxan und Prostacyclin zählen.

Der Abbau über den Lipoxygenase-Weg führt zur Entstehung der Leukotriene. Unter dem Einfluss der 5-Lipoxygenase (5-LO) entsteht aus der Arachidonsäure die instabile 5-Hydroperoxy-Eicosatetraensäure (5-HPETE). 5-HPETE wird entweder zu 5-Hydroxy-Eicosatetraensäure (5-HETE) oder Leukotrien A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) umgewandelt. Aus LTA<sub>4</sub> entsteht über eine LTA<sub>4</sub>-Hydrolase alternativ das cysteinylfreie LTB<sub>4</sub> oder durch Inkorporation eines Glutathionrestes mittels der Glutathion-S-Transferase das Cysteinyl-Leukotrien LTC<sub>4</sub>. Eine  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase katalysiert die weitere Umwandlung von LTC<sub>4</sub> zu LTD<sub>4</sub>, aus dem über eine Dipeptidase das relativ stabile LTE<sub>4</sub> entsteht (siehe Abb. 4) [67,10].

4-6% der gebildeten Leukotriene lassen sich als LTE<sub>4</sub> im Urin nachweisen [67].

Alternativ zur 5-HPETE entstehen durch die 12- beziehungsweise 15-Lipoxygenasen



die 12- beziehungsweise 15-Hydroperoxy-Eicosatetraensäuren (12-HPETE, 15-HPETE), die weiter zu Hepoxilinen und Trioxilinen (12-HPETE) und den Lipoxinen (15-HPETE) abgebaut werden [siehe 2.2 ] und ebenfalls immunregulatorische Eigenschaften besitzen [17].

Der Ort der Leukotriensynthese wird hauptsächlich durch die enzymatische Ausstattung der Zellen bestimmt. Alle zur Bildung von Leukotrienen erforderlichen Enzyme findet man in neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie in Monozyten, Mastzellen und Makrophagen [67]. Die Cysteinyl-Leukotriene werden vorwiegend von Mastzellen, basophilen und eosinophilen Granulozyten gebildet; LTB4 hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und in geringerem Maß auch von Monozyten und Makrophagen [10].

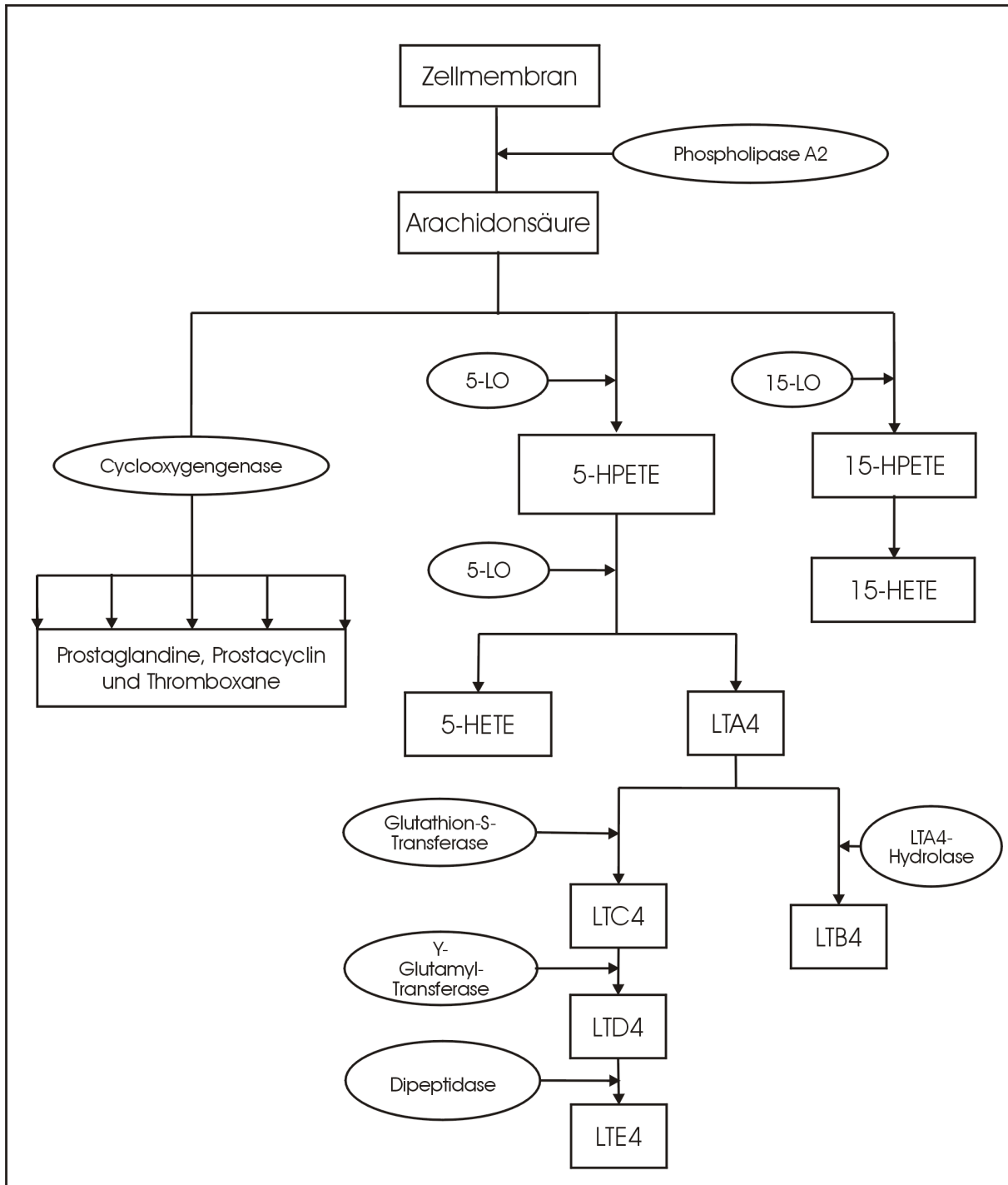


Abb. 4: Arachidonsäuremetabolismus, modifiziert nach [10]. LO: Lipoxygenase, 5-HPETE: 5-Hydroperoxy-Eicosatetraensäure, 5-HETE: 5-Hydroxy-Eicosatetraensäure, LT: Leukotrien

### 2.3.3 Leukotrien-Rezeptoren und Rezeptor-Antagonisten

Am Zielorgan bindet LTB<sub>4</sub> mit hoher Affinität an den B-LT<sub>1</sub>-Rezeptor oder mit niedriger Affinität an den B-LT<sub>2</sub>-Rezeptor und inhibiert darüber die Adenylatcyclase. Die Cysteinyl-Leukotriene LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> binden an zwei mögliche Rezeptoren. Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptoren werden von den gegenwärtig bekannten Leukotrien-Antagonisten blockiert, während Cys-LT<sub>2</sub>-Rezeptoren nicht beeinflusst werden. Der Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptor ist an ein G-Protein gekoppelt und induziert nach Aktivierung einen intrazellulären Calcium-Anstieg. Für LTC<sub>4</sub> ist kein korrespondierender Rezeptor bekannt [67].

In den letzten Jahren sind verschiedene Substanzen zur Hemmung des Leukotrien-Metabolismus entwickelt worden.

Inhibitoren der 5-Lipoxygenase hemmen die Bindung des Enzyms an das FLAP (5-Lipoxygenase-activating-Protein, ein für die Aktivität der 5-LO notwendiges Protein) oder direkt die 5-LO und führen zu einer Unterdrückung der LTB<sub>4</sub>- und Cysteinyl-Leukotriensynthese.

Neuere Rezeptorantagonisten wie Zafirlukast und Montelukast blockieren selektiv die Cys-LT<sub>1</sub>-Rezeptoren [67]. Sie wurden zunächst zur Therapie des Asthma bronchiale verwendet und werden zunehmend auch bei der Behandlung der atopischen Dermatitis erforscht und eingesetzt [31,83,107].

### 2.3.4 Rolle der Leukotriene bei atopischen Erkrankungen und der pseudoallergischen Reaktion

Bei atopischen Erkrankungen und der pseudoallergischen Reaktion ist die Rolle der Leukotriene in den letzten Jahren zunehmend in das Interesse der Forschung gerückt.

Eine erhöhte Leukotriensynthese wurden sowohl bei Patienten mit exazerbiertem Asthma, Rhinitis allergica und nach Provokation bei Pseudoallergikern gefunden.

Bei Patienten mit Asthma wurden erhöhte LTE<sub>4</sub>-Spiegel im Urin, ein Maß für die Leukotriensynthese im Organismus, nach Exazerbation und nach Antigen-Inhalation nachgewiesen [90]; ebenso wie bei ASS-sensitiven Patienten nach oraler Provokation mit ASS [21,37,81].

Kawano et al. führte 2004 eine Studie durch, in der bei ASS-sensitiven Asthma-Patienten nach Gabe von Tacrolimus, einem immunsuppressiven Makrolidderrivat, [siehe Therapie der atopischen Dermatitis], eine orale Provokation mit ASS durchgeführt wurde. In der Placebo-Gruppe fanden sich neben der erhöhten renalen LTE<sub>4</sub>-Exkretion ein erniedrigtes FEV<sub>1</sub> sowie signifikant erhöhte ECP-Spiegel im Sputum. Diese Effekte waren in der Verum-Gruppe deutlich reduziert. Kawano führte dies auf die Hemmung der Leukotrienfreisetzung zurück [64].

Auch für die atopische Dermatitis wurde eine erhöhte Leukotriensynthese belegt. Fauler zeigte bereits 1993, dass die renale Exkretion von LTE<sub>4</sub> bei Patienten mit atopischer Dermatitis im Vergleich zu gesunden Kontrollen um das 4,5fache erhöht ist [44]. Dies wurde in späteren Arbeiten bestätigt [54,55]. Nachgewiesen wurde auch eine Korrelation des klinischen Hautzustandes mit der renalen LTE<sub>4</sub>-Ausscheidung [55] sowie dem Gesamt-IgE [54].

In der Haut von Patienten mit AD wurden in den befallenen Arealen deutlich erhöhte LTB<sub>4</sub>-Level gefunden [99,65,48].

Im venösen Blut von Patienten mit AD wurden aktivierte basophile Granulozyten nachgewiesen, die im Vergleich zu Gesunden spontan und nach Stimulation mit anti-IgE und anderen Stimuli vermehrt LTC<sub>4</sub> und Histamin produzierten. Auch hier zeigte sich eine Korrelation mit der Schwere der AD. Eine Korrelation mit dem Serum-IgE-Level wurde nicht gefunden [60,73].

In einer Studie von 2001 wurde bei Patienten mit AD eine signifikant höhere Leukotrien- und Histaminproduktion von basophilen Granulozyten nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* nachgewiesen [108].

### 2.3.5 Wirkung von Rezeptor-Antagonisten bei atopischer Dermatitis

Nachdem sich in verschiedenen Studien ein regulierender Effekt von Rezeptor-Antagonisten bei Asthma und allergischer Rhinitis gezeigt hatte [79], wurde die Wirkung der Antagonisten (Montelukast) auch bei atopischer Dermatitis untersucht.

Yanase et al. untersuchte 2001 den Einfluss von Montelukast bei 8 Patienten mit AD in einer doppelblinden, placebo-kontrollierten Studie und fand eine moderate, aber signifikante Verbesserung des Hautzustandes und signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen [112]. In einer Fallstudie mit zwei Patienten wurde nach Monotherapie mit Montelukast eine erhebliche Verbesserung des Hautzustandes beobachtet [22]. Auch andere Autoren berichteten von einer klinischen Besserung der AD und signifikanten Unterschieden zur Placebo-Gruppe [43,82,84].

In zwei weiteren Studien konnte keine hinreichende Evidenz für eine Wirksamkeit [101] beziehungsweise keine Überlegenheit gegenüber den klassischen Behandlungsmethoden [30] gefunden werden.

## 2.4 Cellulärer-Antigen-Stimulationstest (CAST-ELISA)

Der CAST wurde 1992 von de Weck, Furukawa und Maly entwickelt [37].

Er beruht auf einer Isolation der Blutleukozyten, anschließendem Priming mit Interleukin 3 (IL-3) und Bestimmung der Sulfidoleukotrienfreisetzung nach Stimulation mit Antigenen mittels ELISA-Technik.

Auf die Bedeutung von Leukotrienen bei atopischen Erkrankungen, allergischen und pseudoallergischen Reaktionen wurde an anderer Stelle bereits eingegangen [siehe Leukotriene].

Gut erforscht ist die Effizienz des CAST bei der Allergiediagnostik. De Weck zitiert in einer Übersichtsarbeit über 50 Studien [37]. Darin wird in zusammengefasst deutlich, dass der CAST-Assay bei der qualitativen Betrachtung den klassischen Methoden wie Bestimmung des spezifischen IgE und Hauttestungen nicht überlegen ist. Bei Beurteilung der klinischen Relevanz, Intensität und Ausmaß einer Sensibilisierung scheint der CAST zusätzliche Informationen zu liefern. Die Reproduzierbarkeit der Hauttests ist zuweilen eingeschränkt und ergibt positive Testergebnisse bei klinisch gesunden Probanden; die Bestimmung des spezifischen IgE gibt Auskunft über das Vorhandensein einer Sensibilisierung, ohne dass eine Beurteilung der klinischen Relevanz möglich ist. In diesen diagnostischen Lücken ist der CAST gut einsetzbar.

Bei der Höhe der gemessenen Leukotrienproduktion besteht nicht nur ein Zusammenhang mit der klinischen Symptomatik, es wurde auch eine Korrelation mit Alter und Geschlecht der Patienten gefunden [46,45].

### 2.4.1 Inhalationsallergene

Die umfassendsten Untersuchungen zu den Inhalationsallergenen stammen von de Weck [38,40,39], Medrala [76,74,75] und Ferrer [45,46]. Die Korrelation zwischen CAST und Hauttests liegt bei 75-95%; dabei weist der CAST eine hohe Spezifität auf. Bei der rein qualitativen Feststellung einer Sensibilisierung bringt der CAST gegenüber der allergenspezifischen IgE-Bestimmung keine Vorteile; der CAP scheint hier empfindlicher. Im quantitativen Vergleich zeigt der CAST eine höhere Korrelation mit den Hauttests, da hier auch die Intensität der Symptome einbezogen wird.

In Studien von Ferrer et al. zeigte sich, dass Leukotrien- wie auch Histaminfreisetzung mit der umweltbedingten Allergenbelastung korrelieren; in der Pollensaison finden sich bei Pollenallergikern höhere Werte in der Sulfidoleukotrien- (sLT) und Histaminfreisetzung als außerhalb [47,46].

### 2.4.2 Insektengifte

Bei Insektengiftallergien sind trotz positiver Provokation in vivo Hauttests und IgE-Bestimmung häufig negativ. Maly [72,71], Siridopoulos [95], Höxtermann [59] und Hippler [52] führten dazu Untersuchungen durch, in denen der diagnostische Wert des CAST in Korrelation mit der Anamnese bei Insektengiftallergien als hoch eingestuft worden ist.

### 2.4.3 Nahrungsmittelallergien

Die Diagnostik von Nahrungsmittelallergien ist häufig schwierig, da nicht alle klinischen Manifestationen IgE-vermittelt sind, so dass Hauttests und IgE-Bestimmungen häufig versagen. Hauttests sind häufig falsch positiv, weil Nahrungsmittelextrakte Histaminrückstände oder mediatorfreisetzende Begleitstoffe enthalten können; instabile Nahrungsmittelallergene führen zu falsch negativen Ergebnissen.

Zum CAST-Assay liegen nur wenige Berichte vor [96,91], in denen die Korrelation zwischen CAST, IgE-Bestimmung, Hauttests und Histaminfreisetzung als gut eingeschätzt wurde. Der CAST zeigte eine hohe Spezifität, wenn auch die Autoren betonen, dass klinische Provokationstestungen den in-vitro-Untersuchungen diagnostisch überlegen sind [37].

### 2.4.4 Allergische und pseudoallergische Arzneimittelreaktionen

Hier liegen relativ viele Studien vor, die einen heterogenen Eindruck erwecken [37].

Bei den IgE-vermittelten Arzneimittelreaktionen wurden vor allem Betalaktamantibiotika untersucht mit unterschiedlichen Ergebnissen [69,26]. Trotz vorhandener klinischer Symptomatik war nur ein Teil der CAST-Ergebnisse positiv. Dazu zeigte sich in einer Studie von Bircher et al., dass der CAST-Assay bei Patienten mit anaphylaktischer Symptomatik auf Betalaktamantibiotika positiv ausfiel, nicht aber bei Patienten mit Urtikaria oder Exanthenen. Dies wurde auf die, bei anamnestisch bekannter anaphylaktischer Reaktion, hoch mit IgE beladenen Basophilen zurückgeführt [37].

Auch für pseudoallergische Reaktionen auf ASS sind die Resultate unterschiedlich. In einigen Studien wurde ein hoher diagnostischer Wert des CAST-ELISA's für die ASS-induzierte Leukotrienfreisetzung gefunden mit einer Sensitivität von 66-75% und hoher Spezifität [58,109,77]. In anderen Arbeiten wurde eine höhere Sulfidoleukotrienfreisetzung von ASS-sensitiven Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden, ohne dass eine individuelle diagnostische Abgrenzung möglich wurde [28,57]. In drei weiteren Studien wurde kein direkter Effekt von ASS auf die Leukotrienfreisetzung gefunden, es zeigte sich aber eine erhöhte Freisetzung bei ASS-

sensitiven Patienten nach Stimulation der Basophilen mit dem inkompletten Basophilenagonisten C5a [34,104,105]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise auf die Auswahl von Patienten mit unterschiedlichen Grunderkrankungen (Asthma, Urtikaria) oder die Art des verwendeten ASS zurückzuführen. Weiteren Einfluss kann auch die Ausprägung der Symptomatik zum Untersuchungszeitpunkt haben [37].

#### 2.4.5 Nahrungsmitteladditiva

W.Czech untersuchte 1997 in einer allerdings sehr kleinen Arbeit (20 Patienten, 11 Kontrollen) die Korrelation oraler Provokation und Leukotrienfreisetzung bei Patienten mit symptomatischer und nicht-symptomatischer Urtikaria.

Es fand zunächst eine orale Provokation mit Nahrungsmitteladditiva (Tartrazin, Salicylat, Benzoat, Metabisulfit, Nitrit, Farbmischungen) statt. Dabei reagierten die symptomatischen Patienten in einem deutlich höheren Prozentsatz positiv auf die Provokation als die zum Zeitpunkt der Provokation nicht-symptomatischen Patienten.

Nach Präinkubation mit ASS, Benzoat und Metabisulfit ergab sich bei den Patienten mit symptomatischer Urtikaria eine gesteigerte C5a-induzierte sLT-Freisetzung unter dem Einfluss von Benzoat und ASS; Metabisulfit hatte keinen Einfluss. Die positiv provozierten Patienten zeigten die höchste sLT-Freisetzung. In der Kontrollgruppe (gesunde Probanden und Patienten mit atopischer Dermatitis) und bei den Patienten mit symptomfreier Urtikaria zeigte die Präinkubation mit Nahrungsmitteladditiva und ASS keinen Einfluss auf die Sulfidoleukotrienfreisetzung [13].

## 2.5 Nahrungsmittelzusatzstoffe und Tomaten

### 2.5.1 Acceptable Daily Intake (ADI-Wert)

Der ADI-Wert beziffert die akzeptable tägliche Aufnahmemenge eines Zusatzstoffes in Milligramm, die ein Mensch pro Kilogramm Körpergewicht täglich verzehren kann, ohne gesundheitliche Schäden davonzutragen. Die Festlegung der ADI-Werte erfolgt in internationalen Gremien der EU beziehungsweise der Weltgesundheitsorganisation (WHO).

Basis für die Festlegung des ADI-Wertes sind in der Regel Fütterungsversuche mit Ratten oder Mäusen. Die höchste Dosierung, bei der keine gesundheitlichen Schäden auftraten (NEL= No Effect Level), wird durch Hundert dividiert und ergibt so den ADI-Wert.

### 2.5.2 Farbstoffe

#### 2.5.2.1 Azofarbstoffe

Die größte und wichtigste Gruppe der Lebensmittelfarbstoffe stellen heute die sogenannten Azofarbstoffe dar, von denen in dieser Arbeit Amaranth, Azorubin, Cochenillerot A, Gelborange S, Brillantschwarz BN und Tartrazin verwendet wurden. Sie werden chemisch-synthetisch hergestellt, früher auf der Basis von Steinkohleteer, heute von Erdöl. Ihr Name leitet sich aus der Doppelbindung zweier Stickstoffatome (Azogruppe) her, welche für diese Farbstoffe charakteristisch ist. Azofarbstoffe sind farbstabil und lichtecht; sie lassen sich vielfältig mischen, so dass einzelne Farbnuancen sehr genau eingestellt werden können. Zunächst wurden die Farbstoffe zum Färben von Textilien eingesetzt und eher als Nebeneffekt zur Anfärbung von Lebensmitteln verwendet. Erst später wurde entdeckt, dass viele Azofarbstoffe gesundheitsgefährdend und vor allem Krebs auslösend waren, zu dass Zulassungsbe-

schränkungen erhoben wurden. Die heute verwendeten Azofarbstoffe gelten als vergleichsweise harmlos; viele sind wasserlöslich und sollen nach dem Verzehr schnell aus dem Körper ausgeschieden werden. Bei den meisten Stoffen konnte keine direkte schädigende Wirkung nachgewiesen werden. Sie stehen dennoch unter dem Verdacht, Allergien, Pseudoallergien und das hyperkinetische Syndrom auszulösen. Bei einigen wird außerdem vermutet, dass sie auch an der Entstehung von Asthma und atopischer Dermatitis beteiligt sind (Azorubin, Cochenillerot A, Gelborange S, Brillantschwarz BN) oder Hautreaktionen verursachen (Amaranth) [16].

#### 2.5.2.1.1 Amaranth E123

Amaranth ist ein wasserlöslicher, roter Azofarbstoff, dessen Farbe beständig ist gegen Hitze, Luft und Benzoesäure. In Gegenwart von Fruchtsäuren verliert Amaranth seine Farbe.

Verwendung findet Amaranth zum Beispiel in Americano und Bitter Soda (bis max. 100mg/l), in Aperitifweinen, Spirituosen und Fischrogen (bis max. 30mg/kg) sowie als Farblack für Dragees.

In den USA ist Amaranth verboten, da eine krebsfördernde Wirkung vermutet wird [16].

ADI-Wert: 0-0,8mg/kg

#### 2.5.2.1.2 Azorubin E122 (Carmoisin)

Azorubin, ein roter Azofarbstoff, hat große chemische Ähnlichkeit mit Amaranth. Azorubin ist wasserlöslich und in bestimmten Lebensmitteln in einer Höchstmenge von 50-500mg/kg zugelassen.

Verwendung findet Azorubin in Süß- und Zuckerwaren, Puddingpulver, Kunstspeiseeis, Biskuitrollen, Fruchtkonserven, Fertigprodukten, braunen Soßen, Paniermehl sowie auch bei Arzneimitteln zur Färbung von Dragees [16].

ADI-Wert: 0-4mg/kg

#### 2.5.2.1.3 Cochenillerot A E124 (Ponceau 4R)

Cochenillerot A ist ein roter, wasserlöslicher Azofarbstoff mit großer Ähnlichkeit zu Amaranth. Er hat eine hohe Licht- und Hitzebeständigkeit und ist in neutraler und saurer Umgebung stabil gegenüber Fruchtsäuren.

Der Farbstoff ist je nach Anwendungsgebiet in einer Höchstmenge von 50-500mg/kg zugelassen und wird in spanischer Chorizo-Wurst und Salchichon verwendet; in Lachersatz, Getränken, in Süßwaren und Fruchtgelees ebenso wie in Käseüberzügen und als Farblack für Dragees [16].

ADI-Wert: 0-4mg/kg

#### 2.5.2.1.4 Gelborange S E110 (Sunsetgelb FCF)

Gelborange S ist ein gelb-oranger, wasserlöslicher Azofarbstoff von hoher Lichtechtheit und Hitzebeständigkeit und hoher Stabilität gegenüber Fruchtsäuren. Je nach Anwendungsgebiet ist er in einer Menge von 50-500mg/kg zugelassen. Verwendung findet er in Getränken und Schokoladenmixgetränken, Süßwaren, Puddingpulver, Zitronenquark und Kunstspeiseeis; sowie Fruchtkonserven, Kunsthonig, Backwaren, Krabben, Käsesoße, Fertigsuppen, Paniermehl und bei der Arzneimittelherstellung zur Färbung von Dragees.

Im Tierversuch wurde eine Tumorbildung beobachtet, bei der nicht sicher ist, ob diese Ergebnisse auch auf den Menschen übertragen werden können [16].

ADI-Wert: 0-2,5mg/kg

#### 2.5.2.1.5 Brilliant schwarz BN E151 (Schwarz BN)

Brilliant schwarz BN ist ein schwarzer lichtechter Azofarbstoff, der gegen Hitze und Fruchtsäuren mäßig stabil ist. Er kann in einer Höchstmenge von 50-500mg/kg verwendet werden. Zur Anwendung kommt Brilliant schwarz BN in Lakritz und Süßwaren, in Fischprodukten (deutscher Kaviar/ Fischrogen), in Soßen und in der Arzneimittelherstellung zur Färbung von Dragees. Auch im kosmetischen Bereich wird er zur Farbgebung von Shampoos, Schaumbädern, Duschbädern und flüssigen Seifen eingesetzt [16].

ADI-Wert: 0-5mg/kg

#### 2.5.2.1.6 Tartrazin E102

Auch Tartrazin gehört zu den Azofarbstoffen, ist von zitronengelber Farbe und gut wasserlöslich. Tartrazin bleibt auch in saurer Umgebung farbecht, ist licht- sowie temperaturbeständig. Je nach Anwendungsgebiet ist die Verwendung von Tartrazin in einer Höchstmenge von 50-500mg/kg zugelassen.

Tartrazin war zunächst in Deutschland nur sehr begrenzt zum Färben von Spirituosen und Likören zugelassen. Im Rahmen der Zusatzstoff-Harmonisierung in der EU ist das Anwendungsgebiet erheblich ausgeweitet worden.

Verwendung findet Tartrazin zum Beispiel in Frucht- und Kräuterlikören, Branntweinen, Obst- und Fruchtweinen; seit der Zusatzstoff-Harmonisierung auch in nicht-alkoholischen und aromatisierten Getränken, Backwaren, Süßwaren, Senf, aromatisiertem Schmelzkäse, Fisch- und Krebspasten sowie als Farblack für Dragees und zum Färben von Käserinden und Kunstdärmen.

Häufig wird Tartrazin durch eine Mischung von Chinolingelb (E 104) und Gelborange S (E110) ersetzt [16].

