

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

DISSERTATION

Klinischer Einsatz und Immunmodulation durch apathogene Escherichia coli Nissle 1917 bei Gräserpollenallergikern

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Jennifer Berg
aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. M. Worm
 2. Priv.-Doz. Dr. med. M. Wagenmann
 3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Klein-Tebbe

Datum der Promotion: 22.03.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Klassifikation IgE-vermittelter Allergien.....	1
1.2 Pathophysiologie der allergischen Rhinokonjunktivitis.....	1
1.3 Häufigkeit der allergischen Rhinokonjunktivitis.....	3
1.4 Behandlung der allergischen Rhinokonjunktivitis.....	4
1.5 Apathogene E. coli Nissle 1917 (EcN).....	7
1.6 Effekte und Einsatz von EcN.....	8
1.7 Immunmodulation durch EcN bei allergischen Erkrankungen	11
2. Zielsetzung	13
3. Methoden	14
3.1 Studiendesign.....	14
3.2 Patientenrekrutierung und Randomisierung.....	16
3.3 Behandlung	17
3.4 Untersuchungen.....	18
3.4.1 Symptom-Medikamenten-Score	19
3.4.2 Sekundäre Zielparameter.....	21
3.4.2.1 Medikamenten-Score (MS) und Symptom-Score (SS).....	21
3.4.2.2 Haut-Prick-Test (SPT).....	21
3.4.2.3 Konjunktivaler Provokationstest (KPT).....	22
3.4.2.4 Lebensqualität Fragebögen (RQLQ).....	22
3.4.2.5 Symptomfreie Tage und retrospektiver Symptomscore.....	23
3.4.2.6 Globale Bewertung der Gräserpollensaison	24
3.4.3 Zusatzparameter.....	24
3.4.3.1 Messung von Immunglobulin E.....	24
3.4.3.2 Gastrointestinale Beschwerden.....	24
3.4.3.3 Pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie	25
3.4.4 Sicherheit und Compliance.....	25
3.5 Statistische Auswertung.....	26
4. Ergebnisse	27

4.1	Untersuchungskollektiv.....	27
4.2	Klinische Wirksamkeit der EcN-Behandlung.....	30
4.2.1	Rhinokonjunktivitis Symptom-Medikamenten-Score.....	30
4.2.2	Symptom-Score und Medikamenten-Score.....	32
4.3	Immunologische Parameter während der EcN-Behandlung.....	33
4.3.1	Klinische Parameter.....	33
4.3.1.1	Haut-Prick-Test (SPT).....	33
4.3.1.2	Konjunktivaler Provokationstest (KPT).....	34
4.3.1.3	Spezifische IgE-Bestimmung im Serum.....	36
4.4	Globale klinische Wirkung und Beurteilung der EcN-Behandlung.....	36
4.4.1	Lebensqualität.....	36
4.4.2	Symptomfreie und –schwache Tage.....	38
4.4.3	Globale Bewertung der Gräserpollensaison 2009.....	38
4.4.4	Retrospektiver Symptom-Score (rSS).....	39
4.5	Zusätzliche Parameter.....	39
4.5.1	Gastrointestinale Visualskala.....	39
4.5.2	Pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie Visualskala.....	39
4.6	Sicherheit.....	40
5.	Diskussion.....	42
5.1	Orale EcN-Substitution bei erwachsenen Patienten mit Gräserpollenallergie – ein Pilotprojekt.....	42
5.2	Immunmodulatorische Kompetenz von EcN in der Klinik.....	44
5.3	EcN als immunmodulatorisches Therapeutikum.....	47
5.4	Ausblick - EcN Grenzen und Möglichkeiten.....	49
6.	Zusammenfassung.....	50
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	51
8.	Literaturverzeichnis.....	53
9.	Erklärung an Eides Statt.....	59
10.	Lebenslauf	60