Die Unbedenklichkeit von Tartrazin ist immer bezweifelt worden. Die vermutete schädigende Wirkung hat sich jedoch auch in Langzeitversuchen nicht eindeutig nachweisen lassen. Dabei steht auch Tartrazin seit langem im Verdacht, Pseudoallergien auszulösen, besonders bei Personen, die empfindlich auf Benzoat und Acetylsalicylsäure reagieren [100,41,111].

ADI-Wert: 0-7,5mg/kg

#### 2.5.2.2 *Weitere Farbstoffe*

##### 2.5.2.2.1 Chinolingelb E104

Chinolingelb ist ein gelber, wasserlöslicher Chinolin-Farbstoff, der ebenfalls synthetisch hergestellt wird. Er ist von guter Lichteinheit und Hitzebeständigkeit und stabil gegenüber Fruchtsäuren, jedoch unlöslich in pflanzlichen Ölen.

Je nach Anwendungsgebiet ist er für bestimmte Lebensmittel in einer Menge von 50-500mg/kg zugelassen, in der Praxis werden meist 20-30mg/kg verwendet. Zur Anwendung kommt er unter anderem in Getränken, Süßwaren, Kunstspeiseeis und Räucherfisch sowie zur Färbung von Arzneimitteldragees. In Kombination mit blauen Farbstoffen wird er zur Grünfärbung eingesetzt.

Im Tierversuch ergaben sich Hinweise, dass reines Chinolin tumorfördernd wirken kann. Für Chinolingelb, ein Abkömmling von Chinolin, wurden diese Ergebnisse bisher nicht bestätigt. Aufgrund der chemischen Verwandtschaft mit den Azofarbstoffen steht auch Chinolingelb im Verdacht, Pseudoallergien und das hyperkinetische Syndrom auszulösen.

In den USA ist Chinolingelb zur Verwendung als Lebensmittelfarbstoff verboten [16].

ADI-Wert: 0-10mg/kg

#### 2.5.2.2.2 Eisenoxid E172 (Eisenhydroxid)

Eisenoxide sind eisenhaltige Pigmente, die sowohl natürlich vorkommen als auch künstlich hergestellt werden können. Natürlich vorkommende Eisenoxidpigmente sind zum Beispiel Ocker, Terra di Siena, Umbra, Spanisch- oder Persischrot, die je nach Zusammensetzung der Pigmente verschiedene Farbnuancen annehmen können. Sie haben eine geringere Farbintensität als künstlich hergestellte Pigmente und können Verunreinigungen aufweisen. Die künstliche Herstellung erfolgt chemisch über eine kontrollierte Eisen-Sauerstoff-Reaktion (Erhitzen, Glühen); künstlich hergestellte Pigmente sind zum Beispiel Eisenoxidgelb, -rot, -braun, und -schwarz.

Eisenoxidpigmente sind beständig gegenüber Licht und Witterungseinflüssen und hitzestabil. Als Farbstoff haben sie eine große technologische Bedeutung.

Schädigende Wirkungen wurden bisher nicht beobachtet; für Lebensmittel sind sie ohne Höchstmengenbeschränkung zugelassen, wobei bestimmte Lebensmittel (Nudeln, Honig, verschiedene Milchprodukte, Brot) aus Gründen des Täuschungsschutzes davon ausgenommen sind.

Eisenoxide finden Verwendung in Dragees, Süßwaren, Käserinden, Oliven und Verpackungsmaterialien [16].

Ein ADI-Wert wurde nicht festgelegt.

#### 2.5.2.2.3 Erythrosin E127

Erythrosin ist ein rosa bis roter, wasserlöslicher Farbstoff, der in saurer und neutraler Umgebung farblos ist, in alkalischer Umgebung jedoch einen tiefroten Farbton annimmt. Er wird daher auch als pH-Indikator verwendet. Die Substanz ist nicht lichtecht und verträgt Hitze bis zu 140°.

Erythrosin ist ein Fluorescinfarbstoff; d.h. er besteht aus Jodverbindungen. Bisher ist noch nicht genau bekannt, in welchem Maß Erythrosin zur Jodversorgung beiträgt.

Die Herstellung erfolgt synthetisch; für bestimmte Lebensmittel ist der Stoff in einer Höchstmenge von 150-200mg/kg je nach Anwendungsgebiet zugelassen. Verwendet wird Erythrosin zum selektiven Anfärben von Kirschen in Fruchtsalaten, zum Färben von Cocktailkirschen sowie bei Dragees als Farblack.

Auch Erythrosin steht im Verdacht, an der Entstehung des hyperkinetischen Syndroms beteiligt zu sein. Möglich ist auch die Ausbildung von Proteinfarbstoffkomplexen, welche die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Unter bestimmten Bedingungen entstehen bei der Lebensmittelverarbeitung Fluoresceine (anorganische Jodverbindungen), welche die Nieren schädigen können [16].

ADI-Wert: 0-0,1mg/kg



#### 2.5.2.2.4 Indigotin E132 (Indigokarmin)

Indigotin ist ein blauer Indigofarbstoff, der in Kombination mit gelben Farbstoffen auch zur Grünfärbung verwendet wird. Indigotin ist wasserlöslich, besitzt nur eine geringe Lichtechtheit und verträgt Temperaturen bis zu 150°. Aufgrund der geringen Säurebeständigkeit kann der Farbstoff in sauren Lebensmitteln nicht eingesetzt werden.

Das klassische Indigoblau wurde lange Zeit aus pflanzlichen Rohstoffen hergestellt, aus den Blättern der Färberwaid; später aus der in Indien kultivierten Indigopflanze. 1897 gelang erstmals die synthetische Herstellung, die den natürlichen Farbstoff verdrängte. Heute wird Indigotin fast ausschließlich chemisch-synthetisch hergestellt; biotechnische Verfahren für die Indigoproduktion befinden sich in der Entwicklung.

Für bestimmte Lebensmittel ist Indigo je nach Anwendungsgebiet in einer Höchstmenge von 50-500mg/kg zugelassen; verwendet wird der Farbstoff vor allem zur Färbung von alkoholfreien Getränken, Likör, Süßwaren, Kunstspeiseeis und Dragees.

Indigotin selbst gilt als unbedenklich; in längeren Fütterungsstudien hat sich jedoch ergeben, dass in Anwesenheit von Nitrit aus anderen Lebensmitteln Nitrosamine entstehen können. Bei Allergikern sind schwache allergische Reaktionen möglich [16].

ADI-Wert: 0-5mg/kg

#### 2.5.2.2.5 Patentblau V E131

Dieser blaue, wasserlösliche Farbstoff gehört zu den Triphenylmethanfarbstoffen, die vom menschlichen Körper nicht aufgenommen werden. Die Herstellung erfolgt chemisch-synthetisch; für bestimmte Lebensmittel ist er je nach Anwendungsgebiet in einer Höchstmenge von 100-500mg/kg zugelassen.

Verwendet wird Patentblau V vor allem zum Färben von Getränken, Süßwaren und der Oberfläche von Lebensmitteln, Eiern und auch für Glasuren. Eine Mischung mit Tartrazin oder Chinolingelb ergibt einen grünen Farbton.

Nebenwirkungen wurden bisher nicht festgestellt, nach oraler Aufnahme wird der Farbstoff fast vollständig wieder ausgeschieden [16].

ADI-Wert: 0-15mg/kg

#### 2.5.3 Benzoessäure E210, Benzoate E211-213

Benzoessäure ist ein Konservierungsmittel, welches sowohl als freie Säure als auch in Form ihrer Salze (Natriumbenzoat E211, Kaliumbenzoat E212, Calciumbenzoat E213) verwendet wird. Sie ist geeignet zur Konservierung saurer und gesäuerter Produkte und schützt vor allem vor Schimmelbefall und unerwünschter Nachgärung. Sie ist auch wirksam gegen Hefen und aflatoxinbildende Schimmelpilze; weniger wirksam gegen Milchsäurebakterien und einige Krankheitserreger (z.B. Clostridien). In Kombination mit Schwefeldioxid (E220) schützt Benzoessäure auch vor enzymatischem und bakteriellem Verderb. In den zur Konservierung erforderlichen Konzentrationen kann Benzoessäure geschmacklich auffallen.

Natürlicherweise kommt Benzoessäure in vielen Beeren und Früchten vor wie z.B. in Pflaumen, Preisel-, Heidel- und Johannisbeeren, Erdbeeren, Trauben, aber auch in Gewürznelken, Zimt und fermentierten Milchprodukten [3].

Die Herstellung erfolgt chemisch-synthetisch durch die Oxidation von Toluol. Für bestimmte Lebensmittel ist Benzoessäure in einer Höchstmenge von 300-2000mg/kg

zugelassen, in Ausnahmefällen bis zu 6000mg/kg. Dabei muss die Gesamtmenge aller Konservierungsmittel beachtet werden.

Verwendet wird Benzoesäure in Mayonnaise und mayonnaisehaltigen Feinkostprodukten wie Fleisch- und Wurstsalaten und Marinaden, in sauren Obstkonserven und Fruchtkonzentraten. Sehr verbreitet ist die Anwendung in Gemüsekonserven; vor allem in Sauergemüsen wie zum Beispiel Essiggurken.

Benzoessäure wird vom menschlichen Organismus über die Darmwand aufgenommen. In mehreren Fütterungsversuchen haben sich verschiedene gesundheitlich problematische Wirkungen ergeben. Es können sowohl allergische Reaktionen als auch Pseudoallergien auftreten, besonders bei Personen, die empfindlich auf Acetylsalicylsäure reagieren. Heute wird der Einsatz von Benzoaten eingeschränkt zugunsten anderer, weniger bedenklicherer Konservierungsmittel. Katzen reagieren besonders empfindlich auf Benzoate; daher sind diese in Tierfutter verboten [16].

ADI-Wert: 0-5mg/kg

In dieser Arbeit wurde Natriumbenzoat (E211) verwendet, das Natriumsalz der Benzoesäure.

#### 2.5.4 Natriumnitrit E250

Das Konservierungsmittel Natriumnitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) ist Bestandteil von Nitritpökelsalz, eine Mischung aus Kochsalz und Natriumnitrit. Es wird vorwiegend bei der Nass- und Spritzpökung eingesetzt, bei der die Fleischmasse in eine Nitrit-Salz-Lösung eingelegt wird. Anders als beim Natriumnitrat ist beim Nitrit die konservierende Komponente direkt aktiv. Es wirkt gegen Bakterien, vor allem gegen *Clostridium botulinum*. Beim Pökelprozess wird das chemisch wenig beständige Myoglobin in eine stabilere Variante umgewandelt (Umrötung), wodurch das Fleisch seine rötliche Farbe behält und außerdem ein charakteristisches Aroma entsteht.

Die Herstellung erfolgt durch die Reduktion von Nitrat unter kontrollierten Bedingungen und einer Hitzeeinwirkung von 380°.

Nitrit darf Lebensmitteln nur in Form von Nitritpökelsalz zugesetzt werden in einer Höchstmenge von 50-175mg/kg, bezogen auf die Konzentration im Endprodukt. Die zugesetzte Menge ist weitaus höher.

Verwendung findet Nitrit in gepökelten Fleisch- und Wursterzeugnissen; auch in Dosen wie z.B. Enten- und Gänsepastete. Zur Konservierung von Speck, Schinken, Wurst und anderen Fleischprodukten ist der Einsatz von Nitrit in Deutschland weit verbreitet.

Gesundheitlich sind Nitrite problematisch, da sie gefäßerweiternd und blutdrucksenkend wirken und in höheren Dosierungen zu einer Methämoglobinämie führen. Besonders gefährdet sind Säuglinge. Im menschlichen Körper kann Nitrit zu krebserregenden Nitrosaminen umgewandelt werden [16].

ADI-Wert: 0-0,2mg/kg

#### 2.5.5 Kaliummetabisulfit E224 (Kaliumdisulfit)

Kaliumdisulfit ist das Kaliumsalz der schwefligen Säure, welche als Gas (Schwefeldioxid) oder in wässriger Lösung zur Lebensmittelkonservierung verwendet wird. Sulfite entstehen beim Einleiten von Schwefeldioxid in die jeweiligen Laugen; die entstehenden Lösungen werden durch Eindampfen in die feste Form überführt. Schwefeldioxid und Sulfite haben unterschiedliche Wirkungen; wirken stark antimikrobiell gegenüber Bakterien und hemmen das Wachstum von Schimmelpilzen

und Hefen, verhindern die enzymatische Bräunung (z.B. bei frischen Kartoffeln), wirken farbstabilisierend und bleichend und unterdrücken Oxidationsprozesse. Kaliumdisulfit wird als Konservierungsmittel und als Antioxidationsmittel verwendet, es hemmt das Wachstum von Pilzen und verhindert die enzymatische Bräunung.

Sie sind für eine große Anzahl von Lebensmittel zugelassen und dürfen je nach Anwendungsgebiet in einer Höchstmenge von 30-200mg/kg als Summe von Schwefeldioxid und Sulfiten verwendet werden, in Ausnahmefällen (Trockenfrüchte) bis zu 2000mg/kg. Bei der Konservierung von Wein ist Schwefeln ein allgemein übliches Verfahren (160-400mg/l), wobei trockener und roter Wein in der Regel einen geringeren Schwefelgehalt hat als weißer und süßer Wein. Weitere Verwendung finden Sulfite und Schwefeldioxid in Meerrettichmasse, Frucht- und Gemüsezubereitungen, Kartoffelgerichten, Fruchtsäften und Marmelade sowie in Knabbererzeugnissen auf Kartoffel- und Getreidebasis.

Der menschliche Organismus reagiert sehr unterschiedlich auf Sulfite; bei empfindlichen Menschen können schon kleine Mengen zu Kopfschmerzen, Übelkeit, Völlegefühl und Durchfall führen. Verbreitet sind auch echte Allergien sowie pseudoallergische Reaktionen, häufig mit Asthmaanfällen und Übelkeit [16].

ADI-Wert: 0-0.7mg/kg

#### 2.5.6 Natriumsalicylat

Salicylat ist das Natriumsalz der Salicylsäure (o-Hydroxybenzoesäure,  $C_6H_4(OH)COOH$ ), einer aromatischen Carbonsäure, die mittels der Kolbe-Schmitt-Synthese aus Natriumphenolat und Kohlendioxid hergestellt wird [20].

Natürlicherweise kommt sie in Form ihres Methylesters in ätherischen Ölen (z.B. Wintergrünöl) und als Pflanzenhormon in Blättern, Blüten, Wurzeln und Früchten vieler Pflanzen vor. Besonders reich an Salicylsäure ist die Weidenrinde (*Salicis cortex*), durch die sie ihren Namen erhielt und deren schmerzlindernde und fiebersenkende Wirkung bereits 700 v. Chr. bekannt war [18]. 1897 gelang dem deutschen Apotheker und Chemiker F. Hoffmann die Herstellung der Acetylsalicylsäure über die Veresterung der Salicylsäure mit Ethansäure.

In der Nahrung ist Salicylsäure vor allem in Früchten und Gemüse (Beerenfrüchten, Orangen, Grapefruits, Zitronen, Aprikosen, Ananas, Bananen, Rhabarber, Weintrauben, Gurken, Oliven, Tomaten und Erbsen), Mandeln, Nüssen, Kräutern, Gewürzen und auch Wein, Bier und Essig enthalten [6,3].

Salicylsäure wirkt gärungs- und fäulnishemmend und bakterizid. Für die Konservierung von Lebensmitteln ist sie nicht zugelassen.

Pharmakologisch werden die analgetischen, antiphlogistischen, antipyretischen und keratolytischen Eigenschaften genutzt; Acetylsalicylsäure wirkt außerdem thrombozytenaggregationshemmend. Salicylsäure dient auch zur Herstellung von Azofarbstoffen sowie zur Konservierung von Salben, Tinten und Leimen; ihre Methylester, Amyl- und Isobutylester werden in der Parfümerie verwendet [19].

Salicylsäure gehört neben Benzoesäure, Sulfiten, Glutamat und Farbstoffen zu den häufigsten Auslösern pseudoallergischer Reaktionen [85,3,15].

#### 2.5.7 Kalifornische Freilandtomaten

Ebenfalls im Test verwendet wurden kalifornische Freilandtomaten. Tomaten enthalten neben Wasser, Kohlenhydraten, Eiweiß und Fett, Kalzium, Kalium, Eisen, Natri-

um, Vitaminen und Spurenelementen, Flavonoiden und Carotinoiden (besonders Lykopin) auch große Mengen an Salicylat, Histamin und flüchtigen Aromastoffen.

In vorangegangenen Untersuchungen bei Patienten mit chronischer Urtikaria hatte sich gezeigt, dass als Auslöser pseudoallergischer Reaktionen nicht, wie bisher immer angenommen, nur Histamin und Salicylat, sondern auch die flüchtigen Aromastoffe beteiligt sind [116].

Es erfolgte daher eine separate Testung der Sulfidoleukotrienfreisetzung nach Stimulation mit Tomate-Rückstand und Tomate-Destillat.

Im Rückstand befanden sich Proteine, Histamin und Salicylat. Im Destillat waren die flüchtigen Aromastoffe, in erster Linie niedermolekulare Aldehyde, Ketone und Alkohol enthalten [116].

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Auswahl der Patienten**

Die Patienten wurden aus einer 1996 in der Atopiesprechstunde der Charité durchgeführten Studie ausgewählt. In dieser Arbeit war der Einfluss einer pseudoallergenarmen Diät auf den Hautzustand bei Patienten mit atopischer Dermatitis untersucht worden [110].

Die Diagnose der atopischen Dermatitis war nach den Kriterien von Hanifin und Rajka [51] gestellt worden. Der Hautzustand wurde vier Wochen unter normaler Kost (Vorphase) und anschließend 6 Wochen unter pseudoallergenarmer Diät [115] (Diätphase) dokumentiert.

Für die Bewertung des Diäterfolgs wurde die Veränderung des Hautzustandes zugrunde gelegt. Die Beurteilung erfolgte mittels eines modifizierten Costa-Scores [32]. Dabei wurde der Mittelwert aus der Eingangsuntersuchung und weiteren Untersuchungen in der Mitte und am Ende der Vorphase gebildet und mit dem erreichten Wert am Ende der Diätphase verglichen. Als Diäterfolg wurde eine Reduktion des Scores um mindestens 35% gewertet. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des Serum-ECP, dessen Korrelation mit dem klinischen Hautzustand vielfach beschrieben wurde [62,33].

Bei den Patienten, bei denen in der Diätphase eine Besserung des Hautzustands eingetreten war, wurde eine zweitägige orale Provokation mit pseudoallergenreicher Kost, den Proteinen (Rückstand) und den Aromastoffen (Destillat) aus kalifornischen Freilandtomaten durchgeführt. Bei einer Verschlechterung des Hautzustandes schloss sich eine doppelblinde, placebo-kontrollierte orale Provokationstestung mit verschiedenen pulverisierten, in Gelatine kapseln verabreichten Nahrungsmitteladditiven an (Kapsel-Provokationstestung, siehe [3.3.2.2]).

Aus der Studie wurden in dieser Arbeit insgesamt 23 Patienten untersucht. Ein positives Votum der Ethikkommission der Charité lag vor.

#### **3.2 Einteilung der Studienteilnehmer**

##### **3.2.1 Kontrollgruppe (KG)**

Die Kontrollgruppe (n=16, 9 weiblich (w), 7 männlich (m), Altersspanne 24-45 Jahre, Mittelwert 33,4 Jahre) setzte sich aus gesunden Probanden zusammen, die keine atopischen Erkrankungen oder klinisch manifeste Allergien aufwiesen. Subklinische Sensibilisierungen wurden nicht ausgeschlossen.

### 3.2.2 Diätresponder (DR)

Zur Gruppe der Diätresponder (n=10, 5w, 5m, Altersspanne 18-44 Jahre, Mittelwert 30,2 Jahre) wurden die Patienten zugeordnet, die unter der pseudoallergenarmen Diät eine Reduktion des Costa-Scores um mindestens 35% aufwiesen und auf die orale Provokation mit pseudoallergenreicher Kost mit Ekzemverschlechterung reagiert hatten. Unter der anschließenden Kapsel-Provokationstestung hatten diese Patienten keine weitere Verschlechterung des Hautzustandes gezeigt.

### 3.2.3 Kapselresponder (KR)

In diese Gruppe (n=9, 4w, 5m, Altersspanne 21-59 Jahre, Mittelwert 32,4 Jahre) wurden Patienten eingeschlossen, die ebenso wie die Diätrespondergruppe eine klinische Verbesserung des Hautzustandes unter der pseudoallergenarmen Diät gezeigt hatten mit Verschlechterung unter pseudoallergenreicher Kost. Auf die anschließende doppelblinde, placebo-kontrollierte Kapsel-Provokationstestung hatten diese Patienten mit einer weiteren Verschlechterung des Hautzustandes reagiert.

### 3.2.4 Nonresponder (NR)

Die Patienten der Nonrespondergruppe (n=4, 3w, 1m, Altersspanne 19-35 Jahre, Mittelwert 24,5 Jahre) hatten unter der Diät keine relevante Verbesserung des Hautzustandes gezeigt; die Reduktion des Costa-Scores war geringer als 35% beziehungsweise es kam zu einer Ekzemverschlechterung. Eine orale Provokationstestung wurde nicht durchgeführt.

## 3.3 Cellulärer-Antigen-Stimulationstest (CAST-ELISA)

Verwendet wurde der „Cellular Antigen Stimulation Test“ (CAST-ELISA), Bühlmann Laboratories AG, Schweiz.

Der CAST ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay, in dem die nach Priming mit Interleukin 3 (IL-3) und Antigenkontakt vorwiegend von den basophilen Granulozyten produzierten Sulfidoleukotriene (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) quantitativ bestimmt werden.

Mit allen zur de-novo-Synthese von Sulfidoleukotrienen erforderlichen Enzymen sind basophile und eosinophile Granulozyten sowie Monozyten und Mastzellen ausgestattet [52,67].

Interleukin 3 wird von aktivierten T-Zellen gebildet und besitzt vielfältige Wirkungen, auch auf unreife Vorläuferzellen im Knochenmark. Bei den basophilen Granulozyten erhöht IL-3 die Reaktionsbereitschaft auf verschiedene Stimuli (Priming). Die Leukotriensynthese wird stimuliert und die Bereitschaft zur Degranulation erhöht [52,4]. Durch die Zugabe von IL-3 wird die Empfindlichkeit der Basophilen gesteigert, nicht jedoch die prinzipielle Reaktionsbereitschaft [37].

### 3.3.1 Testprinzip

Der CAST-ELISA lässt sich in drei Schritte unterteilen. I. Aus den Probandenproben werden die Leukozyten isoliert. II. Während der Inkubation mit IL-3 und der jeweiligen Antigenkonzentration werden die basophilen Granulozyten zur de-novo-Synthese von Leukotrienen stimuliert. III. Die in den Zellüberstand abgegebenen Leukotriene werden anschließend in einem ELISA-Verfahren quantitativ bestimmt. Dazu wird ein monoklonaler Antikörper verwendet, der die Leukotriene in vergleichbarer Sensitivität und Spezifität erfasst.

### I. Isolation der Leukozyten:

Die Probeentnahme erfolgt in speziellen Röhren, die Nährstoffe und Stabilisatoren enthalten. Das Blut wird mit Dextran versetzt, um die Viskosität zu erhöhen, und die Mischung 90 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit befinden sich die Leukozyten und Thrombozyten in der Plasmafraktion, während die Erythrozyten sedimentiert sind. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt und zentrifugiert. Im Sediment erhält man die Leukozyten, die im IL-3-haltigen Stimulationspuffer resuspendiert werden.

### II. Zellstimulation:

In einem 40minütigen Inkubationsschritt werden die Leukozyten nach Zugabe der jeweiligen Antigenkonzentration zur de-novo-Synthese von Sulfidoleukotrienen und deren Freisetzung in die Zellüberstände stimuliert.

Zur Bestimmung des Leerwertes (basale sLT-Freisetzung nach Priming mit IL-3, PB) wird Stimulationspuffer verwendet. Zur Bestimmung der maximalen Stimulierbarkeit der Leukozyten dient die Stimulationskontrolle (PC). Sie gibt die sLT-Freisetzung nach Stimulation der Leukozyten mit einem hochaffinen, monoklonalen anti-IgE-Rezeptorantikörper wieder.

Nach Ende der Inkubationszeit werden die Proben zentrifugiert und die Überstände im ELISA verwendet.

### III. Bestimmung der Leukotrien-Konzentration:

Zur Doppelbestimmung werden je 100µl der Zellüberstände in die Mikroküvetten der Mikrotiterplatte pipettiert, die mit einem polyklonalen Anti-Maus-IgG-Antikörper beschichtet ist.

Mitgeführt wird pro Platte jeweils eine Standardkurve mit vier Standards in definierten sLT-Konzentrationen, ELISA-Puffer und BLANK-Reagenz.

Hinzugegeben werden Enzymkonjugat, welches mit Alkalischer Phosphatase markierte Leukotriene enthält, und eine Antikörper-Lösung mit monoklonalen Anti-sLT-Antikörpern (Maus). Während einer etwa 20stündigen Inkubationszeit konkurrieren die Leukotriene aus den Proben mit den enzymmarkierten Leukotrienen um eine limitierte Anzahl von Bindungsstellen an den Anti-sLT-Antikörpern. Diese binden an die Anti-Maus-IgG-Antikörper der Mikrotiterplatte.

Der ELISA-Puffer wird zur Bestimmung des Nullstandards (S<sub>0</sub>) verwendet, entsprechend der maximalen Bindungsrate. Da im ELISA-Puffer keine Leukotriene enthalten sind, kann eine maximale Anzahl enzymmarkierter Leukotriene an die Anti-sLT-Antikörper binden, so dass sich in der Dichtebestimmung die höchste optische Dichte (OD) ergibt.

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wird das BLANK-Reagenz mit einer sehr hohen sLT-Konzentration verwendet. Es können sich so keine enzymmarkierten Leukotriene an die Bindungsstellen der Anti-sLT-Antikörper binden. Die OD des BLANKS wird von jeder OD der Standards und Proben subtrahiert.

Nach Ende der Inkubationszeit werden in einem Waschschrift die ungebundenen Leukotriene entfernt und Substrat-Lösung (p-Nitrophenylphosphat) hinzugegeben, das vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt umgesetzt wird. Die Reaktion wird durch Zugabe der Stop-Lösung (NaOH-Lösung) beendet und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Die Konzentration der Leukotriene aus den Proben verhält sich dabei indirekt proportional zur optischen Dichte.

### 3.3.2 Verwendete Substanzen und Vorversuche

#### 3.3.2.1 Vorgefertigte Additiva

Es wurden kommerziell beziehbare Additiva verwendet, die unter Zusatzstoffe [siehe 2.5] im Einzelnen bereits beschrieben wurden. Vom Hersteller wurden die Farbstoffe als Mischungen angeboten: Chinolingelb, Gelborange S, Azorubin, Amaranth und Cochenillerot A als Farbstoff-Mischung 1 und Erythrosin, Patentblau V, Indigotin, Brillantschwarz BN und Eisenoxid als Farbstoff-Mischung 2.

#### 3.3.2.2 Inhaltsstoffe der Kapsel-Provokation

Um eventuelle Summationseffekte erfassen zu können, wurde als weitere Testsubstanz die bei der oralen Kapsel-Provokationstestung verwendeten Stoffe untersucht. In den Kapseln befinden sich außer den beschriebenen Einzelstoffen noch weitere Nahrungsmitteladditiva:

Farbstoff: Karmin (roter Naturfarbstoff, der aus Koschenille gewonnen wird)  
Konservierungsmittel: p-Hydroxybenzoesäureester E214-219, Natriumnitrat E251  
Geschmacksverstärker: Natriumglutamat E621  
Antioxidantien: Butylhydroxyanisol E320, Butylhydroxytoluol E321  
natürlich vorkommende Stoffe wie biogene Amine, p-Hydroxybenzoesäureester

Die in pulverisierter Form vorliegenden Inhaltsstoffe wurden zunächst in Lösung gebracht. Aufgrund des unterschiedlichen Lösungsverhaltens der verschiedenen Stoffe mussten verschiedene Lösungsmittel benützt werden. Verwendet wurden PBS (Phosphate Buffered Saline, ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , Dulbecco) und Ethanol (70%). Um toxische Effekte zu vermeiden, wurde der Anteil des Ethanols möglichst gering gehalten. Je nach Stoffmenge in den einzelnen Kapseln wurden verschiedene Mengen Lösungsmittel benutzt, so dass eine Endkonzentration von 0,5mg/ml jedes einzelnen Stoffes in der Ausgangslösung erzielt wurde (Ausnahme: Natriumglutamat aus Kapsel C mit einer Konzentration von 1mg/ml).

Die Art und Menge des verwendeten Lösungsmittels sowie die zur Herstellung der Ausgangslösung verwendete Menge der jeweiligen Substanzlösung kann der Tabelle 1 entnommen werden.

Tab. 1: Einzelstoffe der Kapsel-Provokation und Lösungsmittel

Stoffgruppe	Name	Kapsel- bezeich- nung	E- Nummer	Stoff- menge/ Kapsel	Lösungsmittel	Menge des Lösungs- mittels	für Ausgangslösung entnommene Menge	
<b>Farbstoffe</b> Azofarbstoffe	Tartrazin	D	E 102	50 mg	PBS	10 ml	2 ml	
	Gelborange S	A	E 110	5 mg	PBS			
	Azorubin		E 122	5 mg				
	Amaranth		E 123	5 mg				
	Conchenillerot		E 124	5 mg				
	Brilliant schwarz		E 151	5 mg				
	andere synthet. Farbstoffe	Chinolingelb		E 104				5 mg
		Erythrosin		E 127				5 mg
		Patentblau		E 131				5 mg
		Indigokarmin		E 132				5 mg
Naturfarbstoffe	Eisen-III-oxid,rot		E 172	5 mg				
	Karmin		E 120	5 mg				
<b>Konservierungs- stoffe</b>	Sorbinsäure	B 1	E 200	250 mg	Ethanol	5 ml	0,2 ml	
	Natriumbenzoat div. p-Hydroxy- benzoesäureester	B2	E 211 E 214- E 219	250 mg	PBS	20 ml	0,8 ml	
	Na-Metabisulfit	B3	E 223	50 mg	PBS	10 ml	2 ml	
	Natriumitrat	C	E 251 E 621	100 mg 200 mg	PBS	10 ml	1 ml	
<b>Geschmacks- verstärker</b>	Natriumglutamat							
<b>Antioxidantien</b>	Butylhydroxyanisol	G1	E 320	50 mg	PBS	24 ml	10 ml	
	Butylhydroxytoluol		E 321		Ethanol	26 ml		
<b>Natürlich vorkommende Stoffe</b>	Salicylsäure Biogene Amine p-Hydroxbenzoe- säureester	F1		100 mg	PBS	40 ml	4 ml	

Die Gesamtkonzentration aller Stoffe insgesamt lag weit höher als die der jeweiligen Einzelstoffe. Um unspezifische Reizung, Toxizität und zu geringe Konzentration gegeneinander abgrenzen zu können, wurde daher in einem Vorversuch der konzentrationsabhängige Verlauf der Leukotrienfreisetzung ermittelt. Dazu wurde aus der Ausgangslösung eine Verdünnungsreihe mit Stimulationspuffer im Verhältnis 1:10 hergestellt und in einer Testreihe mit vier Probanden die am besten geeigneten Konzentrationen ermittelt.



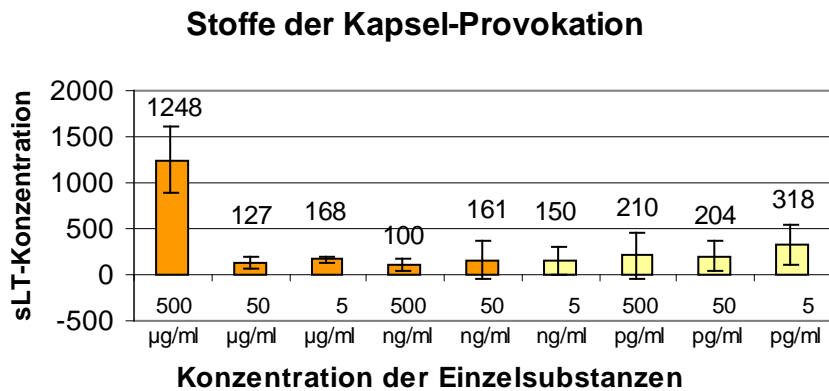


Abb. 5: Konzentrationsabhängige Leukotrienfreisetzung Kapsel-Provokationsstoffe, n=4 Probanden

Die hohe Leukotrienfreisetzung bei Verwendung der höchsten Konzentration ist auf eine unspezifische Reizung durch den relativ hohen Ethanol-Anteil bedingt. In den nächstgeringeren Konzentrationen mit niedriger sLT-Freisetzung schien die toxische Wirkung im Vordergrund zu stehen. In den Konzentrationen 5ng/ml bis 5pg/ml, bezogen auf die Einzelstoffe, zeigte sich eine höhere, dosisabhängige Leukotrienfreisetzung. Diese Konzentrationen wurden daher im Test verwendet.

Die Stoffmischung wurde in einer Konzentration von 5ng/ml in 250µl-Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

#### 3.3.2.3 *Tomate*

Ebenfalls untersucht wurden Rückstand und Destillat aus kalifornischen Freilandtomaten. Im Rückstand befanden sich die Proteine der Tomaten, Histamin und Salicylat, während im Destillat die flüchtigen Aromastoffe enthalten waren [siehe 2.5.7].

##### 3.3.2.3.1 Tomate-Rückstand

Der Rückstand wurde zunächst im Verhältnis 1:10<sup>2</sup> mit PBS verdünnt. Anschließend wurde analog zu den Kapsel-Provokationsstoffen eine Verdünnungsreihe mit Stimulationspuffer im Verhältnis 1:10 hergestellt und in einem Vorversuch die am besten geeigneten Konzentrationen ermittelt.

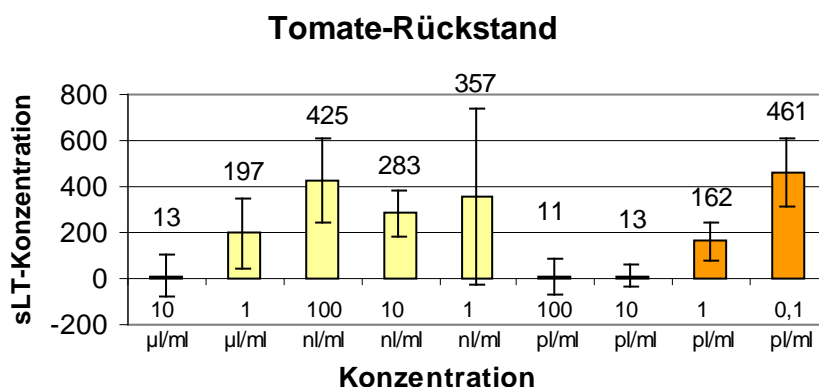


Abb. 6: Konzentrationsabhängige Leukotrienfreisetzung Tomate-Rückstand, n=4 Probanden

Hier zeigte sich für die Konzentrationen 1µl/ml bis 1nl/ml eine relativ gleichmäßige Leukotrienfreisetzung, die auf eine dosisabhängige sLT-Freisetzung schließen lässt. Diese Konzentrationen wurden daher im Test eingesetzt.

Der Rückstand wurde in der höchsten verwendeten Konzentration (1µl/ml) in 250µl-Portionen aliquotiert und bei einer Temperatur von -20°C eingefroren.

### 3.3.2.3.2 Tomate-Destillat

Das Destillat wurde im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt und anschließend eine Verdünnungsreihe mit Stimulationspuffer im Verhältnis 1:10 hergestellt.

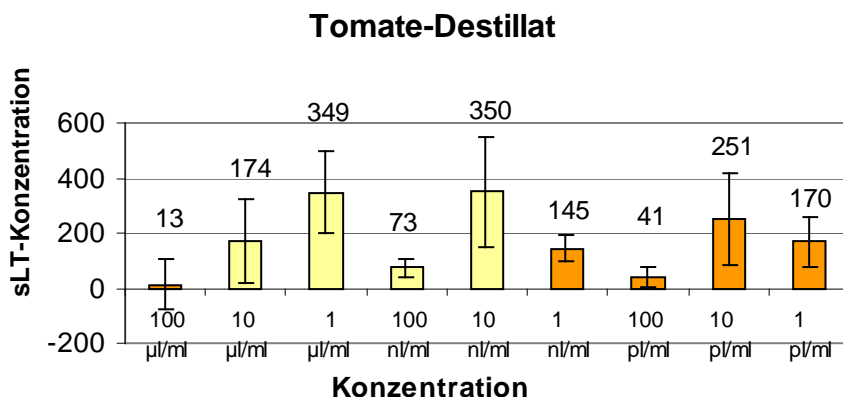


Abb. 7: Konzentrationsabhängige Leukotrienfreisetzung Tomate-Rückstand, n=4 Probanden

Als Testkonzentrationen wurden die Konzentrationen 10µl/ml bis 10nl/ml gewählt.

Auch das Destillat wurde in der höchsten verwendeten Konzentration (10µl/ml) in 250µl-Portionen aliquotiert und bei einer Temperatur von -20°C eingefroren.

### 3.3.2.4 *Festlegung der Grenzwerte*

Aus den Proben von mindestens zehn nicht-allergischen Probanden wurden vom Hersteller die Grenzwerte und Grenzwert-Grauzonen für jede Konzentration der Antigene bestimmt. Zur Festlegung des Grenzwerts wurde, nach Abzug der Leerwerte, der Mittelwert der Leukotrienfreisetzung ermittelt. Die Summe aus Mittelwert und der dreifachen Standardabweichung ergab den Grenzwert. Die Grauzone repräsentiert die Werte zwischen dem Grenzwert und der Summe aus Mittelwert und zweifacher Standardabweichung.

Zur Bestimmung der Grenzwerte der Kapsel-Provokationsstoffe, Tomate-Rückstand und Tomate-Destillat wurde analog dazu verfahren. Der Mittelwert der Leukotrienfreisetzung aus den Proben von acht gesunden Probanden wurde für jede Konzentration errechnet und als Grenzwert die Summe aus Mittelwert und dreifacher Standardabweichung festgelegt.

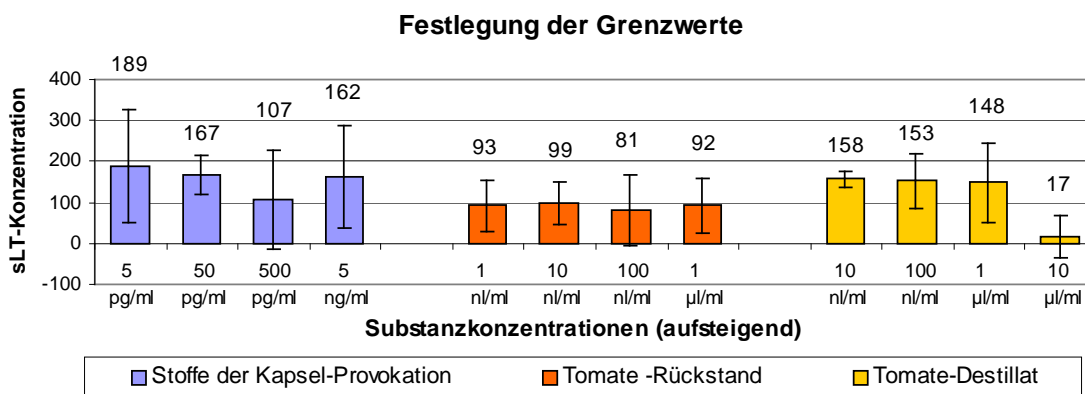


Abb. 8: Festlegung der Grenzwerte aus den Proben von acht gesunden Probanden, dargestellt sind die Mittelwerte

### 3.3.2.5 Vorversuche

In der Vorphase erfolgte die Blutentnahme zunächst direkt mit den kommerziell erhältlichen CAST-Probeentnahme-Röhrchen. Dabei wurde aufgrund der erniedrigten sLT-Freisetzung festgestellt, dass der Unterdruck in den Röhrchen sich schädigend auf die Leukozyten auszuwirken schien. Die Proben wurden in der Folge erst nach der Blutentnahme in die CAST-Probeentnahme-Röhrchen umgefüllt.

## 3.4 Software und mathematische Formeln

Es wurde das Statistikprogramm ‚SPSS 11.5‘, ‚Microsoft Excel 97‘ und das MS-Dos-basierte Programm ‚P.Fit‘ verwendet sowie eine Vierfeldertafel zur Berechnung von Sensitivität, Spezifität und den prädiktiven Werten.

### 3.4.1 Vierfeldertafel

	Provokationstest positiv	Provokationstest negativ
Testergebnis positiv	A	B
Testergebnis negativ	C	D

Die Sensitivität (Ss) lässt sich mit der Formel

$Ss = (A / (A+C)) \times 100$  errechnen.

Zur Berechnung der Spezifität (Sp) wird die Formel

$Sp = (D / (B+D))$  verwendet.

Die prädiktiven Werte, die den Anteil der ‚Richtig-Positiven‘ in der Menge der positiven Testergebnisse ( $P^+$ ) beziehungsweise der ‚Richtig-Negativen‘ in der Menge der negativen Testergebnisse ( $P^-$ ) angeben, werden mit den Formeln

positiver prädiktiver Wert  $P^+ = (A / (A+B)) \times 100$

negativer prädiktiver Wert  $P^- = (D / (C+D)) \times 100$  bestimmt.

## 3.5 Durchführung

### 3.5.1 Verwendete Reagenzien (Bühlmann Laboratories AG, Schweiz)

- Dextran-Lösung
- Stimulationspuffer (lyophilisiert, enthält nach Auflösen in 50 ml destilliertem Wasser 20ng/ml IL- 3)
- Stimulationkontrolle (lyophilisiert, enthält monoklonale Antikörper (Maus) gegen den hochaffinen IgE-Rezeptor, nach Auflösen in 3,5 ml destilliertem Wasser 2,75µg/ml)
- ELISA-Puffer
- Sulfidoleukotrien-Standard (lyophilisiert, enthält nach Auflösen in 1ml destilliertem Wasser Sulfidoleukotriene in einer Konzentration von 6400 pg/ml)
- BLANK-Reagenz (lyophilisiert, enthält eine sehr hohe Konzentration an Sulfidoleukotrienen)

- Enzym-Konjugat (lyophilisiert, enthält Leukotrien D4, markiert mit Alkalischer Phosphatase)
- Antikörper-Lösung (monoklonale Anti-sLT-Antikörper; Maus)
- Waschpuffer (30ml Konzentrat, mit 570ml destilliertem Wasser zu verdünnen)
- Substrat-Lösung (gepufferte p-Nitophenylphosphat (pNPP) -Lösung)
- Stop-Lösung (1M NaOH-Lösung)
- Nahrungsmitteladditiva:
  - Farbstoff-Mischung 1: 250µg Chinolingelb (E104), 250µg Gelborange S (E110), 100µg Azorubin (E122), 250µg Amaranth (E123), 250µg Cochenillerot A (E124)
  - Farbstoffmischung 2: 250µg Erythrosin (E127), 250µg Patentblau V (E131), 250µg Indigotin I (E132), 250µg Brillantschwarz BN (E151), 250µg Eisenoxid (E172)
  - Tartrazin (E102), 250µg
  - Natriumbenzoat (E211), 250µg
  - Natriumnitrit (E250), 250µg
  - Kaliummetabisulfit (E224), **25µg**
  - Natriumsalicylat, 250µg

### 3.5.2 weitere Reagenzien

- Kapselprovokationsstoffe 5ng/ml, Tomate Rückstand 1µl/ml, Tomate-Destillat 10µl/ml
- Destilliertes Wasser

### 3.5.3 Verwendete Geräte und Materialien

- Zentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0R)
- Inkubator (Heraeus Instruments)
- Wirbelmischer (IKA-Schüttler MTS 4, Jahnke und Kunkel)
- ELISA-Reader (Dynatech Laboratories, MRX)
- Messpipette (Glas)
- Mikroliterpipetten 10-100µl, 200-1000µl (Eppendorf)
- Einmal-Pasteurpipette
- Becherglas (100ml)
- Falcon-Röhrchen 15ml (Greiner)
- Eppendorf-Tips 1,5ml
- S-Monovette (Sarstedt)
- Folie zum Abdecken der Mikrotiterplatte
- CAST-Probeentnahme-Röhrchen (enthalten neben EDTA zusätzlich Stabilisatoren und Nährstoffe, Bühlmann)
- Mikrotiterplatte mit 96 Mikroküvetten, beschichtet mit Anti-Maus-IgG-Antikörpern (polyklonal, Kaninchen) (Bühlmann)

### 3.5.4 Isolation der Leukozyten

Den Probanden wurde mit einer Monovette, aus der das Kunststoffgranulat entfernt wurden, etwa 10ml Blut entnommen. Die Probe wurde sofort in drei Nährstoff- und

Stabilisatorenhaltige CAST-Probeentnahme-Röhrchen gegeben und sanft geschüttelt. Anschließend erfolgte die Umfüllung in ein Becherglas.

Mit einer Messpipette wurden 10ml der Probe in ein 15ml Falcon-Röhrchen pipettiert. 2,5ml Dextran-Lösung wurden hinzugegeben, durch leichtes Schütteln vermischt und 90 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die obere Plasmaphase vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und in ein weiteres 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Durch Zentrifugation (130xg, 15 Min., Zimmertemperatur) erfolgte die Sedimentation der Leukozyten. Die im Überstand befindlichen Thrombozyten wurden vorsichtig dekantiert. Die sedimentierten Leukozyten wurden in 10ml Stimulationspuffer resuspendiert.

#### Herstellung der Zusatzstoff-Konzentrationen und Vorbereitung der Stimulation

Die in pulverisierter Form vorliegenden Nahrungsmitteladditiva wurden in je 250µl Stimulationspuffer gelöst. Es wurde eine lineare Verdünnungsreihe (1:10) mit drei Schritten mit Stimulationspuffer hergestellt. Die selbst hergestellten Substanzen wurden analog verdünnt. Es entstanden so Lösungen in den Konzentrationen:

Farbstoffmischungen 1 und 2, Tartrazin, Benzoat, Nitrit und Salicylat: 1000µg/ml, 100µg/ml, 10µg/ml 1µg/ml

Metabisulfit: 100µg/ml, 10µg/ml, 1µg/ml, 0,1µg/ml

Kapsel-Provokationsstoffe: 5ng/ml, 500pg/ml, 50pg/ml, 5pg/ml

Tomate-Rückstand: 1µl/ml, 100nl/ml, 10nl/ml, 1nl/ml

Tomate-Destillat: 10µl/ml, 1µl/ml, 100nl/ml, 10nl/ml

In 40 beschriftete Eppendorf-Tips wurden je 50µl jeder Substanz-Konzentration pipettiert. Pro Patientenprobe wurden außerdem 50µl Stimulationspuffer zur Leerwert-Bestimmung (PB) sowie 50µl der Stimulationskontrolle (PC) vorgelegt.

#### 3.5.5 Zellstimulation

In die vorbereiteten Eppendorf-Tips mit den verschiedenen Substanzkonzentrationen, Stimulationspuffer (PB) und der Stimulationskontrolle (PC) wurden je 200µl der resuspendierten Leukozytenlösung gegeben. Die Eppendorf-Tips wurden verschlossen und bei 37°C 40 Min. inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die stimulierten Proben kurz auf einem Wirbelmischer (600 Upm) geschüttelt, um eventuell entstandene Fibrintröpfchen aufzulösen.

Anschließend erfolgte eine weitere kurze Zentrifugation (1000xg, 3 Min., 4°C), um die Leukozyten zu sedimentieren.

#### Herstellung der Standardreihe

Der tiefgekühlte Sulfidoleukotrien-Standard wurde in 1ml destilliertem Wasser gelöst. Mit ELISA-Puffer wurde eine lineare Verdünnungsreihe (1:4) mit drei Schritten hergestellt. Die so hergestellte Standardreihe enthielt Leukotriene in den vier Konzentrationen:

S1= 6400pg/ml, S2=1600pg/ml, S3=400pg/ml, S4=100pg/ml

### 3.5.6 Bestimmung der Leukotrien-Konzentrationen

In je zwei Mikroküvetten der Mikrotiterplatte wurden jeweils 100µl des in 2ml destilliertem Wasser aufgelösten BLANK-Reagenz (BL), ELISA-Puffer (S0) und die vier Standardkonzentrationen pipettiert. Aus jeder Probe wurden je 100µl des Zellüberstands in zwei Mikroküvetten überführt.

Anschließend wurde in jede Mikroküvette 50µl des in 11ml destilliertem Wasser gelösten Enzym-Konjugat und 50µl der Anti-sLT-Antikörper-Lösung hinzugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit Folie abgedeckt und über Nacht 18-24 Stunden bei 4°C inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte dekantiert und zwei mal mit je 400 µl Waschpuffer pro Mikroküvette gewaschen.

In jede Mikroküvette wurde 100µl Substrat-Lösung gegeben. Auf dem Wirbelmischer erfolgte bei 500 UpM ein weiterer Inkubationsschritt von 30 Minuten.

Zum Beenden der Reaktion wurde in jede Mikroküvette 100µl der Stop-Lösung pipettiert. Im Anschluss daran erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm.

### 3.5.7 Berechnung der Leukotrien-Konzentrationen

Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Es wurde zunächst von allen Doppelbestimmungen der Mittelwert gebildet. Alle im Folgenden verwendeten Bezeichnungen beziehen sich auf den Mittelwert.

Zunächst wurde die prozentuale Bindungsrate (B/Bo) jeder Messung berechnet, die die optische Dichte (OD) der Messung im Verhältnis zum Nullstandard S0 (maximale Bindung, OD des ELISA-Puffer) darstellt. Jeder (Mittel-)Wert der OD wurde um die unspezifische Bindung (die OD des BLANK) berichtigt.

#### Berechnung der Standardkurve:

Mit der Formel

$$B/B_0(\%) = (OD\ Standard\ (S_x) - OD\ des\ BLANK) / (OD\ Nullstandard\ (S_0) - OD\ BLANK)$$

wurden entsprechend die prozentualen Bindungsraten B/Bo der vier Standardkonzentrationen im Verhältnis zur maximalen Bindung S0 errechnet.

Die prozentualen Bindungsraten können in halblogarithmischer Darstellung aufgetragen und so die bestangepasste Standardkurve zeichnerisch ermittelt werden. Eine genauere Bestimmung ist mittels des MS-Dos basierten Programms ‚P.Fit‘ möglich, das hier verwendet wurde. Durch Eingabe der Standardkonzentrationen und der entsprechenden Bindungsraten in die Formel

$$Y = Min. + (Max. - Min.) / (1 + ((X / X_{50})^{-P}))$$

wird eine geglättete Standardkurve erstellt mit Berechnung der Konstanten (Min., Max., X<sub>50</sub> und P). X für die Standard-Konzentrationen, Y gibt die prozentuale Bindungsrate (B/Bo) wieder.

#### Berechnung der Leukotrien-Konzentrationen

Die Formel wurde nach X aufgelöst und die Bindungsraten (B/Bo) aller Leukotrienbestimmungen für Y eingesetzt.

$$X = ((( (Max. - Min.) / (Y - Min.)) - 1)^{1/P}) \times X_{50}$$

Man erhält so die der prozentualen Bindungsrate ( $Y=B/B_0$ ) entsprechende Leukotrien-Konzentration (X).

## 4 Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Säulendiagrammen und in Boxplotgraphiken, in denen die Mittelwerte und Mediane miteinander verglichen werden. Die Mittelwerte werden in Säulendiagrammen gezeigt, jede Säule entspricht dem Mittelwert einer Probandengruppe nach Stimulation mit der jeweiligen Stoffkonzentration. Aus der Boxplotdarstellung werden die Mediane ersichtlich. Die rote Fläche begrenzt die 25- und 75%-Quantile, zwischen denen der Median als schwarzer Balken liegt. Über beziehungsweise unter diesen Quantilen lagen die 10- und 90%-Quantile. In den Graphiken sind die Probandengruppen abgekürzt mit KG (Kontrollgruppe), DR (Diätrespondergruppe), KR (Kapselrespondergruppe) und NR (Nonrespondergruppe). GW entspricht dem Grenzwert. Die mit n angegebene Probandenzahl variiert, da in der Kontrollgruppe und in der Diätrespondergruppe nicht bei allen Probanden sämtliche Konzentrationen getestet wurden.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Student-t-tests und des Wilcoxon-Tests. Der Student-t-Test basiert auf einem Vergleich der Mittelwerte. Der Wilcoxon-Test ist verteilungsunabhängiger, sensibel gegenüber Median-Unterschieden und unempfindlicher als der Student-t-Test gegenüber Schiefen und Varianzunterschieden.

### 4.1 basale sLT-Freisetzung

Die Probanden der Kapselrespondergruppe zeigten nach Priming mit IL-3 die höchste Sulfidoleukotrienfreisetzung mit einer Spanne von 215-1006pg/ml (Mittelwert 467pg/ml, Median 412pg/ml). Etwas niedriger lag die sLT-Freisetzung der Diätrespondergruppe (127-831pg/ml, Mittelwert 454pg/ml, Median 461pg/ml). Die sLT-Freisetzung der Kontrollgruppe (0-691pg/ml, Mittelwert 349pg/ml, Median 328pg/ml) und der Nonrespondergruppe (11-727pg/ml, Mittelwert 306pg/ml, Median 242pg/ml) war deutlich geringer.

Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

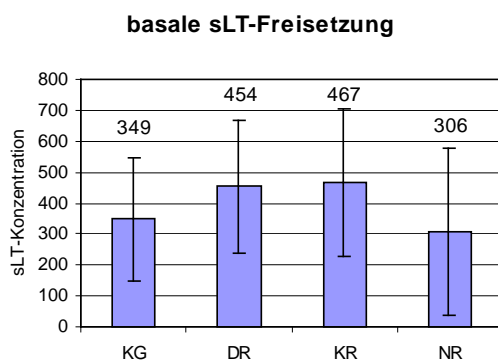


Abb. 9: Mittelwerte

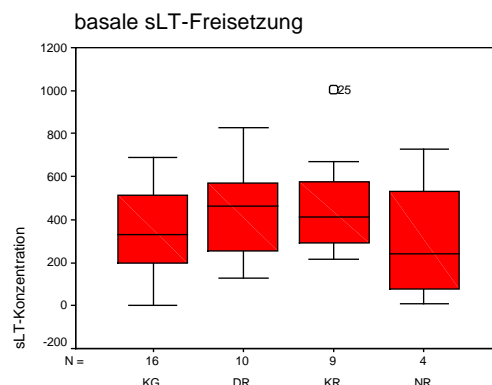


Abb. 10: Mediane der basalen sLT-Freisetzung

### 4.2 Stimulationskontrolle mit anti-IgE-Rezeptorantikörper

Nach Stimulation mit anti-IgE-Rezeptorantikörper, durch die die Leukozyten maximal zur sLT-Produktion stimuliert werden, zeigten die Probanden der Kapselrespondergruppe eine im Vergleich zu den übrigen Gruppen deutlich höhere sLT-

Freisetzung. Die Werte bewegten sich zwischen 1584 bis 16890pg/ml, Mittelwert 5729pg/ml, Median 2826g/ml.

Die Kontrollgruppe (138-6673pg/ml) wies einen Mittelwert von 2553pg/ml und einen Median von 2447pg/ml auf; Diätrespondergruppe (1188-6030pg/ml) Mittelwert 2760pg/ml, Median 2306pg/ml); Nonrespondergruppe (1485-2747pg/ml), Mittelwert 2337pg/ml, Median 2358pg/ml.

Im t-Test war die sLT-Freisetzung der Kapselrespondergruppe gegenüber der Kontrollgruppe mit  $p < 0,05$  signifikant erhöht; die Unterschiede zu den übrigen Gruppen waren nicht signifikant ( $p < 0,2$ ).

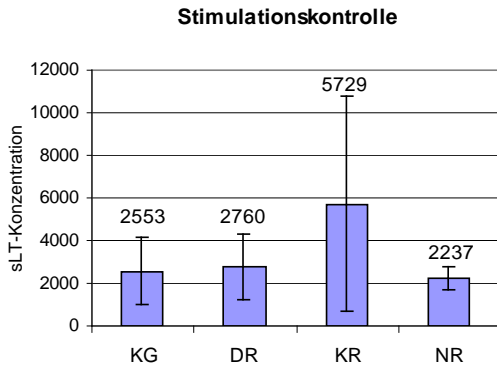


Abb. 11: Mittelwerte

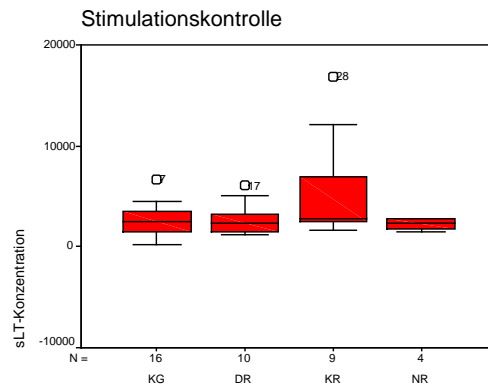


Abb. 12: Mediane der Stimulationskontrolle

### 4.3 Farbstoff-Mischung 1

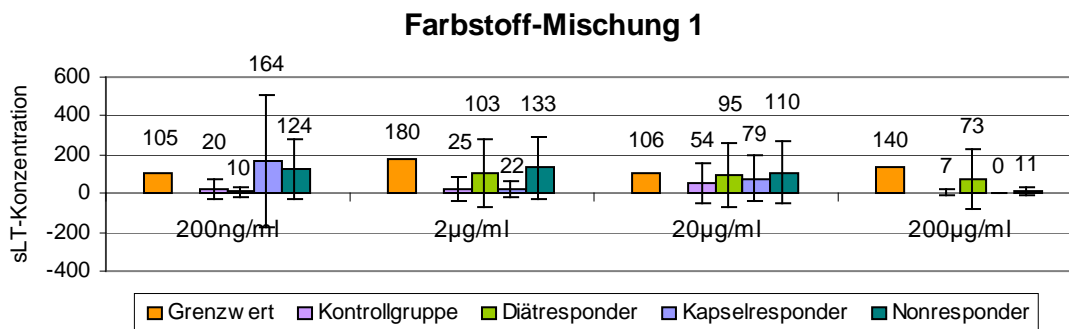


Abb. 13: Mittelwerte der Leukotrienfreisetzung nach Stimulation mit der Farbstoff-Mischung 1

In der geringsten Konzentration von 0,2µg/ml lagen der Mittelwert der Kapselrespondergruppe (164pg/ml) und der Nonrespondergruppe (124pg/ml) über dem Grenzwert von 105pg/ml. Die Mediane beider Gruppen (Kapselrespondergruppe 0, Nonrespondergruppe 56pg/ml) erreichten den Grenzwert nicht. In der Kapselrespondergruppe lagen in dieser Konzentration die sLT-Werte von drei Probanden über dem Grenzwert bei einer Spannweite von 0-1096pg/ml, in der Nonrespondergruppe ein sLT-Wert (0-383pg/ml); in der Kontrollgruppe ebenfalls ein Wert (0-159pg/ml).

Auch in der zweithöchsten Konzentration (20µg/ml) lag der Mittelwert der Nonrespondergruppe (110pg/ml) geringfügig über dem Grenzwert von 106pg/ml, Median 28g/ml. Dabei lag ein Wert (384pg/ml) über dem Grenzwert.

In den beiden übrigen Konzentrationen (2µg/ml, 200µg/ml) wurden die Grenzwerte von den Mittelwerten und Medianen nicht überschritten.

Zwischen den Ergebnissen der Gruppen fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.



In der Auswertung der einzelnen Testergebnisse wies in der Kontrollgruppe ein Proband ein positives Ergebnis auf (n=16), in der Diätrespondergruppe zwei Probanden (n=10), Kapselrespondergruppe ebenfalls ein positives Ergebnis (n=9) und in der Nonrespondergruppe einer von vier Probanden.

Damit ließ sich insgesamt keine erhöhte sLT-Freisetzung der Leukozyten nach Stimulation mit der Farbstoffmischung 1 nachweisen.

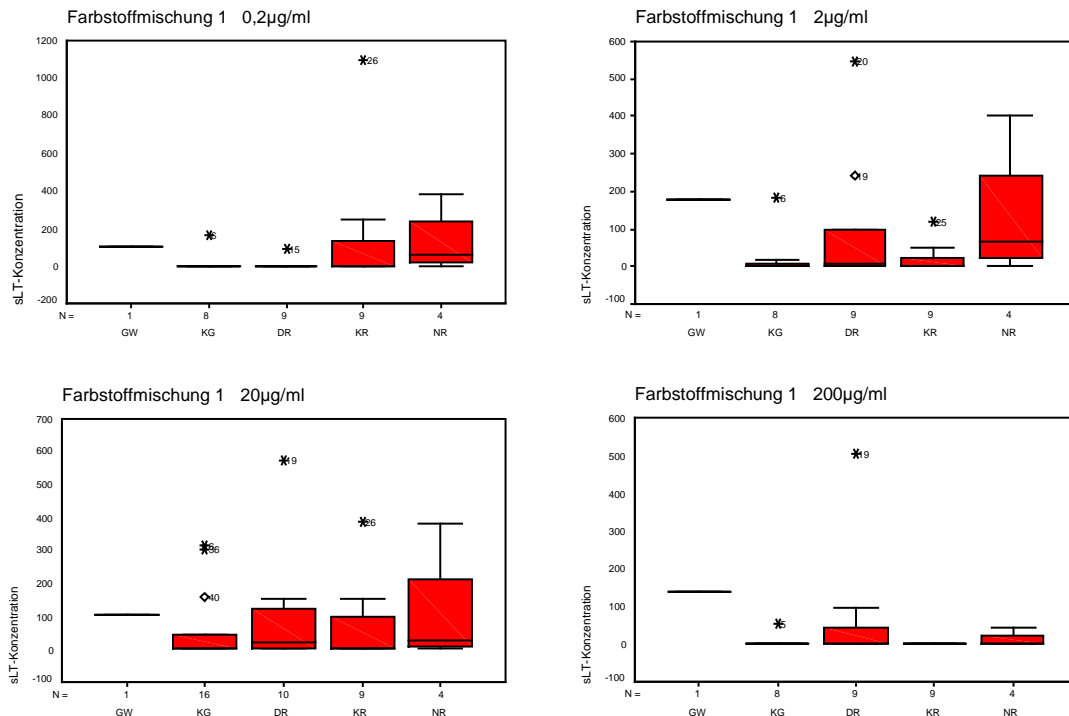


Abb. 14: Boxplotdarstellung der Ergebnisse des CAST-ELISA mit der Farbstoff-Mischung 1

#### 4.4 Farbstoff-Mischung 2

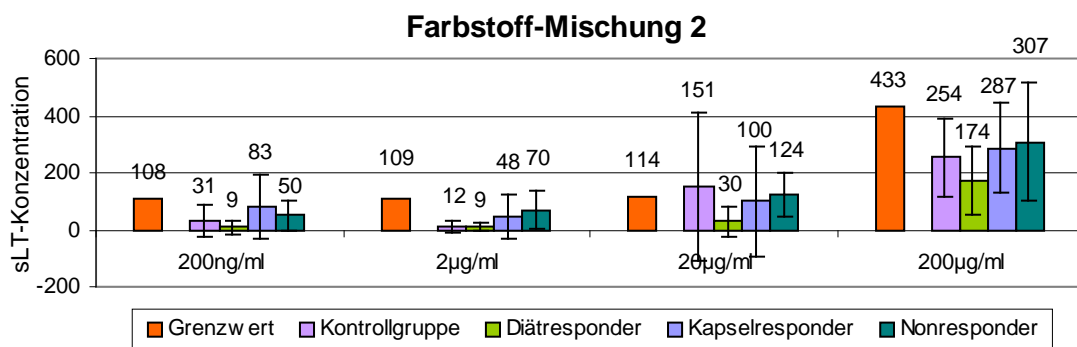


Abb. 15: Mittelwerte der Leukotrienfreisetzung nach Stimulation mit der Farbstoff-Mischung 2

Bei der Farbstoffmischung 2 überschritt nach Stimulation mit einer Stoffkonzentration von 20 µg/ml der Mittelwert der Nonrespondergruppe (124 pg/ml) den Grenzwert von 114 pg/ml, der Median lag bei 138 pg/ml. Die sLT-Werte von drei Probanden lagen über dem Grenzwert (n=4). Im t-Test lag mit  $p < 0,05$  die sLT-Freisetzung der Nonrespondergruppe statistisch signifikant über der Freisetzung der Diätrespondergruppe. Auch der Mittelwert der Kontrollgruppe lag in dieser Konzentration mit 151 pg/ml über dem Grenzwert, Median 53 pg/ml, sechs sLT-Werte (n=16) lagen über dem Grenzwert. Die Mittelwerte und Mediane von Diätrespondergruppe und Kapselrespondergruppe blieben unter dem Grenzwert.

In allen übrigen Konzentrationen wurden die Grenzwerte von den Mittelwerten und Medianen nicht überschritten.

Bei der Auswertung der einzelnen Testergebnisse wies in der Kontrollgruppe ein Proband ein positives Ergebnis auf (n=16), in der Diätrespondergruppe kein positives Ergebnis. In der Kapselrespondergruppe fanden sich zwei positive Ergebnisse (n=9) und in der Nonrespondergruppe zeigte einer von vier Probanden ein positives Ergebnis.

Die Höhe der sLT-Freisetzung der verschiedenen Gruppen unterschied sich statistisch nicht signifikant.

Trotz der Grenzwertüberschreitungen in der zweithöchsten Konzentration ließ sich insgesamt für keine der Probandengruppen eine kontinuierlich erhöhte Leukotrienfreisetzung nach Stimulation mit der Farbstoffmischung 2 nachweisen.

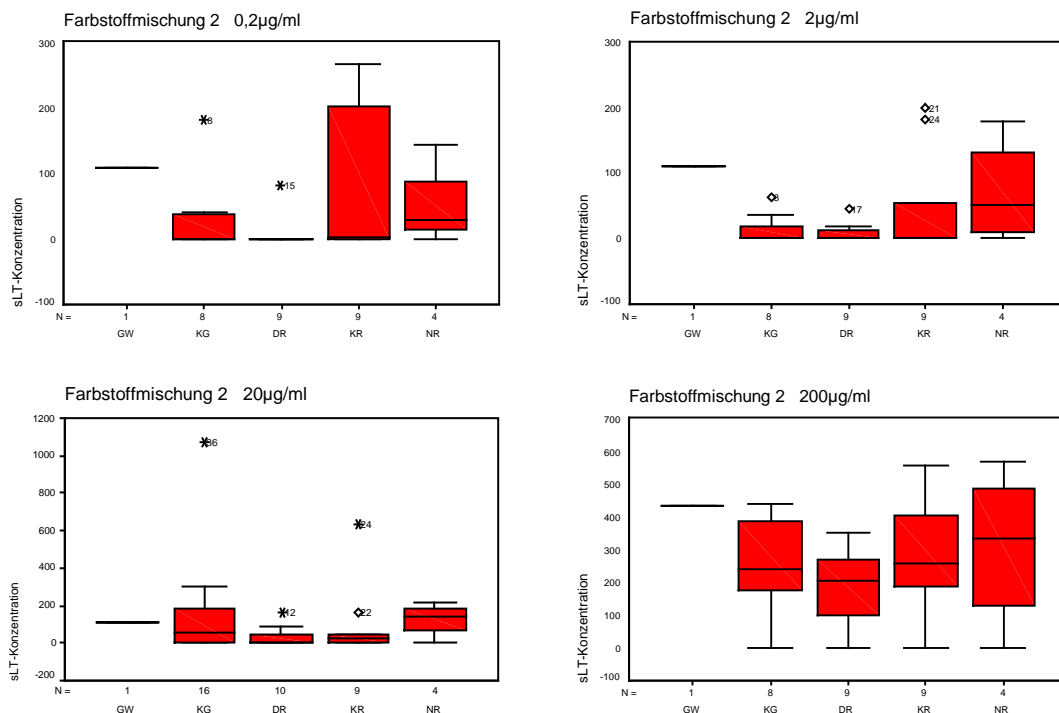


Abb. 16: Boxplotdarstellung der Ergebnisse des CAST-ELISA mit der Farbstoff-Mischung 2

## 4.5 Tartrazin

### 4.5.1 Stimulation mit Tartrazin-Konzentration von 0,2µg/ml

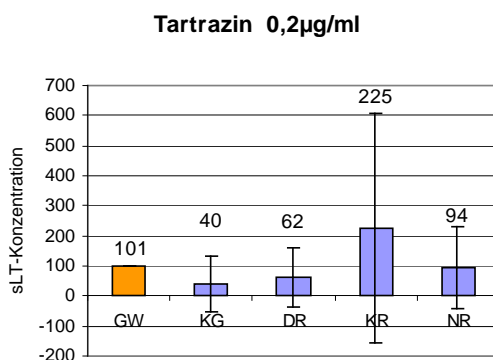


Abb. 17: Mittelwerte

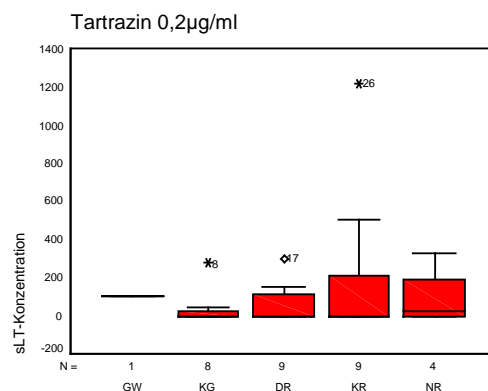


Abb. 18: Mediane nach Stimulation mit Tartrazin 0,2µg/ml

Mit einem Mittelwert von 225pg/ml lag die sLT-Freisetzung der Kapselrespondergruppe deutlich über dem Grenzwert von 101pg/ml, Median 0. Die sLT-Werte bewegten sich zwischen 0-1218pg/ml, dabei lagen vier Werte (n=9) über dem Grenzwert. In der Kontrollgruppe wurde ein Mittelwert von 40pg/ml erreicht, Median 0, Werte zwischen 0-278pg/ml, einer der sLT-Werte lag über dem Grenzwert. In der Diätrespondergruppe bewegte sich die sLT-Freisetzung zwischen 0-301pg/ml, Mittelwert 62pg/ml, Median 0, drei der sLT-Werte lagen über dem Grenzwert. In der Nonrespondergruppe war die sLT-Freisetzung zwischen 0-324pg/ml, Mittelwert 94pg/ml, Median 27pg/ml, ein sLT-Wert lag über dem Grenzwert.

Die Unterschiede in der Höhe der Sulfidoleukotrienfreisetzung waren statistisch nicht signifikant.

#### 4.5.2 Stimulation mit Tartrazin-Konzentration von 2µg/ml

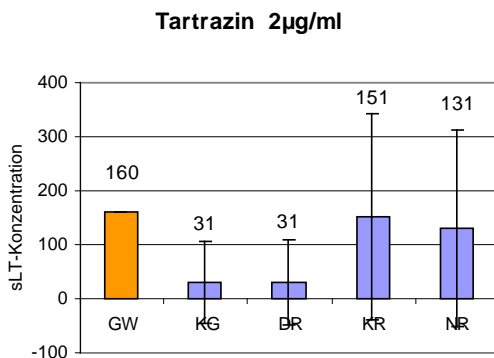


Abb. 19: Mittelwerte

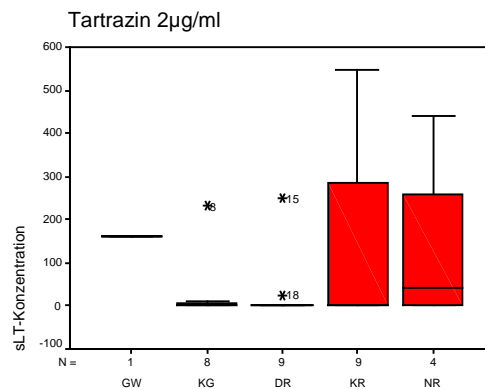


Abb. 20: Mediane nach Stimulation mit Tartrazin 2µg/ml

In dieser Konzentration erreichte keiner der Mittelwerte und Mediane den Grenzwert von 160pg/ml. Die sLT-Freisetzung der Kontrollgruppe bewegte sich zwischen 0-232pg/ml, Mittelwert 31pg/ml, Median 0, ein sLT-Wert lag über dem Grenzwert. In der Diätrespondergruppe lag die sLT-Freisetzung zwischen 0-249pg/ml, Mittelwert 31pg/ml, Median 0, ein sLT-Wert lag über dem Grenzwert. Kapselrespondergruppe: sLT-Freisetzung zwischen 0-549pg/ml, Mittelwert 151pg/ml, Median 0, vier sLT-Werte lagen über dem Grenzwert. Nonrespondergruppe: 0-440pg/ml, Mittelwert 131pg/ml, Median 41pg/ml, ein sLT-Wert lag über dem Grenzwert.

Die Höhe der sLT-Freisetzung der einzelnen Gruppen wies keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

#### 4.5.3 Stimulation mit Tartrazin-Konzentration von 20 µg/ml

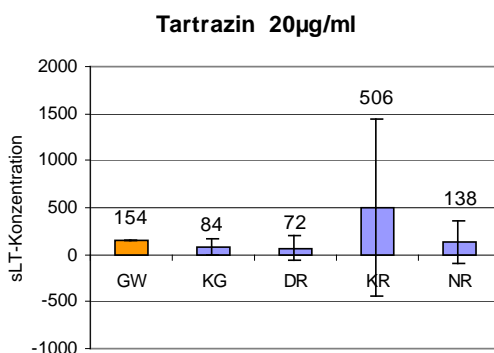


Abb. 21: Mittelwerte

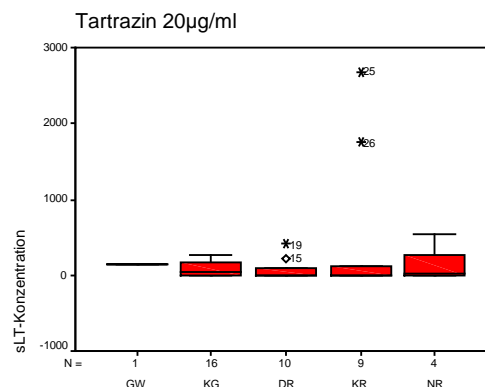


Abb. 22: Mediane nach Stimulation mit Tartrazin 20µg/ml

In dieser Konzentration überschreitet die Kapselrespondergruppe mit einer mittleren sLT-Freisetzung von 506pg/ml deutlich den Grenzwert von 154pg/ml, der Median lag bei 0, die einzelnen Werte bewegten sich zwischen 0-2687pg/ml; zwei sLT-Werte (n=9) lagen über dem Grenzwert. In der Kontrollgruppe bewegte sich die sLT-Freisetzung zwischen 0-258pg/ml, Mittelwert 84pg/ml, Median 47pg/ml, fünf sLT-Werte lagen über dem Grenzwert (n=16). Die Diätrespondergruppe erreichte einen Mittelwert von 72pg/ml, Median 0, Werte zwischen 0-407pg/ml, zwei sLT-Werte überschritten den Grenzwert (n=10). Für der Nonrespondergruppe ergab sich ein Mittelwert von 138pg/ml, Median 7,5pg/ml, Werte zwischen 0-536pg/ml, ein sLT-Wert überschreitet den Grenzwert (n=4).

Die Unterschiede in der Höhe der Sulfidoleukotrienfreisetzung zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant.

#### 4.5.4 Stimulation mit Tartrazin-Konzentration von 200µg/ml

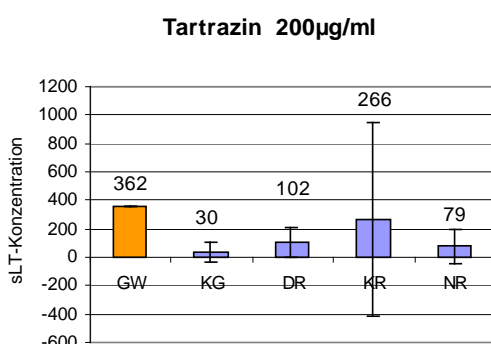


Abb. 23: Mittelwerte

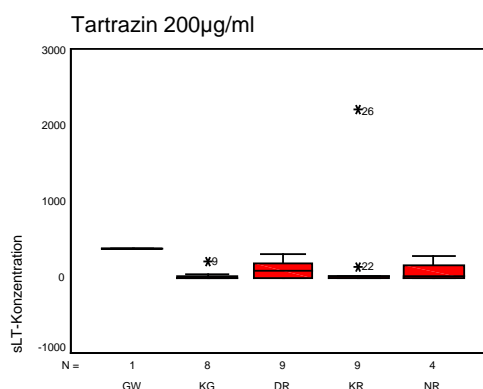


Abb. 24: Mediane nach Stimulation mit Tartrazin 200µg/ml

In dieser Konzentration wurde der Grenzwert von 362pg/ml von keinem der Mediane und Mittelwerte überschritten. In der Kontrollgruppe bewegten sich die Werte zwischen 0-212pg/ml, Mittelwert 30pg/ml, Median 0, kein sLT-Wert überschreitet den Grenzwert. In der Diätrespondergruppe lag die sLT-Freisetzung zwischen 0-307pg/ml, Mittelwert 102pg/ml, Median 84pg/ml, kein sLT-Wert lag über dem Grenzwert. Die sLT-Freisetzung in der Kapselrespondergruppe lag zwischen 0-2194pg/ml, Mittelwert 266pg/ml, Median 18pg/ml, ein sLT-Wert über dem Grenzwert. In der Nonrespondergruppe wurde ein Mittelwert von 79pg/ml erreicht, Median 15pg/ml, die einzelnen Werte lagen zwischen 0-286pg/ml, kein sLT-Wert überschreitet den Grenzwert.

Auch hier fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Höhe der sLT-Freisetzung der einzelnen Gruppen.

#### 4.5.5 Auswertung aller Konzentrationen und Bewertung

Bei der Auswertung der einzelnen Testergebnisse fanden sich in der Kapselrespondergruppe 4 positive Ergebnisse (n=9), in der Diätrespondergruppe wies ein Proband ein positives Testergebnis auf (n=10). In der Kontrollgruppe war ein Ergebnis positiv bei 16 getesteten Probanden, Nonrespondergruppe ein positives Ergebnis bei insgesamt 4 Probanden.

In keiner Konzentration fanden sich statistisch signifikante Unterschiede in der Höhe der Leukotrienfreisetzung zwischen den einzelnen Gruppen.

Insgesamt zeigte sich bei dieser Substanz eine Tendenz der Kapselrespondergruppe zu einer etwas erhöhten Sulfidoleukotrienfreisetzung. Dies spiegelte sich in den deut-

lich über den Grenzwert erhöhten Mittelwerten in der geringsten und zweithöchsten Konzentration wieder wie auch in der höheren Anzahl der positiven Testergebnisse.

Die Sensitivität lag bei 44,4%, Spezifität 90%. Der positive prädiktive Wert betrug 57,1%, negativer prädiktiver Wert 84,3%.

## 4.6 Benzoat

### 4.6.1 Stimulation mit Benzoat-Konzentration von 0,2µg/ml

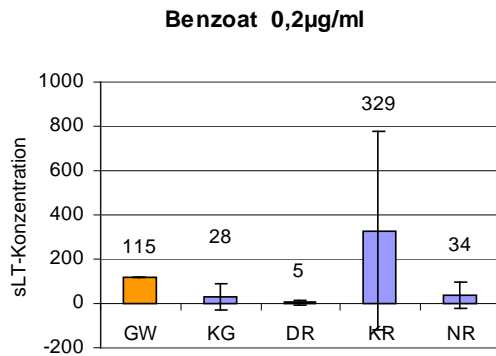


Abb. 25: Mittelwerte

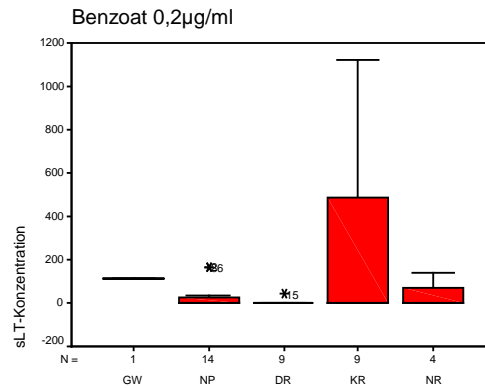


Abb. 26: Mediane nach Stimulation mit Benzoat 0,2µg/ml

Nach Stimulation der Leukozyten mit Benzoat in dieser Konzentration überschritt der Mittelwert der Kapselrespondergruppe mit 329pg/ml weit den Grenzwert von 115pg/ml, der Median lag bei 0. Die sLT-Freisetzung bewegte sich zwischen 0-1122pg/ml, bei vier Probanden (n=9) lag die Freisetzung über dem Grenzwert. Die höhere sLT-Freisetzung der Kapselrespondergruppe zeigte sich auch in den weit höher liegenden 75- und 90%-Quantilen in der Boxplotdarstellung.