1. Einleitung

1.1 Klassifikation IgE-vermittelter Allergien

Unter Allergien versteht man eine Gruppe von Erkrankungen, bei denen das Immunsystem mit einer überschießenden Immunantwort auf ubiquitär vorkommende Antigene, die in diesem Fall dann als Allergene bezeichnet werden, reagiert. Dabei unterscheidet man unterschiedliche Typen von Allergien, die sich in ihren Allergenen, den daraus resultierenden Effektormechanismen und den möglichen Krankheiten unterscheiden. Die allergischen Reaktionen werden nach Gell und Coombs in vier Typen eingeteilt, wobei die allergische Rhinokonjunktivitis sowie das allergische Asthma bronchiale der Typ-1 Allergie vom IgE-vermittelten Soforttyp nach Gell und Coombs zuzuordnen ist [1].

1.2 Pathophysiologie der allergischen Rhinokonjunktivitis

Der allergischen Rhinokonjunktivitis liegt pathophysiologisch eine IgE-abhängige Allergie vom Soforttyp, die wiederum mastzellabhängig ist, zugrunde. Hierbei geht der eigentlichen allergischen Reaktion eine Sensibilisierungsphase (siehe Abbildung 1) voraus, wo die Allergene von dendritischen Zellen prozessiert und anschließend über deren MHC II-Rezeptoren präsentiert werden. Hierdurch werden naive T-Zellen zu aktivierten TH2-Zellen differenziert, die wiederum mit B-Zellen, die ebenfalls Allergenkontakt hatten, eine TH2-Zell-B-Zell-Interaktion eingehen können. Dadurch wird die B-Zelle aktiviert und entwickelt sich zu einer IgE-sezernierenden Zelle. Die produzierten IgE-Antikörper binden an Mastzellen und Basophilen über den hochaffinen IgE-Rezeptor und werden durch Allergene beim Zweitkontakt kreuzvernetzt. Dies führt wiederum zur Degranulation der Mastzellen und Basophilen (siehe Abbildung 1). Es werden Entzündungsmediatoren wie Leukotriene, Prostaglandine und Histamin freigesetzt, die die typischen Symptome der Rhinokonjunktivitis wie wässriger Schnupfen, Niesreiz, Niesattacken und konjunktivalen Pruritus auslösen. Histamin, aber auch frei werdendes Kallikrein, Plättchen aktivierender Faktor (PAF) und Slow reacting substance-A (SRS-A) können dann zu den Symptomen wie Broncho- und

Darmspasmen, Blutdruckabfall, Ödem, Hyper- und Dyskrinie bis hin zum anaphylaktischen Schock führen [1].