Der Mittelwert der Kontrollgruppe lag bei 28pg/ml, Median 0, Werte zwischen 0-169pg/ml, dabei zwei sLT-Werte über dem Grenzwert (n=14). In der Diätrespondergruppe bewegten sich die Werte zwischen 0-42pg/ml, kein sLT-Wert lag über dem Grenzwert, Mittelwert 5pg/ml, Median 0. Die Nonrespondergruppe erreichte einen Mittelwert von 34pg/ml, Median 0, Werte zwischen 0-137pg/ml, ein sLT-Wert lag über dem Grenzwert (n=4).

Im t-Test ergab sich mit  $p < 0,05$  eine statistisch signifikant höhere sLT-Freisetzung der Kapselrespondergruppe gegenüber der Kontrollgruppe; im Vergleich von Kapselrespondergruppe und Diätrespondergruppe lagen die Werte der Kapselrespondergruppe höher mit  $p = 0,056$ .

#### 4.6.2 Stimulation mit Benzoat-Konzentration von 2µg/ml

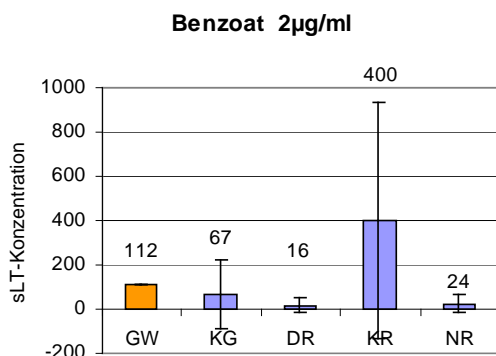


Abb. 27: Mittelwerte

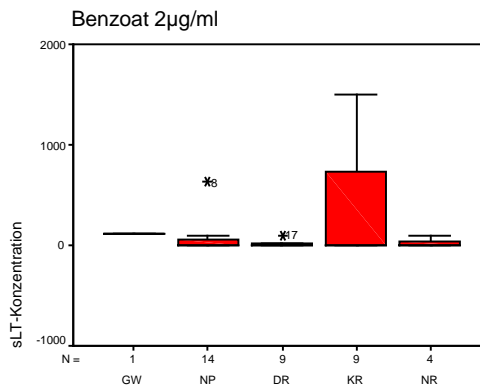


Abb. 28: Mediane nach Stimulation mit Benzoat 2µg/ml

In dieser Konzentration lag der Mittelwert der Kapselrespondergruppe mit 400pg/ml ebenfalls weit über dem Grenzwert von 112pg/ml, der Median lag bei 0. Vier sLT-Werte in dieser Gruppe (n=9) lagen über dem Grenzwert, die Werte bewegten sich zwischen 0-1501pg/ml. Auch in dieser Konzentration wieder weit höhere 75- und 90%-Quantile der Kapselrespondergruppe in der Boxplotdarstellung.

Die Kontrollgruppe erreichte einen Mittelwert von 67pg/ml, Median 0, Werte zwischen 0-627pg/ml, ein sLT-Wert über dem Grenzwert (n=14). Der Mittelwert der Diätrespondergruppe lag bei 16pg/ml, Median 0, Werte zwischen 0-105pg/ml; der Mittelwert der Nonrespondergruppe lag mit 24pg/ml ebenfalls weit unter dem Grenzwert, Median 0, Werte zwischen 0-95pg/ml. In beiden Gruppen überschritt keiner der sLT-Werte den Grenzwert.

Die sLT-Freisetzung der Kapselrespondergruppe lag im t-Test mit  $p < 0,05$  statistisch signifikant über den Ergebnissen der Diätrespondergruppe; im Vergleich von Kapselrespondergruppe und Kontrollgruppe zeigte die Kapselrespondergruppe eine mit  $p = 0,057$  höhere sLT-Freisetzung.

#### 4.6.3 Stimulation mit Benzoat-Konzentration von 20µg/ml

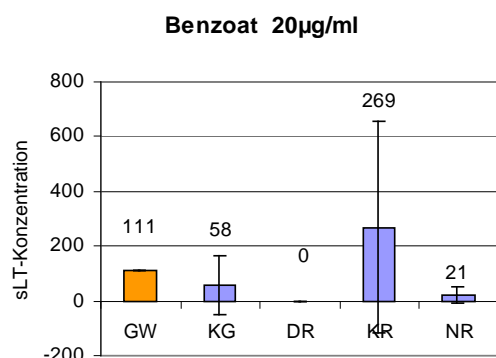


Abb. 29: Mittelwerte

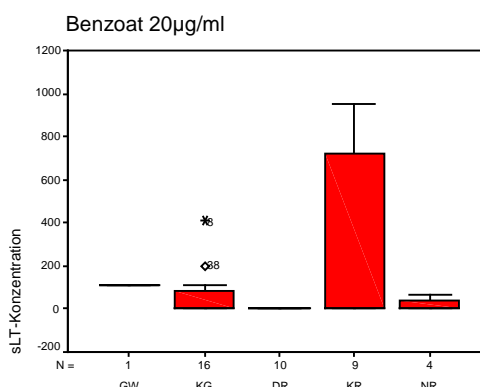


Abb. 30: Mediane nach Stimulation mit Benzoat 20µg/ml

Auch für die zweithöchste Konzentration ergab sich ein ähnliches Bild; der Mittelwert der Kapselrespondergruppe lag mit 269pg/ml weit über dem Grenzwert von 111pg/ml, Median 0, Werte zwischen 0-956pg/ml, dabei lagen drei sLT-Werte (n=9) über dem Grenzwert. Die 75- und 90%-Quantile in der Boxplotdarstellung lagen entsprechend höher als die der anderen Gruppen.

In der Kontrollgruppe war der Mittelwert 58pg/ml, Median 0, Werte zwischen 0-410pg/ml, ebenfalls drei sLT-Werte lagen über dem Grenzwert mit 112, 203 und 410pg/ml. Der Mittelwert und Median der Diätrespondergruppe war 0, dementsprechend alle sLT-Werte gleich 0. Die Nonrespondergruppe wies einen Mittelwert von 21pg/ml auf, Median 7,5, Werte zwischen 0-68pg/ml.

Im Vergleich wies die Kapselrespondergruppe mit  $p=0,052$  eine höhere sLT-Freisetzung als die Diätrespondergruppe auf.

#### 4.6.4 Stimulation mit Benzoat-Konzentration von 200µg/ml

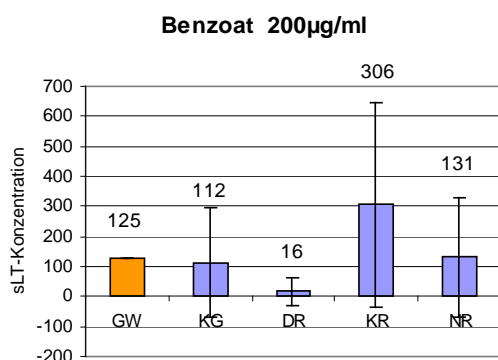


Abb. 31: Mittelwerte

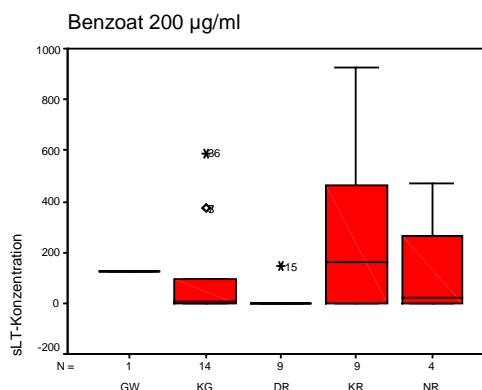


Abb. 32: Mediane nach Stimulation mit Benzoat 200µg/ml

In der höchsten Konzentration dieser Substanz erreichte die Kapselrespondergruppe einen deutlich über den Grenzwert von 125pg/ml erhöhten Mittelwert von 306pg/ml, auch der Median lag mit einem Wert von 161pg/ml über dem Grenzwert. Die einzelnen sLT-Werte bewegten sich zwischen 0-927pg/ml, fünf Werte (n=9) lagen über dem Grenzwert. Auch hier lagen die 75- und 90%-Quantile der Kapselrespondergruppe höher als die der übrigen Gruppen.

Der Mittelwert der Nonrespondergruppe lag mit 131pg/ml etwas über dem Grenzwert, Median 25pg/ml, Werte zwischen 0-473pg/ml, ein sLT-Wert (n=4) lag über dem Grenzwert. Die Kontrollgruppe wies einen Mittelwert von 112pg/ml, Median bei 6,5pg/ml, Werte zwischen 0-588pg/ml, dabei drei sLT-Werte (n=14) über dem Grenzwert. Der Mittelwert der Diätrespondergruppe lag mit 16pg/ml deutlich niedriger, Median 0, Werte zwischen 0-145pg/ml, ein sLT-Wert über dem Grenzwert (n=9).

Statistisch signifikant lagen die Werte der Kapselrespondergruppe mit  $p<0,05$  im t-Test und im Wilcoxon-Test über den Ergebnissen der Diätrespondergruppe.

#### 4.6.5 Auswertung aller Konzentrationen und Bewertung

In allen vier Konzentrationen lagen die Mittelwerte der Kapselrespondergruppe deutlich über den jeweiligen Grenzwerten, der Median überschritt in einer Konzentration (200µg/ml) den Grenzwert. Die Leukotrienfreisetzung der Kontrollgruppe, Diätrespondergruppe und Nonrespondergruppe lag weit niedriger, lediglich in der höchsten Konzentration überschritt der Mittelwert der Nonrespondergruppe gering den Grenzwert.

Dies spiegelte sich auch in den einzelnen Testergebnissen wieder; in der Kontrollgruppe ergaben sich zwei positive Ergebnisse (n=16), Diätrespondergruppe kein positives Ergebnis (n=10), in der Kapselrespondergruppe wiesen vier Probanden ein positives Ergebnis auf (n=9), Nonrespondergruppe ein Test von insgesamt vier positiv.

In der statistischen Auswertung ergab sich nach Stimulation mit drei Konzentrationen (0,2; 2; 200µg/ml) dieser Substanz mit  $p < 0,05$  eine höhere sLT-Freisetzung der Kapselrespondergruppe gegenüber der Kontrollgruppe bzw. Diätrespondergruppe.

Insgesamt ließ sich damit nach Stimulation der Leukozyten mit Benzoat in der Kapselrespondergruppe eine deutlich höhere sLT-Freisetzung als in den übrigen Gruppen nachweisen. Die Sensitivität lag bei 44,4%, Spezifität 93,3%. Für den positiven prädiktiven Wert ergaben sich 66,6%, der negative prädiktive Wert lag bei 84,8%.

## 4.7 Nitrit

### 4.7.1 Stimulation mit Nitrit-Konzentration von 0,2µg/ml

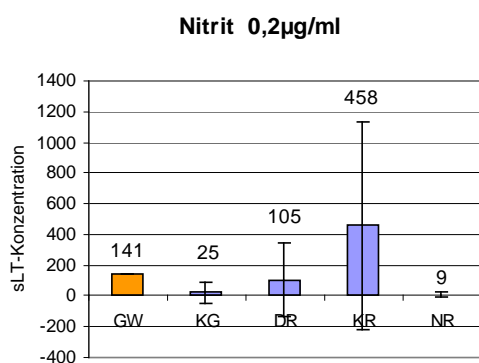


Abb. 33: Mittelwerte

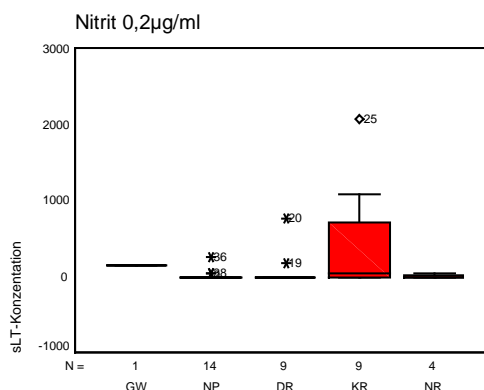


Abb. 34: Mediane nach Stimulation mit Nitrit 0,2µg/ml

In der kleinsten Konzentration überschritt der Mittelwert der Kapselrespondergruppe mit 458pg/ml weit den Grenzwert von 141pg/ml; der Median lag bei 31pg/ml und damit unter dem Grenzwert. Die sLT-Freisetzung bewegte sich in einem Rahmen von 0-2071pg/ml, vier der sLT-Werte ( $n=9$ ) lagen über dem Grenzwert. In der Boxplotdarstellung lagen die 75- und 90%-Quantile der Kapselrespondergruppe weit über den Quantilen der übrigen Gruppen. In der Diätrespondergruppe wurde der Grenzwert mit einem Mittelwert von 105pg/ml nicht überschritten, Median 0, Werte zwischen 0-762pg/ml, zwei der sLT-Werte lagen oberhalb des Grenzwertes ( $n=9$ ). Die Werte der Kontrollgruppe lagen zwischen 0-267pg/ml, Mittelwert 25pg/ml, Median 0, ein sLT-Wert lag oberhalb des Grenzwertes ( $n=14$ ). Der Mittelwert der Nonrespondergruppe war mit 9pg/ml ebenfalls gering, Median 0, Werte zwischen 0-34pg/ml, keiner der Werte lag über dem Grenzwert.

Statistisch signifikant höher war mit  $p < 0,05$  im t-Test die sLT-Freisetzung der Kapselrespondergruppe im als die der Kontrollgruppe.



#### 4.7.2 Stimulation mit Nitrit-Konzentration von 2µg/ml

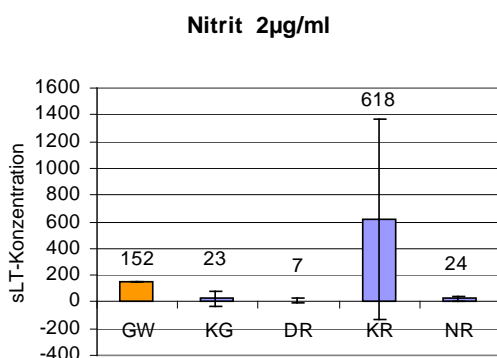


Abb. 35: Mittelwerte

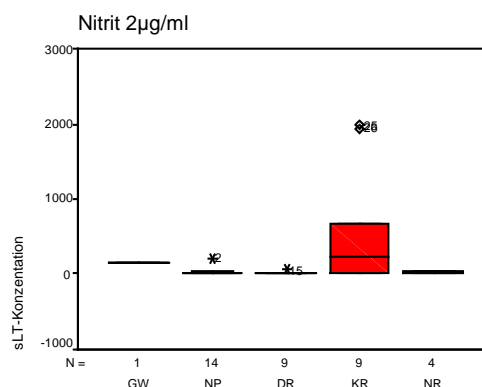


Abb. 36: Mediane nach Stimulation mit Nitrit 2µg/ml

Auch in dieser Konzentration überschritt der Mittelwert der Kapselrespondergruppe mit einem Wert von 618pg/ml weit den Grenzwert von 152pg/ml; der Median lag bei 230pg/ml und damit ebenfalls oberhalb des Grenzwertes. Die einzelnen Werte bewegten sich zwischen 0-1975pg/ml, sechs sLT-Werte (n=9) lagen über dem Grenzwert. Dies spiegelte sich auch hier in den höherliegenden Quantilen in der Boxplotdarstellung wieder. Die sLT-Freisetzung der Diätrespondergruppe war mit einem Mittelwert von 7pg/ml, Median 0, weit geringer; die einzelnen Werte bewegten sich zwischen 0-64pg/ml, dementsprechend kein Wert oberhalb des Grenzwertes (n=9). In der Kontrollgruppe lagen die einzelnen sLT-Werte zwischen 0-218pg/ml, Mittelwert 23pg/ml, Median 0, ein Wert lag über dem Grenzwert (n=14). In der Nonrespondergruppe bewegten sich die Werte zwischen 0-50pg/ml, der Mittelwert betrug 24pg/ml. Median 22pg/ml.

Die sLT-Freisetzung der Kapselrespondergruppe lag mit  $p < 0,05$  im t-Test und im Wilcoxon-Test statistisch signifikant höher als die sLT-Freisetzung der Diätrespondergruppe und der Kontrollgruppe.

#### 4.7.3 Stimulation mit Nitrit-Konzentration von 20µg/ml

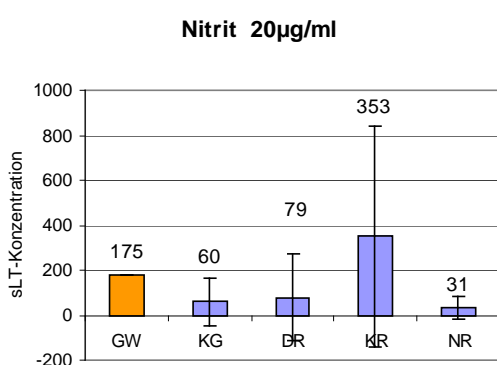


Abb. 37: Mittelwerte

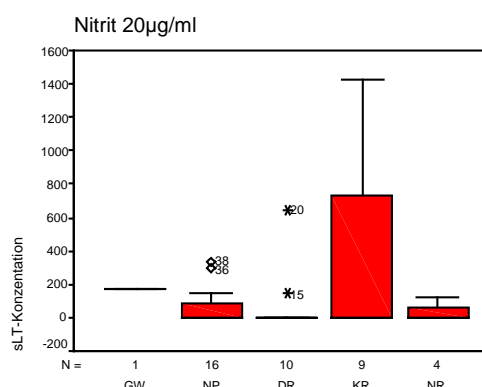


Abb. 38: Mediane nach Stimulation mit Nitrit 20µg/ml

Auch nach Stimulation der Leukozyten mit der zweithöchsten Konzentration von Nitrit zeigte die Kapselrespondergruppe die höchste Sulfidoleukotrienfreisetzung. Mit einem Mittelwert von 353pg/ml wird der Grenzwert von 175pg/ml weit überschritten. Der Median lag allerdings bei 0, vier der sLT-Werte (n=9) überschreiten den Grenzwert und bewegten sich zwischen 0-1429pg/ml. Auch hier wieder höher liegende 75- und 90%-Quantile der Kapselrespondergruppe. Der Mittelwert der Diätrespondergruppe lag mit 79pg/ml deutlich niedriger, Median 0, Werte zwischen 0-646pg/ml,

ein sLT-Wert (n=10) lag über dem Grenzwert. In der Kontrollgruppe bewegte sich die sLT-Freisetzung zwischen 0-335pg/ml, zwei der sLT-Werte (n=16) lagen über dem Grenzwert, Mittelwert 79pg/ml, Median 0. Die Nonrespondergruppe erreichte einen Mittelwert von 31pg/ml, Median bei 4pg/ml, sLT-Freisetzung zwischen 0-117pg/ml, kein Wert überschritt den Grenzwert.

Auch in dieser Konzentration lag die sLT-Freisetzung der Kapselrespondergruppe mit  $p < 0,05$  im t-Test statistisch signifikant über der sLT-Freisetzung der Kontrollgruppe.

#### 4.7.4 Stimulation mit Nitrit-Konzentration von 200µg/ml

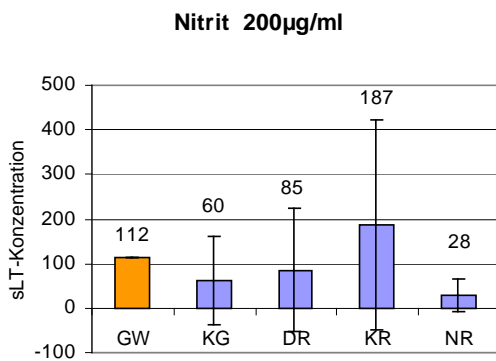


Abb. 39: Mittelwerte

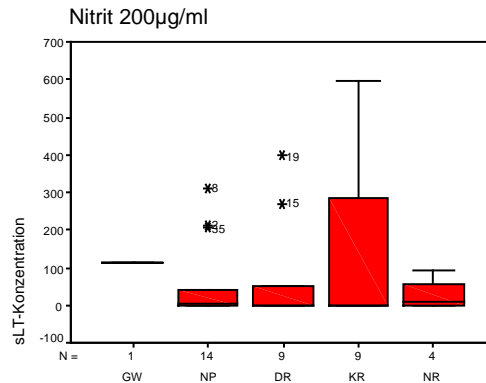


Abb. 40: Mediane nach Stimulation mit Nitrit 200µg/ml

Nach Stimulation mit der höchsten Nitrit-Konzentration zeigte erneut die Kapselrespondergruppe die höchste sLT-Freisetzung mit einem Mittelwert von 187pg/ml, der Grenzwert lag in dieser Konzentration bei 112pg/ml und wurde damit überschritten. Der Median lag bei 0, sLT-Werte zwischen 0-596pg/ml, vier Werte (n=9) lagen oberhalb des Grenzwertes. In dieser Konzentration ebenfalls höhere 75- und 90%-Quantile der Kapselrespondergruppe. Die Diätrespondergruppe wies einen Mittelwert von 85pg/ml auf, Median bei 0, sLT-Werte zwischen 0-398pg/ml, zwei der Werte lagen oberhalb des Grenzwertes (n=9). In der Kontrollgruppe wurde ein Mittelwert von 60pg/ml erreicht, Median bei 6pg/ml. Die einzelnen Werte lagen zwischen 0-312pg/ml, drei der sLT-Werte lagen oberhalb des Grenzwertes (n=14). Die sLT-Freisetzung der Nonrespondergruppe bewegte sich in dieser Konzentration zwischen 0-90pg/ml, Mittelwert 28pg/ml, der Median lag bei 11,5pg/ml.

Die Höhe der sLT-Freisetzung unterschied sich in dieser Konzentration nicht statistisch signifikant.

#### 4.7.5 Auswertung aller Konzentrationen und Bewertung

Nach Stimulation mit Nitrit lagen in allen vier Konzentrationen die Mittelwerte der Kapselrespondergruppe weit über den jeweiligen Grenzwerten; in der zweitniedrigsten Konzentration (2µg/ml) überschritt auch der Median den Grenzwert. Der Grenzwert wurde von den Mittelwerten aller übrigen Gruppen nicht erreicht. Die höhere sLT-Freisetzung wurde auch aus den höheren 75%- und 90%-Quantilen der Kapselrespondergruppe in allen vier Konzentrationen in der Boxplotdarstellung deutlich.

Bei Auswertung der einzelnen Testergebnisse fanden sich in der Kapselrespondergruppe fünf positive Ergebnisse (n=9), Diätrespondergruppe zwei positive Tests (n=10), in der Kontrollgruppe ebenfalls zwei von 16 Tests, in der Nonrespondergruppe war kein Ergebnis positiv (n=4).

Statistisch signifikant höher ( $p < 0$ ) waren in der drei geringeren Konzentrationen die Werte der Kapselrespondergruppe als die Werte der Kontrollgruppe bzw. der Diätrespondergruppe ( $2\mu\text{g/ml}$ ).

Für Nitrit konnte damit nach Stimulation der basophilen Leukozyten mit dieser Substanz eine höhere Sulfidoleukotrienfreisetzung der Kapselrespondergruppe gezeigt werden. Die Sensitivität lag bei 55,5%, die Spezifität bei 86,6%. Für den positiven prädiktiven Wert ergab sich ein Wert von 55,5%, der negative prädiktive Wert war 86,6%.

#### 4.8 Metabisulfit

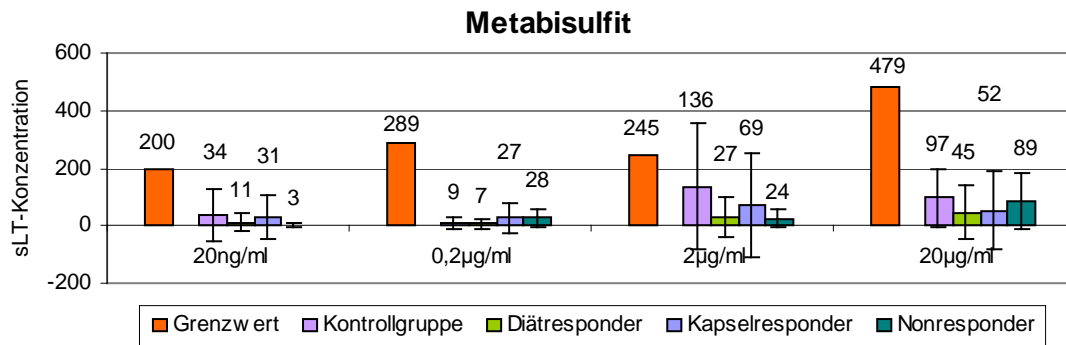


Abb. 41: Mittelwerte der Leukotrienfreisetzung nach Stimulation mit Metabisulfit

Wie in der Graphik dargestellt, wurden bei dieser Substanz die jeweiligen Grenzwerte in keiner Konzentration von einem der Mittelwerte überschritten. Auch sämtliche Mediane blieben unter den Grenzwerten. Bei Betrachtung sLT-Freisetzung der einzelnen Probanden fanden sich nur wenig über dem Grenzwert liegende Werte; in der geringsten Konzentration überschritt die sLT-Freisetzung jeweils eines Probanden der Kapselrespondergruppe ( $n=9$ ) und der Kontrollgruppe ( $n=8$ ) den Grenzwert, in der zweithöchsten Konzentration ( $2\mu\text{g/ml}$ ) überschritt ebenfalls die sLT-Konzentration eines Probanden aus der Kapselrespondergruppe den Grenzwert sowie die sLT-Konzentration von vier Probanden aus der Kontrollgruppe ( $n=16$ ). In den übrigen Konzentrationen lagen die Werte in allen Gruppen unter den jeweiligen Grenzwerten. Auch in der Boxplotdarstellung waren für keine der Gruppen die Quantile durchgängig erhöht.

Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der sLT-Freisetzung zwischen den einzelnen Gruppen.

Bei der Auswertung der einzelnen Testergebnisse erreichten aus der Kontrollgruppe zwei Probanden ein positives Testergebnis ( $n=16$ ), aus der Kapselrespondergruppe ein Proband ( $n=9$ ), kein positives Testergebnis in der Diätrespondergruppe und Nonrespondergruppe.