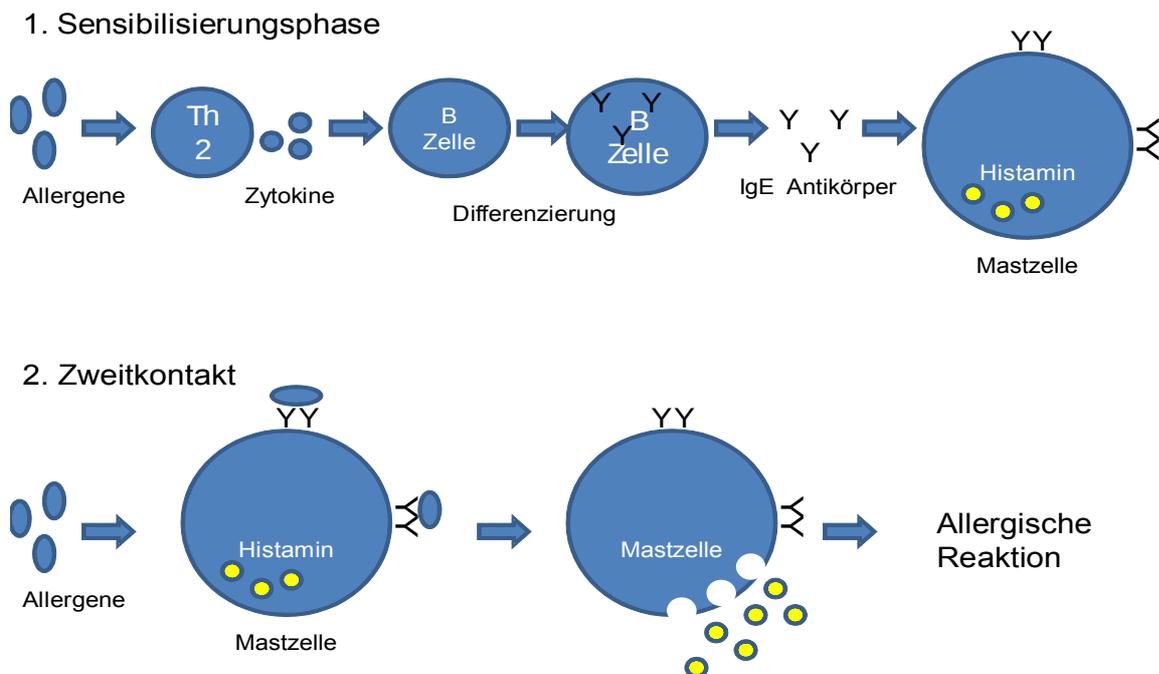


Abbildung 1 Die zwei Phasen der allergischen Immunantwort

Der entscheidende immunpathogenetische Vorgang bei der allergischen Immunantwort liegt in der Aktivierung der TH2-Zellen. Allergene bewirken ein Zytokinmilieu der antigenpräsentierenden Zellen (APZ), wodurch TH0-Zellen unter Interleukin (IL)4-Einfluss zu TH2-Zellen differenzieren und expandieren. IL-4 und IL-13 fördern die Differenzierung von den TH2-Zellen zu Immunglobulin E (sIgE)-produzierenden B-Plasmazellen (siehe Abbildung 2).

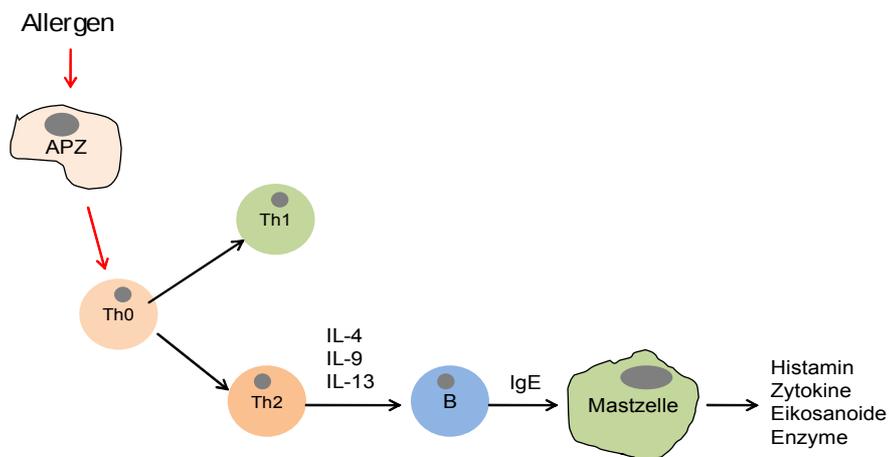


Abbildung 2 Pathogenetische Mechanismen der akuten allergischen Entzündung, frei nach [1].

1.3 Häufigkeit der allergischen Rhinokonjunktivitis

Die allergische Rhinokonjunktivitis tritt mit einer immer steigenden Prävalenz besonders in den westlichen Ländern auf [2, 3], wobei auch in ärmeren Ländern wie in Teilen Afrikas und Südamerikas die Prävalenz von Erkrankungen des atopischen Formenkreises stetig zunimmt [3]. Epidemiologische Studien zeigen das vermehrte Vorkommen von Typ-1 Allergien. Das Robert-Koch-Institut gibt für Deutschland eine Lebenszeitprävalenz von mindesten einer atopischen Erkrankung von 22,9% an. Andere Studien, wie eine Erhebung aus Odense, Dänemark [4] postulieren eine ähnlich hohe Prävalenz von 21,3%, Broide [5] spricht sogar von einer Prävalenz bis zu 40% bei Kindern und bei Erwachsenen von 10-30%. Während in Deutschland das ehemalige Ost-West-Gefälle nicht mehr nachweisbar ist [2], zeigt sich jedoch in den sozial schwächeren Familien eine geringere Prävalenz [2] sowie ein Geschlechterunterschied, nach dem Frauen häufiger an atopischen Krankheiten leiden [4, 6].

1.4 Behandlung der allergischen Rhinokonjunktivitis

Die allergische Rhinokonjunktivitis stellt seit Jahrzehnten eine behandlungsbedürftige Krankheit dar, deren Einteilung und Therapiekonzepte sich im Laufe der Zeit durch verschiedenste Studien und Erfahrungen gewandelt haben.

Dabei hat die Einteilung einer klinisch relevanten behandlungsbedürftigen Allergie direkt Einfluss auf deren Therapie, da je nach Schweregrad und Persistenz der Rhinokonjunktivitis unterschiedliche Medikamente eingesetzt werden können. Des Weiteren haben weitere Begleiterkrankungen, insbesondere weitere allergische Begleiterkrankungen wie zum Beispiel das allergische Asthma bronchiale, und andere individuelle Bedürfnisse des Patienten Einfluss auf die Wahl der Therapie.

Unter diesen Gesichtspunkten wurden in den letzten Jahren in mehreren Studien und Zentren im Rahmen der ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*) Leitlinien [7-10] zur Einteilung der allergischen Rhinokonjunktivitis entwickelt, die zwischen saisonalen und ganzjährigen Beschwerden unterscheiden. Da dies dem klinischen Auftreten der Symptome nicht immer gerecht wurde, wurde zusätzlich der Schweregrad der Symptome betrachtet. In Tabelle 1 sind die klinischen Einteilungen und die stadiengerechten Therapieempfehlungen gemäß der aktuellen ARIA-Leitlinien zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 1 Antiallergische Therapieoptionen bei allergischer Rhinokonjunktivitis (AR) nach den ARIA-Leitlinien [7-10] und modifiziert nach Price et al. [13].

Milde intermittierende AR	Milde persistente AR	Mittlere/schwere intermittierende AR	Mittlere/schwere persistente AR
Orale H1-Blocker Intranasale H1-Blocker Dekongestiva	Orale H1-Blocker Intranasale H1-Blocker Dekongestiva Intranasale Glukokortikoide Cromone Antileukotriene	Orale H1-Blocker Intranasale H1-Blocker Dekongestiva Intranasale Glukokortikoide Cromone Antileukotriene	Intranasale Glukokortikoide Orale H1-Blocker Dekongestiva Antileukotriene H1-Blocker Ipratropium Orale Steroide

Tabelle 2 Beispiele für antiallergische Medikamente und deren Einsatz in der vorliegenden Untersuchung.

Medikament	Beispiel	Studienmedikament
Orale H1-Blocker	Cetirizin	ja, Stufe 1
Lokale Cromone	Cromoglycerate	ja, Stufe 1
Intranasale Kortikoide	Mometason	ja, Stufe 2
Orale Kortikoide	Prednison	ja, Stufe 3
Orale Dekongestiva	Ephedrin	nein
Intranasale Dekongestiva	Epinephrin	nein
Intranasale Anticholinergika	Ipratropium	nein
Antileukotriene	Montelukast	nein

Die Behandlung der allergischen Rhinokonjunktivitis stützt sich jedoch nicht allein auf die medikamentöse Therapie. Viel mehr basiert sie im Wesentlichen auf drei Pfeilern. Die Basisempfehlung ist der Versuch der Reduktion der Allergenzufuhr, wie zum Beispiel das Verringern des Epithelienkontaktes bei Tierhaar- und Hausstaubmilbenallergien.