Eine erhöhte sLT-Freisetzung in einer der Gruppen nach Stimulation mit Metabisulfit ließ sich somit nicht nachweisen.

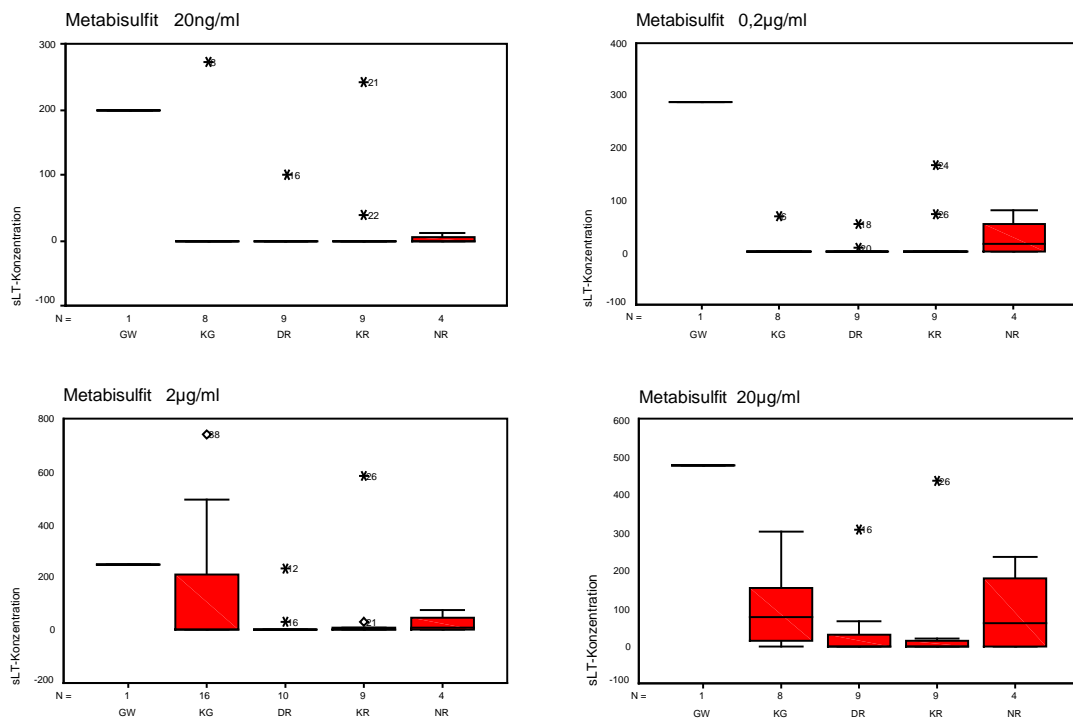


Abb. 42: Boxplotdarstellung der Ergebnisse des CAST-ELISA mit Metabisulfit

## 4.9 Salicylat

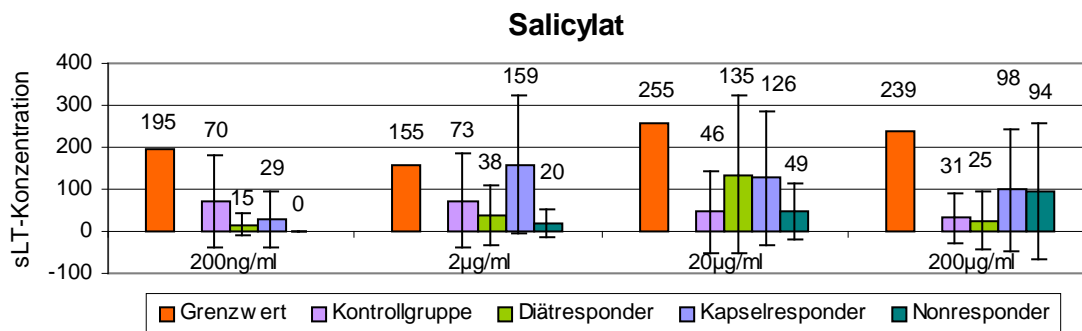


Abb. 43: Mittelwerte der Leukotrienfreisetzung nach Stimulation mit Salicylat

Nach Stimulation der Leukozyten mit dieser Substanz überschritt bei einer Konzentration von 2µg/ml die sLT-Freisetzung der Kapselrespondergruppe mit einem Mittelwert von 159pg/ml gering den Grenzwert von 155pg/ml, auch der Median lag mit einem Wert von 156pg/ml minimal über dem Grenzwert. Dementsprechend lag die sLT-Freisetzung von fünf Probanden (n=9) über dem Grenzwert mit einer Breite von insgesamt 0-448pg/ml. Der höher liegende Median sowie höhere 75- und 90%-Quantile der Kapselrespondergruppe zeigten sich auch in der Boxplotdarstellung. In der übrigen Konzentrationen wurden die jeweiligen Grenzwerte von keinem der Mittelwerte und Mediane erreicht; es lagen in allen Gruppen null bis zwei sLT-Werte über dem Grenzwert.

Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der sLT-Freisetzung zwischen den einzelnen Gruppen.

Bei der Auswertung der einzelnen Testergebnisse fanden sich in der Kapselrespondergruppe zwei positive Ergebnisse (n=9), in der Diätrespondergruppe ein positives Ergebnis (n=10). Kontrollgruppe (n=16) und Nonrespondergruppe (n=4) wiesen keine positiven Testergebnisse auf.

Die nach Stimulation mit einer Salicylatkonzentration von 2µg/ml höhere sLT-Freisetzung der Kapselrespondergruppe ließ sich für die übrigen Konzentrationen nicht nachweisen, so dass sich insgesamt bei dieser Substanz keine erhöhte sLT-Freisetzung in einer der Gruppen zeigen ließ.

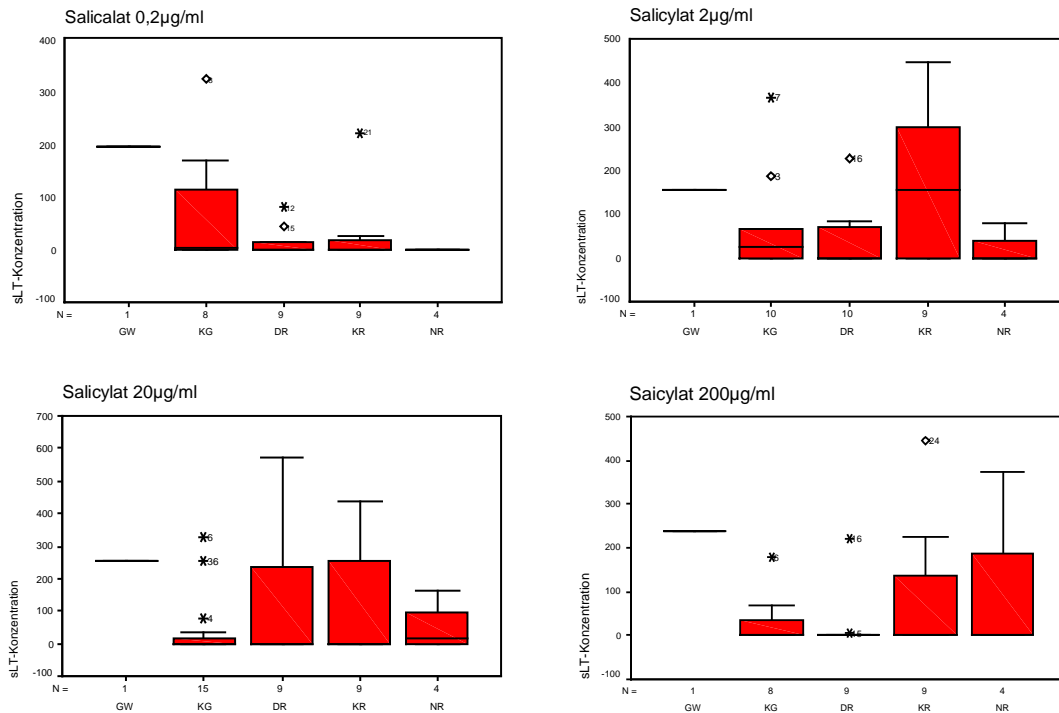


Abb. 44: Boxplotdarstellung der Ergebnisse des CAST-ELISA mit Salicylat

#### 4.10 Stoffe der Kapsel-Provokationstestung

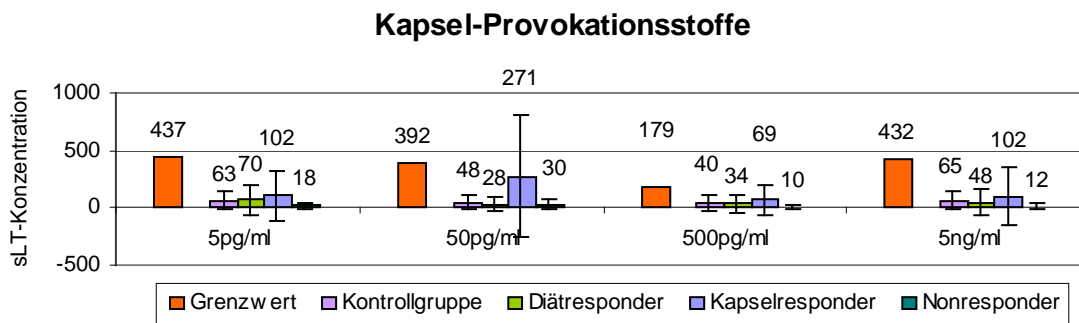


Abb. 45: Mittelwerte der Leukotrienfreisetzung nach Stimulation mit Kapsel-Provokationsstoffen

Auch nach Stimulation der Leukozyten mit den Stoffen der Kapsel-Provokation wurden die jeweiligen Grenzwerte von keinem der Mittelwerten und Mediane überschritten. Dementsprechend überschritten nur wenige sLT-Werte die jeweiligen Grenzwerte. Bei einer Stoffkonzentration von 50pg/ml lagen in der Kapselrespondergruppe zwei der sLT-Werte über dem Grenzwert; bei allen übrigen Konzentrationen jeweils ein Wert. Bei einer Konzentration von 500 pg/ml überschritt in der Diätrespondergruppe und Kontrollgruppe jeweils ein sLT-Wert den Grenzwert. In der Nonrespondergruppe wurden die Grenzwerte in keiner Konzentration erreicht.

Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Höhe der sLT-Freisetzung der einzelnen Gruppen.

In der Auswertung der einzelnen Testergebnisse fanden sich lediglich in der Kapselrespondergruppe (n=9) zwei positive Testergebnisse, in den übrigen Gruppen war in der Gesamtauswertung kein Ergebnis positiv (Kontrollgruppe n=16, Diätrespondergruppe n=10, Nonrespondergruppe n=4).

Auch hier ließ sich eine erhöhte sLT-Freisetzung nach Stimulation der Leukozyten mit diesen Substanzen nicht belegen.

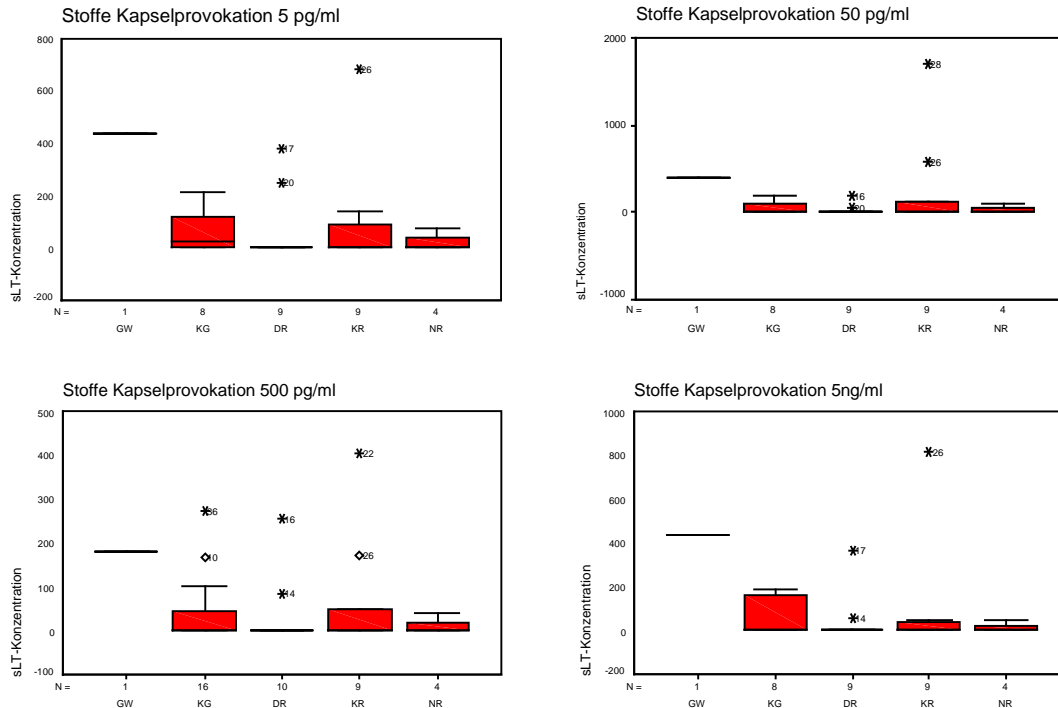


Abb. 46: Boxplotdarstellung der Ergebnisse des CAST-ELISA mit Kapsel-Provokationsstoffen

#### 4.11 Tomate Rückstand

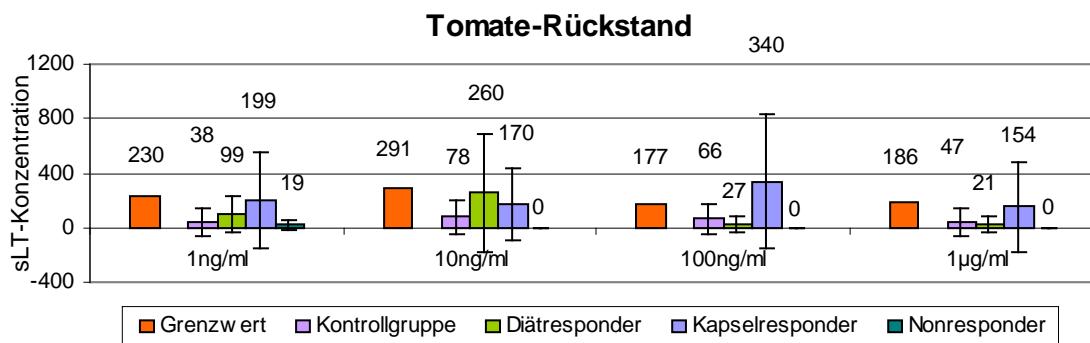


Abb. 47: Mittelwerte der Leukotrienfreisetzung nach Stimulation mit Tomate-Rückstand

Nach Stimulation der Leukozyten mit einer Konzentration von 100ng/ml überschritt der Mittelwert (340pg/ml) der Kapselrespondergruppe den Grenzwert von 177pg/ml, der Median der Kapselrespondergruppe lag bei 0. Vier sLT-Werte (n=9) dieser Gruppe lagen oberhalb des Grenzwertes und bewegten sich in einem Bereich von 295-1395pg/ml, die übrigen Probanden dieser Gruppe wiesen keine messbare sLT-Freisetzung auf. Die Mittelwerte und Mediane der Kontrollgruppe, Diätrespondergruppe und Nonrespondergruppe erreichten den Grenzwert nicht mit jeweils 0-3 über dem Grenzwert liegenden sLT-Werten. In allen übrigen Konzentrationen waren Mittelwerte und Mediane aller Probandengruppen unterhalb des Grenzwertes.

In den beiden mittleren Konzentrationen (10ng/ml, 100ng/ml) war der Mittelwert der Kontrollgruppe nicht erhöht, im t-Test ergaben sich dennoch mit  $p < 0,05$  statistisch signifikant höhere Werte der Kontrollgruppe (n=14 bzw.16) gegenüber der Non-respondergruppe (n=4). Die sLT-Freisetzung aller Probanden der Nonrespondergruppe war in diesen Konzentrationen und der höchsten Konzentration (1µg/ml) gleich 0. Weitere statistisch signifikante Unterschiede fanden sich nicht.

Bei der Auswertung der einzelnen Testergebnisse fand sich in der Kontrollgruppe ein positives Ergebnis (n=16), in der Diätrespondergruppe zwei positive Ergebnisse (n=10), in der Kapselrespondergruppe drei positive Ergebnisse (n=9) und in der Non-respondergruppe (n=4) kein positives Ergebnis.

Trotz der höheren sLT-Freisetzung der Kapselrespondergruppe bei einer Konzentration von 100ng/ml konnte eine durchgängig erhöhte Sulfidoleukotrienfreisetzung nach Stimulation mit Tomate-Rückstand in keiner der Gruppen nachgewiesen werden.

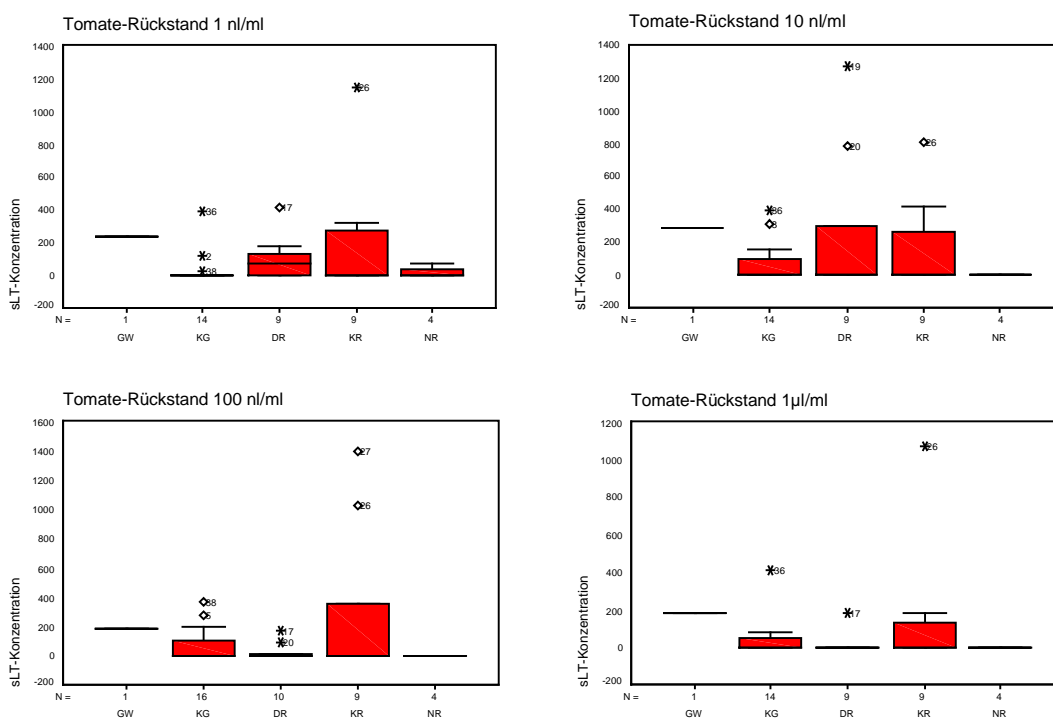


Abb. 48: Boxplotdarstellung der Ergebnisse des CAST-ELISA mit Tomate-Rückstand

## 4.12 Tomate-Destillat

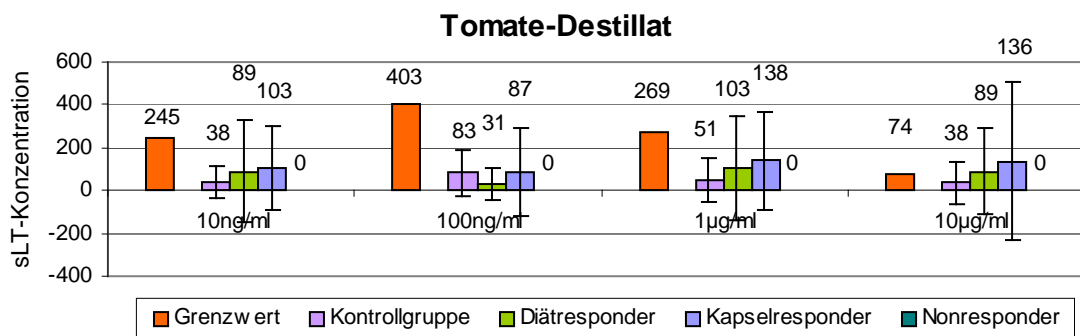


Abb. 49: Mittelwerte der Leukotrienfreisetzung nach Stimulation mit Tomate-Destillat

Nach Stimulation der Leukozyten mit Tomate-Destillat lagen in der höchsten Konzentration die Mittelwerte der Kapselrespondergruppe (136pg/ml) wie auch der Diätrespondergruppe (89pg/ml) über dem Grenzwert von 74pg/ml. Die Mediane beider Gruppen lagen bei 0. In der Kapselrespondergruppe war in dieser Konzentration lediglich ein sLT-Wert stark erhöht (1177pg/ml), alle übrigen Werte befanden sich unterhalb des Grenzwertes. In der Diätrespondergruppe waren zwei Werte über den Grenzwert erhöht (156, 646pg/ml). Die Mittelwerte und Mediane der übrigen Gruppen erreichten den Grenzwert nicht. In den geringeren Konzentrationen (10ng-1µg/ml) wurden die Grenzwerte von keinem der Mittelwerte und Mediane erreicht, es lagen jeweils 0-2 Werte oberhalb des Grenzwertes.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen fanden sich nicht.

Bei der Auswertung der einzelnen Testergebnisse zeigten in der Diätrespondergruppe zwei Probanden ein positives Ergebnis (n=10). In der Kapselrespondergruppe wies ein Proband (n=9) ein positives Testergebnis auf, in der Kontrollgruppe und der Nonrespondergruppe waren alle Ergebnisse negativ.

Damit ließ sich in keiner Probandengruppe eine erhöhte sLT-Freisetzung der Leukozyten nach Stimulation mit Tomate-Destillat zeigen.

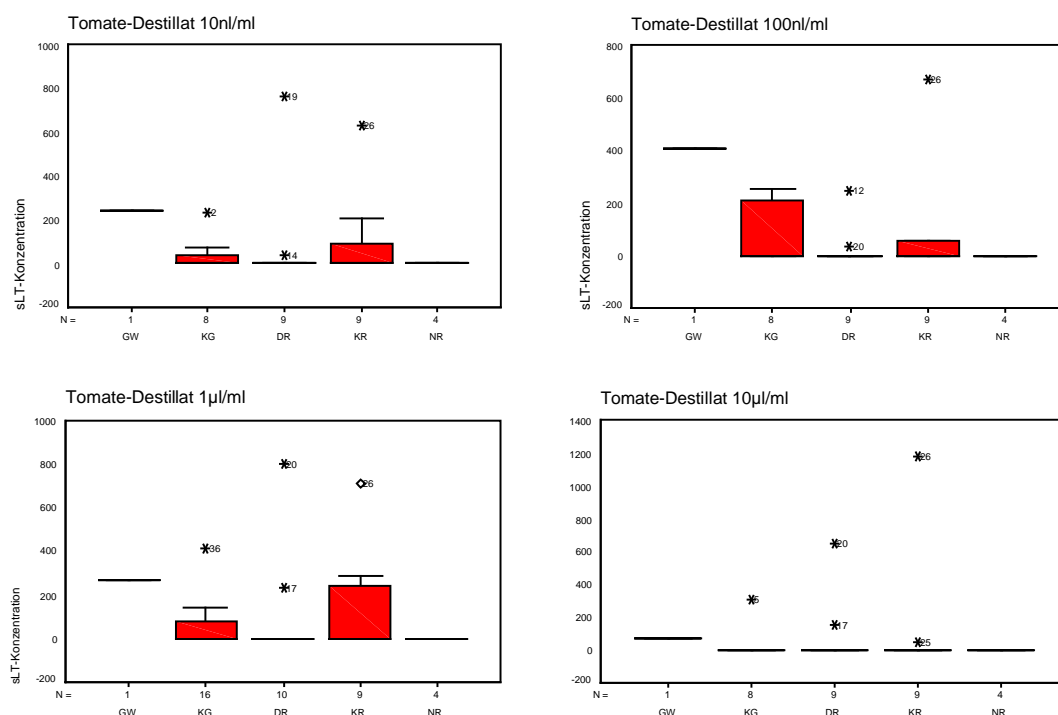


Abb. 50: Boxplotdarstellung der Ergebnisse des CAST-ELISA mit Tomate-Destillat

## 5 Zusammenfassung

Bei der basalen Sulfidoleukotrienfreisetzung waren die Mittelwerte und Mediane der Kapselrespondergruppe und der Diätrespondergruppe mit 454pg/ml (DR) und 467pg/ml (KR) etwa gleich hoch. Auch bei Betrachtung der Mediane ergab sich eine ähnlich hohe Leukotrienfreisetzung (461pg/ml DR, 412pg/ml KR). Die Mittelwerte und Mediane der Kontrollgruppe und der Nonrespondergruppe lagen weit niedriger. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben sich bei der basa-



len Stimulation nicht. Aus der Literatur geht hervor, dass in den meisten Fällen bei Nicht-Atopikern die Leukotrienfreisetzung unter 200pg/ml bleibt [37].

Für die Stimulationskontrolle wiesen Kontrollgruppe, Diätrespondergruppe und Non-respondergruppe etwa gleich hohe Werte auf, die Mediane und Mittelwerte bewegten sich zwischen 2300 und 2800pg/ml. Die Leukotrienfreisetzung der Kapselrespondergruppe lag deutlich höher (Mittelwert 5729pg/ml, Median 2826pg/ml), im Vergleich zur Kontrollgruppe mit statistischer Signifikanz.

Für die Substanzen beziehungsweise Substanzmischungen Farbstoff-Mischung 1 und 2, Metabisulfit, Salicylat, die Kapsel-Provokationsstoffe und Tomate-Destillat ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen. Auch die Grenzwerte wurden nicht überschritten. In keiner der Gruppen fand sich für eine dieser Substanzen eine höhere Anzahl positiver Testergebnisse.

Für Tartrazin ergab sich eine höhere Leukotrienfreisetzung der Kapselrespondergruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen, die statistisch nicht signifikant war. Die Grenzwerte wurden in zwei Konzentrationen von den Mittelwerten überschritten. Vier von neun Testergebnissen der Kapselrespondergruppe waren positiv, in den übrigen Gruppen jeweils ein Ergebnis. Damit ergab sich eine deutliche Tendenz einer höheren Leukotrienfreisetzung der Kapselrespondergruppe, die jedoch nicht ausgeprägt genug war, um eine durchgängig höhere Reaktivität dieser Probanden auf Tartrazin zu belegen. Die Sensitivität war mit 44,4% eher gering, die Spezifität mit 90% deutlich höher.