Der sicherlich größte Pfeiler ist jedoch die medikamentöse Therapie, wobei es sich stets um symptomverringende Behandlungen handelt, nie um kausaltherapeutische. In der medikamentösen Behandlung finden verschiedene pharmakologische Stoffe Anwendung, die an unterschiedlichen Punkten der allergischen Reaktion ansetzen, aber im Wesentlichen eine ähnliche Wirkung, in Form von Schleimhautabschwellung und Verringerung der Entzündungsreaktion, haben.

Orale Antihistaminika sind die Medikamente der ersten Wahl für leichtere bis mittlere Beschwerden, sie sind aber auch zur unterstützenden Behandlung bei schweren Verläufen geeignet, wobei sie bei saisonalen aber auch bei ganzjährigen Formen der allergischen Rhinitis anwendbar sind. Topische Kortikosteroide finden aufgrund ihrer guten anti-entzündlichen Wirkung ebenfalls Anwendung, wobei sie den Antihistaminika bezüglich ihrer Wirksamkeit überlegen sind. Meist werden sie lokal angewandt, z.B. als Nasenspray, was die unerwünschten systemischen Wirkungen verhindert. Weiterhin sind Cromone, zum Beispiel in Form von Augentropfen in der Therapie der allergischen Konjunktivitis nutzbar. Ein neueres Medikament stellt Montelukast, ein

Leukotrienrezeptorantagonist, welches die Bindung der Leukotriene an ihre Rezeptoren kompetitiv verhindert, dar. Im Vergleich zu den Antihistaminika zeigen sie eine vergleichbare Wirksamkeit, jedoch wirken sie schwächer als topische Kortikoide [7-13]. Somit ist die Wahl des Medikamentes zur Behandlung der allergischen Rhinokonjunktivitis stets individuell nach Persistenz und Schwere der Beschwerden sowie Art der Symptome festzulegen.

Als dritte Säule bleibt die spezifische Immuntherapie (SIT), die als einzige Behandlungsoption kausaltherapeutisch ist und möglicherweise den zukünftigen Krankheitsverlauf beeinflussen kann [7]. Die SIT lässt sich in unterschiedlichen Applikationsformen ausführen, wobei die subkutane Injektion und die sublinguale Applikation die beiden derzeit am häufigsten eingesetzten Formen sind. Die subkutane Immuntherapie (SCIT) und die sublinguale Immuntherapie (SLIT) sind vom Mechanismus vergleichbar [7-10, 14]. Sie wirken auf der Ebene der allergischen Reaktion, beeinflussen die T-Zell-Antwort und reduzieren die inflammatorischen Prozesse, sodass klinisch eine Verringerung der Symptome stattfindet. Schließlich werden der SIT noch sogenannte sekundärpräventive Effekte zugeschrieben, welche das Voranschreiten der allergischen Erkrankung verhindern bzw. verringern kann. So wurde in Studien gezeigt, dass das Asthmarisiko bei Kindern, die eine SIT erhielten, gegenüber den symptomatisch behandelten Kindern, deutlich reduziert war [15]. Trotz der im Allgemeinen guten Wirksamkeit der SIT bestehen allergenspezifische Unterschiede. Auch ist sie nicht für alle Patienten gleichermaßen geeignet, aufgrund der möglichen unerwünschten Wirkungen, die in seltenen Fällen bis zum anaphylaktischen Schock reichen können.

Somit besteht die antiallergische Therapie, die oft nur unzureichende Anwendung findet und mäßige Linderung bringt [16, 17], hauptsächlich aus einer symptomatischen medikamentösen Behandlung. Bis auf die SIT gibt es bislang keine kausaltherapeutischen Therapieoptionen.