Nach Stimulation mit Benzoat und Nitrit wurden in allen Konzentrationen die Grenzwerte von den Mittelwerten der Kapselrespondergruppe überschritten. Die Unterschiede zu den anderen Gruppen waren bei einigen Konzentrationen statistisch mit  $p < 0,05$  relevant. Bei der Auswertung der einzelnen Testergebnisse wiesen vier (Benzoat) beziehungsweise fünf (Nitrit) der neun Probanden ein positives Ergebnis auf; in den anderen Gruppen fielen 0-2 der Testergebnisse positiv aus. Die Sensitivität lag mit 44,4% (Benzoat) und 55,5% (Nitrit) dennoch relativ niedrig, die Spezifität war mit 93,3% (Benzoat) und 86,6% (Nitrit) höher. Nach Stimulation mit diesen Substanzen kam es insgesamt zu einer erhöhten Leukotrienfreisetzung der Probanden der Kapselrespondergruppe.

Auch bei Tomate-Rückstand wies die Kapselrespondergruppe eine in Relation etwas höhere Leukotrienfreisetzung auf, ohne dass die Grenzwerte durchgängig überschritten wurden. Die Anzahl der einzelnen Testergebnisse lag mit drei von neun Probanden gering über denen der anderen Gruppen.

Tab. 2: positive Testergebnisse für die einzelnen Substanzen

	Kontrollgruppe	Diätrespondergruppe	Kapselrespondergruppe	Nonrespondergruppe
Farbstoffmischungen I+II	2/16	1/10	3/9	1/4
Tartrazin	1/16	1/10	4/9	1/4
Benzoat	2/16	0/10	4/9	0/4
Nitrit	2/16	2/10	5/9	0/4
Metabisulfit	2/16	0/10	1/9	0/4
Salicylat	0/16	1/10	2/9	0/4
Kapsel-Provokationsstoffe	0/16	0/10	2/9	0/4

Tomate-Rückstand	1/16	2/10	3/9	0/4
Tomate-Destillat	0/16	2/10	1/9	0/4

## 6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich bei Patienten mit atopischer Dermatitis mit im oralen Provokationstest nachgewiesener pseudoallergischer Reaktion auf Nahrungsmittelzusatzstoffe eine erhöhte Sulfidoleukotrienfreisetzung der basophilen Granulozyten nach Stimulation mit diesen Substanzen zeigen lässt.

Bei der pseudoallergischen Reaktion wie auch bei der atopischen Dermatitis sind die Leukotriene in den letzten Jahren zunehmend in das Interesse der Forschung gerückt. Beide Erkrankungen gehen mit einer Aktivierung der basophilen Granulozyten einher.

Mittels des CAST-ELISA wurden Additiva wie Farbstoffe, Benzoat, Nitrit, Metabisulfit und Salicylat, die in der Literatur als Auslöser pseudoallergischer Reaktionen beschrieben worden sind, untersucht. Um eventuelle Summationseffekte untersuchen zu können und Reaktionen auf die in Tomaten enthaltenen Proteine, Histamin und Salicylat von pseudoallergischen Reaktionen auf die flüchtigen Aromastoffe differenzieren zu können, wurden außerdem drei selbsthergestellte Substanzen getestet.

Es wurden vier Gruppen von Probanden unterschieden. Die Probanden der Diät-respondergruppe hatten auf eine pseudoallergenarme Kost mit einer Verbesserung des Hautzustandes reagiert mit erneuter Ekzemverschlechterung in der anschließenden Provokation mit pseudoallergenreicher Kost. Die Probanden der Kapselrespondergruppe hatten auch auf eine placebo-kontrollierte, doppelblinde Provokation mit Zusatzstoffen in Kapselform positiv reagiert. In der Nonrespondergruppe waren die Patienten, die auf die Diät nicht angesprochen hatten, zusammengefasst. Die vierte Gruppe setzte sich aus gesunden Probanden (Kontrollgruppe) zusammen.

Für die Diätrespondergruppe und Kapselrespondergruppe zeigten sich in dieser Arbeit deutlich erhöhte Leerwerte nach Stimulation lediglich mit IL-3; wenn auch ohne statistische Signifikanz. IL-3 führt zu einem ‚Priming‘ der Leukozyten mit erhöhter Leukotrienfreisetzung nach Stimulation beispielsweise mit inkompletten Basophilenagonisten wie dem Komplementprotein C5a, induziert jedoch selbst keine Leukotrienfreisetzung. Eine erhöhte basale Leukotrienproduktion im CAST-ELISA ist für die AD in der Literatur beschrieben worden [13,37]. Diese Beobachtungen decken sich mit der bei AD, besonders im akuten Schub, erhöhten Leukotrienausscheidung, die ein Maß für die Leukotriensynthese im Organismus darstellt [83,67].

Aus der Literatur ist bekannt, dass bei Patienten mit AD die basophilen Granulozyten aktiviert sind mit einer erhöhten spontanen LTC<sub>4</sub>-Freisetzung und nach Stimulation mit anti-IgE und anderen Stimuli, besonders bei schwerer atopischer Dermatitis [60,73].

Aus den höheren Leerwerten bei der AD ergibt sich andererseits ein Problem bei der Bewertung der Testergebnisse. De Weck hatte bereits 1997 darauf hingewiesen, dass die CAST-Resultate bei sehr hohen Leerwerten nur eingeschränkt zu verwerten sind [37]. Auch in dieser Arbeit wiesen einige Probanden eine sehr hohe Sulfidoleukotrienfreisetzung nach Stimulation mit den Additiva auf; aufgrund des ebenfalls stark erhöhten Leerwertes ergab sich insgesamt jedoch eine mäßige Höhe der Leukotrienfreisetzung.

Die Leukotrienfreisetzung der Nonrespondergruppe lag eher niedrig mit einem geringeren Mittelwert und Median als die Kontrollgruppe. Dies scheint auf den ersten Blick nicht zu der Aktivierung der Basophilen und den Daten aus der Literatur zu passen. Bischoff führte allerdings 1996 eine Untersuchung durch, in der er bei atopischen Patienten (Asthma, AD) eine reduzierte Fähigkeit zur Mediatorfreisetzung nach Stimulation mit anti-IgE-Antikörpern beziehungsweise anti-IgE-Rezeptorantikörpern fand [27]. Hier könnte eine ‚Erschöpfung‘ der Freisetzungsfähigkeit bei chronischer Entzündung zugrunde liegen oder aber eine Form der Erkrankung, in der die Aktivierung der Basophilen eine weniger große Rolle spielt. Möglicherweise besteht auch ein Zusammenhang mit dem Nicht-Ansprechen auf die Diät. Berücksichtigt werden muss jedoch auch die in dieser Studie mit vier Patienten sehr kleine Probandenzahl der Nonrespondergruppe, die sicherlich keine allgemeingültigen Schlüsse zulässt.

Die Stimulationskontrolle wurde mit einem anti-IgE-Rezeptorantikörper durchgeführt und dient zur Kontrolle der Stimulierbarkeit der Leukozyten. Im Gegensatz zu anti-IgE-Antikörpern (auf den etwa 15% der Patienten im CAST-ELISA nicht reagieren [6]), ist der verwendete Antikörper nicht von der Beladung der Basophilen mit IgE abhängig, sondern ein Maß für die auf den Basophilen exprimierten IgE-Rezeptoren. Interessanterweise zeigten die Probanden der Kapselrespondergruppe nach Stimulation mit dem anti-IgE-Rezeptorantikörper eine deutlich höhere Sulfidoleukotrienfreisetzung auch als die Probanden der Diätrespondergruppe. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die höhere Leukotrienfreisetzung statistisch signifikant. Auch für die Stimulationskontrolle ist bei der AD eine höhere sLT-Freisetzung, besonders im akuten Schub, beschrieben worden [37,73].

Zur Erklärung dessen sind mehrere Ansätze möglich. Denkbar wäre das vermehrte Vorliegen IgE-vermittelter Sensibilisierungen, das eine erhöhte Anzahl von Fcε-Rezeptoren erklärt. Eine weitere Möglichkeit wäre der höhere Aktivierungsgrad der Basophilen als bei der Diätrespondergruppe und Nonrespondergruppe bei gleichzeitigem Auftreten von AD und Pseudoallergie. Hier spielen möglicherweise auch Summationseffekte eine Rolle. Deutlich wird aber, dass bei Vorliegen einer zusätzlichen Intoleranz gegenüber Nahrungsmittelzusatzstoffen der Aktivierungsgrad der Basophilen beziehungsweise das Ansprechen auf anti-IgE-Rezeptorantikörper höher ist.

Auch für die Additiva Tartrazin, Benzoat und Nitrit ergab sich für die Kapselrespondergruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen eine deutlich höhere Sulfidoleukotrienfreisetzung. Bei Tartrazin wurden in zwei Konzentrationen die Grenzwerte von den Mittelwerten überschritten, während bei Benzoat und Nitrit die Grenzwerte in allen Konzentration überschritten wurden. Auch bei der Betrachtung der Testergebnisse der einzelnen Probanden wies die Kapselrespondergruppe mit vier (Tartrazin und Benzoat) beziehungsweise fünf (Nitrit) von neun deutlich mehr positive Resultate als die übrigen Gruppen auf. Dennoch ist die Sensitivität mit 44,4% (Tartrazin, Benzoat) beziehungsweise 55,5% (Nitrit) eher gering. Die Spezifität ist mit 86,6% (Nitrit), 90% (Tartrazin) und 93,3% (Benzoat) deutlich höher.

Tartrazin, Benzoat und Nitrit sind in der Literatur häufig als Auslöser für Intoleranzreaktionen beschrieben worden [100,55,102,111]. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Subgruppe von Patienten mit AD auf diese Substanzen reagiert, und sich dieses auch in-vitro mit einer erhöhten Sulfidoleukotrienfreisetzung zeigen lässt. Die Ergebnisse sprechen außerdem dafür, dass auch die basophilen Granulozyten bei der Intoleranzreaktion beteiligt sind.

Auch Czech hatte, bei Patienten mit chronischer Urtikaria, einige Additiva mittels des CAST-ELISA getestet und eine erhöhte Sulfidoleukotrienfreisetzung nach Stimulation mit Benzoat gefunden. Dabei zeigte sich lediglich bei Patienten mit symptomatischer

Urtikaria, nicht aber bei asymptomatischen Patienten eine gesteigerte sLT-Freisetzung. Analog dazu war bei Pollenallergikern eine wesentlich höhere (IgE-vermittelte) Sulfidoleukotrienfreisetzung in der Pollensaison gefunden worden. Auch die Höhe der Leukotrienausscheidung im Urin korreliert mit der Schwere der Symptomatik. Insgesamt scheint die Ausprägung der Symptomatik von großer Bedeutung für den Aktivierungsgrad der Basophilen zu sein und damit auch für die Höhe der Leukotrienfreisetzung im CAST-ELISA. Die Schweregrad der Symptomatik ist in dieser Arbeit allerdings nicht mit einbezogen worden und wäre ein interessanter Ansatz für weitere Forschungsarbeiten.

Eine eher hohe Spezifität als Sensitivität des CAST-ELISA ist in der Literatur beschrieben worden [37,96,91].

Bei der Untersuchung von den zwei Farbstoff-Mischungen, Metabisulfit und Salicylat ergab sich für keine der Gruppen eine erhöhte Sulfidoleukotrienfreisetzung. Auch in der Arbeit von Czech hatte sich nach Stimulation mit Metabisulfit keine erhöhte sLT-Freisetzung gezeigt. In der Literatur sind Farbstoffe, Sulfite und Salicylat als Auslöser von Intoleranzreaktionen beschrieben worden [100,102,55]. *In vitro* scheinen sie weniger häufig in der Lage, eine Leukotrienfreisetzung aus Basophilen auszulösen. Hier ist fraglich, ob die geringe Probandenzahl der Studie eine Rolle spielt oder eine tatsächlich verminderte Reaktivität *in vitro* auf diese Stoffe.

Auch bei der Testung der Kapsel-Provokationsstoffe, Tomate-Rückstand und Destillat war für keine der Gruppen eine erhöhte Sulfidoleukotrienfreisetzung nachweisbar. Zuberbier hatte die flüchtigen Aromastoffe der Tomate 2002 als Auslöser für pseudoallergische Reaktionen bei der chronischen Urtikaria identifiziert [116]. Dabei zeigte sich neben der positiven oralen Provokationsstestung eine erhöhte Histaminfreisetzung aus Mastzellen; die Leukotriensynthese der basophilen Granulozyten wurde nicht untersucht. Insgesamt ergaben sich für die Diätrespondergruppe (20%) und Kapselrespondergruppe (33%) für Tomate-Rückstand und Tomate-Destillat deutlich mehr positive Ergebnisse als in der Kontrollgruppe (6,25%). In der Kontrollgruppe fand sich für Tomate-Destillat kein positives Testergebnis. Die positiven Ergebnisse bei Tomate-Rückstand können auch auf IgE-vermittelte Sensibilisierungen zurückzuführen sein. Interessanterweise war bei keinem der Probanden eine positive Reaktion auf das Destillat alleine zu beobachten; bei allen Probanden, die eine Reaktion auf Destillat zeigten, war auch das Testergebnis für Tomate-Rückstand positiv. Zwei der Probanden wiesen eine positive Reaktion nach Stimulation mit Tomate-Rückstand auf, während das Ergebnis für Tomate-Destillat negativ blieb. Keiner der positiv getesteten Probanden zeigte eine Reaktion auf das auch in Tomaten enthaltene Salicylat. Insgesamt erscheint fraglich, ob pseudoallergische Reaktionen auf die Aromastoffe der Tomate bei der AD eine große Rolle spielen.

Bei der Testung der Kapsel-Provokationsstoffe stand die Untersuchung von Summationseffekten im Vordergrund. Diese konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden; *in vitro* mit isolierten Leukozyten scheinen Summationseffekte keine große Rolle zu spielen. *In vivo* erscheinen als wahrscheinlich. Dies legt nahe, dass Summationseffekte nicht direkt auf die Leukozyten wirken, sondern ein komplexeres Geschehen mit Beteiligung anderer Faktoren des Immunsystems zugrunde liegt. Die Konzentration der einzelnen Stoffe war mit einer höchsten Konzentration von 5ng/ml sehr gering. Bei den anderen Additiva lag die höchste Konzentration bei 200µg/ml. In den Vorversuchen hatten sich dennoch bei höheren Konzentrationen eher toxische Effekte gezeigt. In der gesamten Studie wiesen lediglich zwei der Probanden ein positives Testresultat nach Stimulation mit dieser Substanzmischung auf; beide waren der Kapselrespondergruppe zugeordnet.

Insgesamt ließ sich für die Kapselrespondergruppe eine deutlich höhere Sulfidoleukotrienfreisetzung für die Stimulationskontrolle und nach Stimulation mit Tartrazin, Benzoat und Nitrit zeigen. Bei der basalen Leukotrienfreisetzung zeigten Kapselrespondergruppe wie auch die Diätrespondergruppe eine höhere sLT-Freisetzung.

Diese Ergebnisse sind zwar zum Teil statistisch signifikant; besonders Sensitivität und der negative prädiktive Wert sind jedoch gering. Ähnlich wie in der Arbeit von Brunner et al. [28] fand sich eine statistisch relevante Erhöhung der Sulfidoleukotrienfreisetzung der Kapselrespondergruppe als Gruppe betrachtet, ohne dass genügend individuelle oder prädiktive Aussagen möglich werden.

Die Patientenzahl der Studie ist relativ gering, insbesondere die Nonrespondergruppe mit vier Probanden, so dass sich repräsentative Ergebnisse sicher nicht ableiten lassen.

Dennoch reagieren insgesamt 7/9 Patienten der Kapselrespondergruppe positiv auf mindestens einen der Zusatzstoffe. Dies weist darauf hin, dass bei einer Subgruppe von Patienten mit AD Nahrungsmitteladditiva einen aggravierenden Faktor darstellen. Die Ergebnisse zeigten auch eine Additiva-induzierte Leukotrienfreisetzung aus basophilen Granulozyten für diese Gruppe von Patienten. Für pseudoallergische Reaktionen konnte dieses bisher lediglich für ASS nachgewiesen werden.

Eine weitere implizite Fragestellung dieser Arbeit war, ob der CAST-ELISA ein in-vitro-Verfahren zur Diagnostik von pseudoallergischen Reaktionen auf Nahrungsmitteladditiva bei der AD darstellen könnte, mithilfe dessen zuverlässige Aussagen über den möglichen Erfolg einer pseudoallergenarmen Diät gemacht werden könnten und langwierige Auslass- und Diätversuche sowie riskante Provokationstestungen vermieden werden könnten. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit hat sich der CAST-ELISA vor allem aufgrund der niedrigen Sensitivität und des geringen positiven prädiktiven Wertes als nicht geeignet erwiesen und scheint kein zuverlässiges Instrument zur Diagnosestellung zu sein. Dies weist noch einmal auf die Bedeutung von Provokationstestungen hin, die auch in der Literatur immer wieder betont wird [68,93]. Besonders gilt dies für Substanzen wie Farbstoffe, Metabisulfit und Salicylat, die als häufige Auslöser pseudoallergischer Reaktionen beschrieben werden, für die sich in dieser Arbeit aber keine erhöhte Sulfidoleukotrienfreisetzung zeigen ließ.

Grundsätzlich ist die Pathophysiologie der pseudoallergischen Reaktion nach wie vor ungeklärt. Gefunden wurden aktivierte Basophile, die nach Priming und Stimulation mit inkompletten Basophilenagonisten mit einer vermehrten Sulfidoleukotrienfreisetzung reagieren [37,104]. Auch bei der AD wurden aktivierte Basophile gefunden, die spontan und nach Stimulation mit anti-IgE vermehrt Leukotriene freisetzen [73].

Aktivierte Basophile produzieren vermehrt IL-4 und wenig IFN $\gamma$ ; ein Zytokinprofil, das dem Zytokinprofil der besonders in der akuten Phase der AD involvierten TH2-Zellen ähnelt [4]. IL-4 regt die B-Lymphozyten zur vermehrten Produktion zu IgE an und führt indirekt auch zu Veränderungen in der Haut. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass es bei genetisch veränderten Mäusen mit vermehrter IL-4-Produktion in der Haut zur Entwicklung inflammatorischer, juckender Hautläsionen ähnlich denen der AD kommt. Bei Mäusen mit ausgeschaltetem IL-4 ist eine reduzierte Zahl von Eosinophilen in der Haut zu finden [70].

IL-4 fördert außerdem das Wachstum von Mastzellen und stimuliert, zusammen mit G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) die Differenzierung von Basophilen aus den Vorläuferzellen des Knochenmarks. Für TH2-Zellen ist IL-4 ein Wachstumsfaktor, TH1-Zellen werden eher gehemmt. Hier besteht möglicherweise ein Zusam-

menhang mit dem bei der AD in der akuten Phase gefundenen TH2-dominierten Zellinfiltrat.

Die Produktion von IL-4 könnte einer der Gründe für die Ekzemverschlechterung nach pseudoallergenreicher Kost sein mit der Hypothese, dass die Aktivierung der Basophilen im Sinne der pseudoallergischen Reaktion über die Produktion von IL-4 ihrerseits zur Entstehung eines TH2-Zell-typischen Zytokinmilieus beitragen beziehungsweise es über eine indirekte Aktivierung von TH2-Zellen zur Exazerbation kommt.

Hinzu kommt, dass IL-4 auch Chemokine wie RANTES und MCP1 induziert, die ihrerseits Triggerfaktoren für die Degranulation von Basophilen sind. Hier würde der Prozess im Sinne eines Circulus vitiosus unterhalten.

Denkbar ist auch, dass die IL-4-Produktion durch die Eigenschaft als ‚Switch-Faktor‘ zu einer vermehrten IgE-Produktion führt mit verstärkter IgE-vermittelter Reaktion auf Allergene und Amplifizierung der Typ I-Reaktion mit Ekzemverschlechterung, wie sie im Rahmen des Atopie-Patch-Testes gezeigt werden konnte [80].

Eine weiter ungeklärte Frage ist auch, ob es auf den Zellen selbst eine gesonderte Bindungsstelle für Pseudoallergene gibt, durch deren Besetzung zelluläre Mechanismen in Gang gesetzt werden, die zur pseudoallergischen Reaktion führen. Alternativ ist vorstellbar, dass additive Effekte wirksam werden und es sich um eine Summation verschiedener Faktoren in einem insgesamt komplexen Geschehen handelt. Dafür würde das häufige Auftreten pseudoallergischer Reaktion bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie chronische Urtikaria, Asthma bronchiale, allergische Rhinokonjunktivitis und der atopischen Dermatitis sprechen, die mit einer Aktivierung und partiellen Dysfunktion wichtiger Effektoren des Immunsystems einhergehen.

Insgesamt liegt ein multifaktorielles Geschehen vor, in dem sich verschiedene Effekte summieren und überlagern und dessen einzelne Komponenten noch nicht ausreichend verstanden und erforscht sind.

Auch die unterschiedlich hohe Sulfidoleukotrienfreisetzung innerhalb der Kapsel-respondergruppe weist darauf hin, dass die Reaktivität der Basophilen noch von vielen anderen Faktoren abhängig ist, die offenbar schon in vivo wirksam werden und bei einer Isolation der Leukozyten ex vivo nicht erfasst werden können.

Einer dieser Einflussfaktoren scheint die Aktivierung des Komplementsystems sein, die Szebeni als einer der pathogenetisch relevanten Faktoren bei der PAR vermutet [97,98].

Das Komplementprotein C3a beispielsweise induziert eine Stimulation der Basophilen zur de-novo-Synthese von Leukotrienen, Faktor C5a stimuliert eher die Freisetzung von Leukotrienen. Beide Faktoren sind inkomplette Basophilenagonisten, das heißt, sie benötigen die Vorinkubation oder Priming mit IL-3 oder IL-5. IgE, einige Medikamente (Compound 48/80, Calcium-Ionophor, Mellitin), aber auch Zytokine wie das MCP1 können direkt eine Mediatorfreisetzung induzieren, während andere Substanzen wie MIP $\alpha$  (Monocyte inflammatory peptid) und RANTES ebenso wie C5a inkomplette Agonisten sind [4].

Bei der Untersuchung der Sulfidoleukotrienfreisetzung nach Stimulation mit ASS kamen verschiedene Autoren zu unterschiedliche Ergebnissen. Ein Teil der Autoren konnte eine erhöhte Sulfidoleukotrienfreisetzung nach Stimulation mit ASS nachweisen [58,109,77], andere Autoren fanden lediglich eine statistisch höhere Sulfidoleukotrienfreisetzung, ohne dass individuelle Vorraussagen möglich wurden [28,57]. In weiteren Arbeiten hatte die Inkubation mit ASS keinen Einfluss, es wurde lediglich

eine höhere Sulfidoleukotrienfreisetzung bei Pseudoallergikern nach Stimulation der Basophilen mit C5a beschrieben [34,104]. Auch dies weist darauf hin, dass, nach Ausschluss anderer Erklärungsmöglichkeiten wie die Art des verwendeten ASS oder die Ausprägung der Symptomatik, noch weitere Einflussfaktoren beteiligt sind.

Letztendlich stellen Sulfidoleukotriene das Endglied der allergischen oder pseudoallergischen Reaktion dar; mit vorangehenden oder anschließenden Veränderungen des Immunsystems in vivo, die durch das in-vitro Verfahren mit Isolation der Leukozyten nicht bei allen Probanden erfasst werden kann. Welcher Art diese Veränderungen sind, ist bisher für die pseudoallergische Reaktion noch nicht ausreichend geklärt und bedarf weiterer Forschung.

Neben der Aktivierung von Basophilen und abberrierender T-Zellfunktion spielt möglicherweise auch die Aktivierung von Mastzellen eine Rolle. Für die chronische Urtikaria konnte gezeigt werden, dass Additiva eine direkte und nicht IgE-vermittelte Mediatorfreisetzung (Histamin, Tryptase und anderer proinflammatorischer Mediatoren) aus Mastzellen induzieren können [78]. Eine weitere Quelle von Sulfidoleukotrienen sind neben Mastzellen auch eosinophile Granulozyten und Monozyten oder neutrophile Granulozyten (LTB<sub>4</sub>), die mit dieser Testform nicht oder nur unzureichend erfasst werden können.

Neben den möglichen Einflussfaktoren in vivo und der Ausprägung der Symptomatik zum Untersuchungszeitpunkt sind vermutlich noch weitere praktische Faktoren von Bedeutung. Ein Teil der Patienten hat möglicherweise die pseudoallergenarme Kost weitergeführt, während andere dies nicht getan haben. Es ist davon auszugehen, dass sie ‚Pseudoallergen-Karenz‘ beziehungsweise Pseudoallergen-Exposition zu einer veränderten Reaktivität führt, ähnlich den Vorgängen bei der IgE-vermittelten Allergie.

Ungeklärt ist auch, ob an der Entstehung der PAR nicht mehrere, verschiedene Mechanismen beteiligt sind und sich möglicherweise unterschiedliche immunologische Geschehen hinter dem Begriff der Pseudoallergie verbergen. Die Pseudoallergie umfasst verschiedenste Reaktionen wie die anaphylaktoide Sofortreaktion als auch beispielsweise das langsamere Auftreten von Hautreaktionen bei chronischer Urtikaria oder der AD. Dabei liegt den Sofort-Reaktionen eine direkte Mastzell- oder Basophilendegranulation zugrunde, deren unmittelbare Wirkung bei der AD offensichtlich nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Vorstellbar sind bei Auftreten der pseudoallergischen Reaktion auch weiterreichende Veränderungen. Buhner et al. wies eine erhöhte gastrointestinale Permeabilität bei Patienten mit chronischer Urtikaria und Pseudoallergien nach [29]. Dies führt zu einer im Vergleich zu Gesunden vermehrten Aufnahme von Pseudoallergenen. Die vermehrte Aufnahme, eine mögliche Kumulation und Summationseffekte können so zur Auslösung einer PAR beitragen. Auch hier wäre die Frage, ob es sich um eine Folge der Grunderkrankung oder um ein Symptom im Rahmen des pseudoallergischen Geschehen handelt.

Die gemeinsamen Aspekte der AD und der PAR hinsichtlich der Basophilen-Aktivierung spiegelt sich auch in den positiven Effekten nach Behandlung mit Leukotrien-Antagonisten wider, in der eine Verbesserung des Hautzustandes bei der AD, aber auch eine Reduktion der Symptomatik bei ASS-sensitiven Asthmatikern gefunden wurde [35]. Eine Provokation von ASS-sensitiven Patienten ist in der Literatur bisher lediglich unter Tacrolimus mit signifikanter Symptomreduktion beschrieben worden, die auf die Hemmung der Sulfidoleukotrienfreisetzung zurückgeführt wurde [64]. Es ist allerdings zu vermuten, dass Tacrolimus noch weitere Effekte auf das Immunsystem ausübt. Eine Provokation unter einem reinen Leukotrien-Antagonist ist

nicht beschrieben worden und wäre sicherlich ein interessanter Ansatz für weitere Forschung.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass einige Nahrungsmitteladditiva in vitro eine erhöhte Sulfidoleukotrienfreisetzung bei Additiva-sensitiven Patienten mit atopischer Dermatitis induzieren können. Bei einer Subgruppe von Patienten scheinen Zusatzstoffe als aggravierender Faktor relevant zu sein. Die Studie war jedoch zu klein, um repräsentative Aussagen treffen zu können. Um als in-vitro Diagnostikum als Alternative zu Provokationstestungen eingesetzt werden zu können, waren vor allem Sensitivität und der positive prädiktive Wert des CAST-ELISA zu gering.

Insgesamt ist die Anzahl der Patienten mit AD, die eine Intoleranz gegenüber Zusatzstoffen zeigen, jedoch eher gering. Additiva-Intoleranzen sollten dennoch als aggravierender Faktor in Erwägung gezogen werden.

Die schon vor Jahren gestellte Forderung einiger Autoren [111], wegen der zunehmenden Inzidenz der Intoleranzreaktionen auf Additiva, diese in Lebensmitteln nicht mehr zuzulassen, ist bisher nicht erfüllt worden. Die Zahl der Untersuchungen dazu insgesamt ist allerdings auch begrenzt. Viele der Additiva stehen seit langem, wie Tartrazin seit 30 Jahren, im Verdacht, Unverträglichkeitsreaktionen auszulösen. Es wird jedoch immer betont, dass ein endgültiger Nachweis der Schädlichkeit bisher nicht erbracht werden konnte. Hier schließt sich der Kreis mit der Notwendigkeit eines praktikablen und zuverlässigen in-vitro-Verfahrens, zu dessen Entwicklung jedoch die Pathophysiologie der pseudoallergischen Reaktion genauer verstanden werden müsste.



## Literaturverzeichnis

- 2 Braun-Falco, O. G., Plewig, Wolff H.H. : Atopie und atopisches Ekzem. Dermatologie und Venerologie. 4. Heidelberg, Springer, 1996 S.445-461, 3-540-12025-8.
- 3 Fuchs, E.: Nahrungsmittel und Zusatzstoffe, Allergische und PAR auf Lebensmittel. Allergie-was tun. 1 München, Serie Piper Gesundheit, 1992 S.50-54,192-195, 3-492-10711-7.
- 4 Gemsa D., Vorlaender K.O., Albert E.: Zytokine; Atopische Dermatitis. Immunologie. 3. Stuttgart, New York, Thieme, 1991 S.45-63,517-519, 3-13-737601-7.
- 5 Jung Ernst G.(Hrsg), Boonen H.: Formenkreis der Atopien. Dermatologie. 2. Stuttgart, MLP Duale Reihe, 1991 S.360-369, 3-13-126685-6.
- 6 Kreft D.,Bauer R.,Goerlich R.: Pseudo-allergische Reaktionen. Nahrungsmittelallergene. 1. Berlin, de Gruyter, 1995 S.39-42, 3-11-014805-6.
- 7 Mach, K.: Endogenes Ekzem. Dermatologie. 1. Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag, 1995 S.84-87, 3-432-26141-1.
- 8 Pichler H-H., Peter WJ.: Atopische Dermatitis. Klinische Immunologie. 2 München, Urban und Schwarzenberg, 1996 S.712-717, 3-541-14892-6.
- 9 Pichler H-H., Peter WJ. : Medikamentenallergie. Klinische Immunologie. 2. München, Urban und Schwarzenberg, 1996 S.718-724, 3-541-14892-6.
- 10 Pichler H-H., Peter WJ. : Pathophysiologie der allergischen Entzündung. Klinische Immunologie. 2. München, Urban und Schwarzenberg, 1996 S.55-74, 3-541-14892-6.
- 11 Rassner, G.: Allergische und nicht-allergische Überempfindlichkeitsreaktionen der Kutis. Dermatologie, Lehrbuch und Atlas. 7. München, Urban und Fischer, 2002 S.121-143, 3-437-42761-X.
- 12 Ring J.: Pseudoallergische Arzneimittelreaktionen. Angewandte Allergologie. 2. München, Medizin Verlag GmbH München, 1988 S.223-232, 3-8208-1097-8.
- 13 Czech, W.: Erarbeitung von Verfahren zur in-vitro-Diagnostik bei pseudoallergischen Reaktionen auf Nahrungsmitteladditiva. Zwischenbericht für das Staatskolloquium des PUG 1997. Kernforschungszentrum Karlsruhe, 1997 S.387-394,
- 14 Deutzmann, Uni Regensburg: Eicosanoide: Prostaglandine und Leukotriene. Hrsg.: Uni Regensburg, Institut für Biochemie, Mikrobiologie und Genetik: Hormone. [http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/nat\\_Fak\\_III/Biochemie/Deutzmann/Hormon\\_SS05/Hormon\\_Beisp/Pg\\_web.pdf](http://www.uni-regensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_III/Biochemie/Deutzmann/Hormon_SS05/Hormon_Beisp/Pg_web.pdf).
- 15 DGE-Arbeitskreis "Diätetik in der Allergologie": Begriffsbestimmung und Abgrenzung von Lebensmittel-Unverträglichkeiten . Hrsg.: Deutsche Gesellschaft für Ernährung : DGE-Info, Bereich Ernährung. <http://www.dge.de/modules.php?name=News&file=article&sid=408>.
- 16 Die Verbraucher Initiative e. V.: Zusatzstoffe online. Hrsg.: Die Verbraucher Initiative e.V., Eisenstr. 106, 12435 Berlin: <http://www.zusatzstoffe-online.de/>.
- 17 Hoffleith, B.: 07 Eicosanoide. Hrsg.: Ruhr-Universität Bochum: Der kleine Hoffleith. <http://www.der-kleine-hoffleith.de/pharma/Eicosanoide.pdf>.
- 18 Lagoni,Norbert Dr. : Weidenrinde-gestern und heute. Hrsg.: Landesforstanstalt Eberswalde: Silberweide. S.52-57, <http://www.genres.de/fgrdeu/silberweide/pdf/abschnitt5.pdf>.
- 19 Seilnacht,Thomas : organische Säuren- Salicylsäure. Hrsg.: T.Seilnacht, Rosenweg 7, 3007 Bern-CH: Chemikaliendatenbank. [http://www.seilnacht.com/Chemie/ch\\_salic.htm](http://www.seilnacht.com/Chemie/ch_salic.htm).
- 20 Uniprotokolle: Salicylsäure. Hrsg.: V.i.S.d.P.:Bauer, Martin,Joseph-Traxler-Weg 8, 55128 Mainz: Lexikon. <http://uni-protokolle.de/Lexikon/Salicyls%E4ure.html>.
- 21 Wedi, B., Kapp, A.: Erarbeitung von Verfahren bei pseudo-allergischen Reaktionen auf Nahrungsmittel-additiva-Teil A. Zwischenbericht für das Staatskolloquium des PUG 1997. Kernforschungszentrum Karlsruhe, 1997 S.375-385,

- 22 Angelova-Fischer I., Tsankov N.: Successful treatment of severe atopic dermatitis with cysteinyl leukotriene antagonist montelukast. *Acta Dermatoven APA*. 2005, *Vol. 14, Nr.3*, S.115-117,
- 23 Antico A., Di Bernardino L.: The role of additives in chronic pseudo-allergic dermatopathies from food intolerance. *Allerg. Immunol.* 1995, *27(5)*, S.157-160,
- 24 Arai Y., Muto H., Sano Y., Ito K.: Food and food additives hypersensitivity in adult asthmatics. Adverse reaction to sulfites in adult asthmatics. *Arerugi*. 1998, *47*, S.1163-67,
- 25 Bernardini R., Novembre E., Lombardi E.: Pseudoallergies. *Pediatr. Med. Chir.* 2001, *23*, S.9-16,
- 26 Bircher AJ., Haldimann J., Weber J.: CAST-ELISA testing for the diagnosis of immediate type reactions to betalactam antibiotics. *Allergy Clin. Immunol.Int.* 1996, *8*, S.109-110,
- 27 Bischoff SC., Zwahlen R., Stucki M., Mullner G., de Weck AL.: Basophil histamine release and leukotriene production in response to anti-IgE and anti-IgE receptor antibodies. Comparison of normal subjects and patients with urticaria, atopic dermatitis or bronchial asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1996, *110(3)*, S.261-271,
- 28 Brunner B., Eberlein-König B., Pryzbilla B.: Histamine and sLT-release from peripheral blood leukocytes (PBL) of patients with anaphylactoid reactions provoked by acetylsalicylic acid (ASA). *J. Allergy Clin. Immunol.* 1996, *97*, S.344,
- 29 Buhner S., Reese I., Kuehl F., Lochs H.: Pseudoallergic reactions in chronic urticaria are associated with altered gastroduodenal permeability. *Allergy*. 2004, *59*, S.1118-123,
- 30 Capella GL., Grigerio E., Altomare G.: A randomized trial of leukotriene receptor antagonist montelukast in moderate to severe atopic dermatitis of adults. *Aur. J. Dermatol.* 2001, *11 (3)*, S.209-213,
- 31 Chari S., Clark-Loeser L., Shupack J., Washenik K.: A role for leukotriene antagonists in atopic dermatitis?. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2001, *30 (3)*, S.407-414,
- 32 Costa R., Rilliet A., Nicolet M., Saurat JH.: Scoring atopic dermatitis: the simpler the better?. *Acta Dermatol. Venereol.* 1989, *69*, S.41-45,
- 33 Czech W., Krutmann J., Schöpf E., Kapp A.: Serum eosinophil cationic protein (ECP) is a sensitive measure for disease activity in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 1992, *126*, S.351-355,
- 34 Czech W., Schöpf E., Kapp A.: Release of sulfidoleukotrienes in vitro; its relevance in the diagnosis of pseudoallergy to acetylsalicylic acid. *Inflamm. Res.* 7/1995, *44*, S.291-295,
- 35 Dahlen SE., Malmstrom K., Nizankowska E., Kuna P.: Improvement of aspirin-intolerant asthma by montelukast, a leukotriene antagonist: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J. Respir. Crit. Care Med.* 2002, *165*, S.9-14,
- 36 Darsow U., Ring J.: Atopie-Patch-Test, Atopisches Ekzem und Allergie. *Hautarzt*. 2003, *10*, S.930-936, 0017-8470.
- 37 de Weck, AL.: Zellulärer Allergen-Stimulierungs-Test (CAST). *Allergologie*. 1997, *10(20)*, S.487-502,
- 38 de Weck, Derer, Morrison-Smith: TOP SCREEN. Ein neues Verfahren für die primäre Allergieabklärung. *Allergologie*. 1995, *18*, S.234-238,
- 39 de Weck, Stadler, Urwyler, Wehner, Bühlmann: Cellular allergen stimulation test (CAST)-A new dimension in allergy diagnostics. *Allergy Clin. Immunol. News*. 1993, *5*, S.9-14,
- 40 de Weck, Stadler, Urwyler, Wehner, Bühlmann: Sulfidoleukotrien-ELISA (SLT-ELISA) assay: a new cellular approach to the diagnosis of allergies. *Allergy*. 1992, *47 ( Suppl.)*, S.150,
- 41 Dipalma JR.: Tartrazine sensitivity. *Am. Fam. Physician*. 1990, *42*, S.1347-50, 0002-838X.
- 42 Ehlers I., Niggemann B., Binder C., Zuberbier T.: Role of nonallergic hypersensitivity reactions in children with chronic urticaria. *Allergy* . 1998, *53*, S.1011-12,
- 43 Eustachio N., Alessandro P., Margherita F., Tursi A.: Efficacy and tolerability of montelukast as a therapeutic agent for severe atopic dermatitis in adults. *Acta Derm. Venereol.* 2002, *82*, S.297-320,

- 44 Fauler J., Neumann CH., Tsikas D.: Enhanced synthesis of cysteinyl leukotrienes in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 1993, 128, S.627-630,
- 45 Ferrer M., Sanz ML., Prieto I., Oehling A.: In vitro antigen-specific sulphidoleukotriene production in patients allergic to *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin. Exp. Allergy*. 1998, 28, S.709-714,
- 46 Ferrer M., Sanz ML., Prieto I., Vila L., Oehling A.: Study of IdE-dependent sulphidoleukotriene cellular release. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 1998, 8, S.17-22,
- 47 Ferrer, Sanz, Prieto, Oehling: Antigen-specific sulphidoleukotriene production and histamine release in pollinic patients. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 1996, 6, S.271-277,
- 48 Fogh K., Herlin T., Kraballe K.: Eicosanoids in skin of patients with AD: PGE2 and LTB4 are present in biologically active concentrations. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1989, 83, S.450-455,
- 49 Fuglsang G., Madsen G., Halken S., Jorgensen S.: Adverse reactions to food additives in children with atopic symptoms. *Allergy*. 1994, 49, S.31-37,
- 50 Garcia-Marcos L., Schuster A., Perez-Yarza EG.: Benefit-risk assessment of antileukotrienes in the management of asthma. *Drug. Saf.* 2003, 26 (7), S.483-518,
- 51 Hanifin JM., Rajka G.: Diagnostic features in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl.* 1980, 92, S.44-47,
- 52 Hippler, UC.: Der zelluläre Antigenstimulationstest. *Z. Dermatol.* 1995, 181, S.17-26,
- 53 Hirschberg: Mitteilung über einen Fall von Nebenwirkung des Aspirins. *Dtsch. Med. Wochenschrift*. 1902, 23, S.416-417,
- 54 Hishinuma T., Suzuki N., Aiba S., Tagami H.: Increased urinary leukotriene E4 excretion in patients with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 2001, 144, S.19-23,
- 55 Hon KL., Leung TF., Ma KC., Li AM., Wong Y.: Urinary leukotriene E4 correlates with severity of dermatitis in children. *Clin. Exp. Dermatol.* 2004, 29, S.277-281,
- 56 Horrobin DF.: Fatty acid metabolism in health and disease: the role of delta-6-desaturase. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993, 57 (Suppl. 5), S.732-736,
- 57 Hortas ML., Castilla JA., Fernandez HA.: Determinacion de mediators lipidicos (sLT) en la alergia en medicamentos. *Asociacion Biopatologica Medica*. 1995,
- 58 Höxtermann, Auer, Altemeyer: Zelluläre in vitro Diagnostik pseudoallergischer Reaktionen auf Azetylsalizylsäure mittels CAST-ELISA. *Allergologie*. 1997,
- 59 Höxtermann, Auer, Altemeyer: Zellulärer Antigen-Stimulationstest und Basophiler Degranulationstest in der in vitro Diagnostik der Wespengift-Allergie. *Z. Dermatol.* 1995, 181, S.211,
- 60 James JM., Kagey-Sobotka A., Sampson HA.: Patients with severe atopic dermatitis have activated basophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1993, 91(6), S.1155-62,
- 61 Kanny G., Hatahet R., Moneret-Vautrin DA., Kohler C., Bellut A.: Allergy and intolerance to flavouring agents in atopic dermatitis in young children. *Allerg. Immunol.* 1994, 26, S.204-206,
- 62 Kapp A.: The role of eosinophilic granulocytes for the pathogenesis of atopic dermatitis/ neurodermitis. Eosinophilic products as markers of disease activity. *Hautarzt*. 1993, 44, S.432-436,
- 63 Kapp A., Czech W., Krutmann J., Schöpf E.: Eosinophil cationic protein in sera of patients with atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1991, 24, S.555-558, 0190-9622.
- 64 Kawano T., Matsuse H., Kondo Y., Machida I.: Tacrolimus reduces urinary excretion of LTE4 and inhibits aspirin induced asthma to a threshold dose of aspirin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004, 114 (6), S.1278-81,
- 65 Koro O., Furutani K., Hide M., Aydama S.: Chemical mediators in atopic dermatitis: involvement of LTB4 by a type I allergic reaction in the pathogenesis of AD. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999, 104 (4), S.663-670,

- 66 Kowalski M.L., Pawliczak R., Wozniak J., Siuda K., Poniatowska M.: Differential Metabolism of Arachidonic Acid in Nasal Polyp Epithelial Cells Cultured from Aspirin-sensitive and Aspirin-tolerant Patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*. 2000, 2, S.391-398,
- 67 Kroegel C., König W., Jäger L.: Erweiterte Therapie des Asthma bronchiale: Anwendung von 5-Lipoxygenase-Inhibitoren und Leukotrien-Rezeptorantagonisten. *Deutsches Ärzteblatt*. 1997, 26, S.A1802-1805, 0172-2107.
- 68 Kurek M.: Pseudoallergic reactions. Intolerance to natural and synthetic food constituents masquerading as food allergy. *Pediatr. Pol.*. 1996, 71, S.743-752,
- 69 Lebel B., Messaad D., Kwedariene V.: Cysteinyl-leukotriene release test (CAST) in the diagnosis of immediate drug reactions. *Allergy*. 2001, 56, S.688-692,
- 70 Leung D., Boguniewicz M., Howell M., Nomura I. : New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.*. 2004, 113, S.651-657,
- 71 Maly FE., Marti-Wyss S., Blumer S. Wütherich B.: Mononuclear blood cell sulfidoleukotriene generation in the presence of IL-3 and whole blood histamine release in honey bee and yellow jacket venom allergy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*. 1997, 7, S.217-224,
- 72 Maly, Marti-Wyss, Blumer, Wütherich: Interleukin-3 facilitated blood mononuclear cell sulfidoleukotriene generation and whole blood histamine release in honey bee and yellow jacket venom allergy. *Allergy Clin. Immunol. Intern.*. 1996, 8, S.111-125,
- 73 Marone G., Giugliano R., Lembo G., Ayala F.: Human basophil releasability. II. Changes in basophil releasability in patients with atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.*. 1986, 87(1), S.19-23,
- 74 Medrala, Matolepszy, Wolanczyk-Medrala, Gietkiewicz, Litwa: CAST-ELISA test in diagnosis of mite allergy. *J. Invest. Allergy Clin. Immunol.*. 1997, 7, S.36-39,
- 75 Medrala, Matolepszy, Wolanczyk-Medrala, Liebhart: CAST-ELISA Test-A new diagnostic tool in pollen allergy. *J. Invest. Allergy Clin. Immunol.*. 1997, 7, S.32-35,
- 76 Medrala, Wolaczky-Medrala, Matolepszy, Litwa: Comparative study between skin prick test and TOP-CAST allergen leukocytes stimulation in diagnosis of allergic status. *J. Invest. Allergy Clin. Immunology*. 1997, 7, S.115-118,
- 77 Mewes T., Riechelmann H., Klimek L.: Increased in vitro cysteinyl leukotriene release from blood leukocytes in patients with asthma, nasal polyps, and aspirin intolerance. *Allergy*. 1996, 51, S.506-510,
- 78 Murdoch RD., Pollock I., Naeem S.: Food additive-induced urticaria: studies of mediator release during provokation tests. *J. R. Coll. Physicians Lond.*. 1987, 21, S.262-266,
- 79 Ngamphaiboon J.: Montelukast in general pediatric practice. *J. Med. Assoc. Thai.*. 2005, 88, *Suppl. 4*, S.348-351,
- 80 Novak N., Bieber T.: Pathophysiologie der atopischen Dermatitis. *Deutsches Ärzteblatt*. 2004, 3, S.B94-B102, 0172-2107.
- 81 Pauwels RA., Joos GF., Kips JC.: Leukotrienes as therapeutic target in asthma. *Allergy* . 1995, 50, S.615-622,
- 82 Pei AY., Chan HH., Leung TF.: Montelukast in treatment of children with moderate to severe atopic dermatitis: a pilot study. *Pediatr. Allergy Immunol.*. 2001, 12 (3), S.154-158,
- 83 Rackal JM., Vender RB.: The treatment of atopic dermatitis and other dermatoses with leukotriene antagonists. *Skin Therapy lett.*. 2004, 9 (2), S.1-5,
- 84 Rahman ML., Choudhury AM., Islam MM.: Effectiveness of montelukast in the treatment of atopic dermatitis. *Mymensingh Med. J.*. 2006, 15, S.85-88,
- 85 Raithel M., Baenkler HW., Naegel A., Buchwald F.: Significance of salicylate intolerance in diseases of the lower gastrointestinal tract. *J. of Physiol. and Pharmacol.*. 2005, 56, *Suppl. 5*, S.89-102,
- 86 Ring J., Darsow U., Gfesser M., Vieluf D.: The 'atopy patch test' in evaluating the role of aeroallergens in atopic eczema. *Int. Arch. Allergy Immunol.*. 1997, *Vol 113 (1-5)*, S.378-383,

- 87 Ring J.,Przybilla B.: Sulfite hypersensitivity. *Hautarzt*. 1987, 10, S.100-106,
- 88 Ruzicka T., Wüthrich B.: Das atopische Ekzem. *Deutsches Ärzteblatt*. 1997 , 26, S.B-1445-1449, 0176-3695.
- 89 Sainte-Laudy J.: Importance of in vivo and in vitro studies of leukotrienes. Application to the particular instance of aspirin. *Allerg. Immunol.* 1997, 29, S.28-35,
- 90 Sansom JE.,Taylor GW.,Dollery CT.,Archer CB.: Urinary leukotriene E4 levels in patients with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 1997, 136 (5), S.790-791,
- 91 Sanz, Prieto, Oehling: The histamine release test as an important complement to the diagnosis of allergic diseases. *ACI News*. 1995, 7, S.56-61,
- 92 Schlumberger, HD.: Pseudo-allergic reactions to drugs and chemicals. *Ann. Allergy*. 8/1983, 51, S.317-324, 6192739.
- 93 Schnyder B., Pichler WJ.: Food intolerance and food allergy. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1999, 129, S.928-933, 0036-7672.
- 94 Scow DT., Luttermoser GK.,Dickerson KS.: Leukotriene inhibitors in the treatment of allergy and asthma. *Am. Fam. Physician*. 2007, 75 (1), S.65-70,
- 95 Siridopoulos, Papastavrou, Charissoulis, Chamalidou: The cellular antigen stimulation test (CAST). New perspectives in allergy diagnosis. *Allergy*. 1995, 50 (Suppl.26), S.245,
- 96 Steinman, Fletcher, Potter: Evaluation of the CAST ELISA assay in the determination of egg allergy in children with atopic eczema. *J. Allergy Clin. Immunology*. 1997,
- 97 Szebeni J. : Complement activation-related pseudoallergy caused by liposomes, micellar carriers of intravenous drugs, and radiocontrast agents. *Crit. Rev.Ther. Drug Carrier Syst.* 2001, 18, S.567-606,
- 98 Szebeni J.: Hypersensitivity reactions to radiocontrast media: the role of complement activation. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2004, 4, S.25-30,
- 99 Thorsen S., Fogh K., Broby-Johansen U.,Sondergard J.: Leukotriene B4 in atopic dermatitis: increased skin levels and altered sensitivity al peripheral blood T-cells. *Allergy*. 1990, 45 (6), S.457-463,
- 100 Van Bever HP., Docx M., Stevens WJ.: Food and food additives in severe atopic dermatitis. *Allergy*. 1989, 44, S.588-584,
- 101 Veien N., Busch-Sorensen M.,Strausbol-Gron B.: Montelukast treatment of moderate to severe atopic dermatitis in adults. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2005, 53, S.147-149,
- 102 Vieluf D., Wieben A., Ring J.: Oral Provocation Test with Food Additives in Atopic Eczema. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1999, 118, S.232-233,
- 103 Vila L., Sanz, Sanchez, Ferrer u.a.: Study of the in vitro sulfidoleukotriene production in foodallergic patients. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2001, 11, S.247-254,
- 104 Wedi B., Elsner J., Kapp A.: In vitro diagnostic of pseudo-allergic reactions-New aspects. *Allergy Clin. Immunol. Int.* 1996, 8, S.113-115,
- 105 Wedi B., Kapp A.: Aspirin induced adverse skin reactions: new pathophysiological aspects. *Thorax*. 2000, 55 (Suppl 2), S.70-71,
- 106 Wedi B., Kapp A.: Current position of the role of allergic and non-allergic food hypersensitivity in urticaria. *Hautarzt*. 2006, Bd. 57, Nr.2, S.101-107,
- 107 Wedi B.,Kapp A.: Pathophysiological role of leukotrienes in dermatological diseases: potential therapeutic implications. *BioDrugs.* 2001, 15, S.729-743,
- 108 Wehner J.,Neuber K.: Staphylococcus aureus enterotoxins induce histamine and leukotriene release in patients with atopic eczema. *Br. J. Dermatol.* 2001, 145, S.302-305,
- 109 Wolanczyk-Medrala, Medrala, Matolepszy, Liebhart: CAST-ELISA test in diagnosis of aspirin- induced asthma. *J. Invest. Allergy Clin. Immunol.* 1997,

- 110 Worm M., Ehlers I., Sterry W., Zuberbier T.: Clinical relevance of food additives in adult patients with atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy*. 2000, *30*, S.407-414,
- 111 Wüthrich B., Fabro L.: Acetylsalicylic acid and food additive intolerance in urticaria, bronchial asthma and rhinopathy. *Schweiz. Med. Wochenschr.*. 1981, *111*, S.1445-50,
- 112 Yanase DJ., David-Bajar K.: The leukotriene antagonist montelukast as a therapeutic agent for atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.*. 2001, *44*, S.89-93,
- 113 Zuberbier T.: Pseudoallergy or nonallergic hypersensitivity. *Allergy* . 1999, *54*, S.397-398, 0105-4538.
- 114 Zuberbier T.: The role of allergens and pseudoallergens in urticaria. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*. 2001, *6*, S.132-134,
- 115 Zuberbier T., Chantraine-Hess S., Hartmann K.: Pseudoallergen-free diet in the treatment of chronic urticaria- a prospective study. *Acta Derm. Venereol.* . 1995, *75*, S.484-487,
- 116 Zuberbier T., Pfofmer C., Specht K.: Aromatic components of food as novel eliciting factors of pseudoallergic reactions in chronic urticaria. *J. Allergy Clin. Immunol.*. 2002, *109*, S.343-348,

## **Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. M. Worm für die Überlassung des Themas und den „langen Atem“ während der Schreib- und Korrekturphase; sowie bei meinen nicht-atopischen Freunden Katrin, Olaf und Stefan und Anderen für die freundliche Blutspende. Bei den Mitarbeitern des dermatologischen Labors möchte ich mich für die Unterstützung und die guten Tipps bedanken, vor allem bei Dipl.-Ing. Sven Guhl, der immer wieder Zeit und ein offenes Ohr übrig hatte. Und nicht zuletzt gilt mein Dank natürlich den Patienten, die durch ihre Mitarbeit an der Studie diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

## **Erklärung**

Ich, Wanja Vieth, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Sulfidoleukotrienbestimmung bei Patienten mit atopischer Dermatitis und Nahrungsmitteladditiva-Intoleranz“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Lübeck, Januar 2008

Wanja Vieth

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.