1.5 Apathogene E. coli Nissle 1917 (EcN)

E. coli gehören zu der Familie der Enterobacteriaceae und sind gramnegative Stäbchen von etwa $1,1-1,5\mu\text{m} \times 2,0-6,0\mu\text{m}$ Größe. Sie wachsen fakultativ anaerob, wobei sich ihre Population unter optimalen Wachstumsbedingungen alle 20 Minuten verdoppeln kann. Im menschlichen Darm kann eine Verdopplung bis zu 30 Minuten dauern [12]. E. coli weisen eine große morphologische und serologische Vielfalt auf, wobei 50.000 verschiedene Stämme in der Natur vorkommen können [12, 13], die sich durch die verschiedene Antigenstruktur ergeben. Es sind bislang 173 Oberflächen (O)-, 80 Kapsel (K)-, und 56 Geißel (H)- Antigene bekannt. Bei dem Stamm Nissle 1917 handelt es sich um einen der am besten untersuchten E. coli Stämme, der aufgrund seiner Sicherheitsaspekte große Anwendung in der Forschung und klinischen Nutzung findet. EcN mit dem Serotyp O6:K5:H1 weist eine genetische Stabilität auf und besitzt keine Virulenzfaktoren. Des Weiteren produziert EcN keine Enterotoxine, keine Zytotoxine und keine pathogenen Adhäsionsfaktoren. Auch fehlen bei diesem Stamm Invasivität und Immuntoxizität sowie eine Serumresistenz, weswegen keine Gefahr einer Sepsis besteht. Auch eine fehlende Uropathogenität konnte für EcN gezeigt werden [14-16]. Diese apathogenen Eigenschaften, kombiniert mit sogenannten Fitnessfaktoren in Form von Mikrozininen und typischen Adhäsinen [17] machen EcN zu einem klinisch anwendbaren probiotischen Therapeutikum. Dass EcN immunmodulatorische aber keine immuntoxischen Eigenschaften hat, erklärt sich durch eine Punktmutation im wzy-Gen, das die besondere Lipopolysaccharid (LPS)-Struktur, also das Oberflächen-Antigen, bedingt [14] (siehe Abbildung 3).

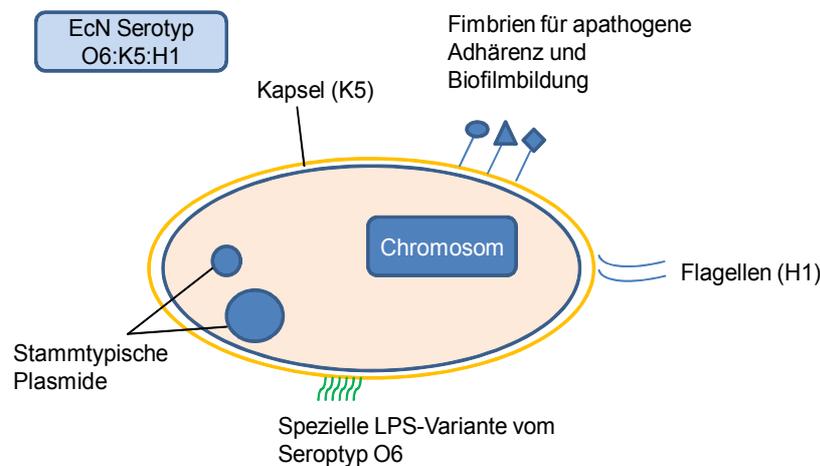


Abbildung 3 Schematische Darstellung von EcN frei nach [23].

1.6 Effekte und Einsatz von EcN

Der apathogene *E. coli* Stamm Nissle 1917 (EcN) ist aufgrund seiner Eigenschaften seit Jahrzehnten Bestandteil verschiedenster Forschungsarbeiten, wobei *E. coli* erstmals 1885 von Theodor Escherich und die Entdeckung des Koliantagonismus 1916 von Nissle beschrieben wurde. Therapeutisch wird EcN als Präparat Mutaflor® eingesetzt. Die Haupteinsatzgebiete sind in Tabelle 3 dargestellt. Vor allem bei chronischen Darmerkrankungen, Darmflorastörungen und anderen darmassoziierten Erkrankungen findet EcN bereits Anwendung. Zur Unterstützung der Remissionsphase bei Colitis Ulcera (CU) wurde die Wirksamkeit von EcN evaluiert und derzeit erfolgreich eingesetzt [13, 25, 26].

Schütz et al. [27] haben in den achtziger Jahren in einer großen multizentrischen Studie mit 167 Ärzten und 1074 Patienten gezeigt, dass Mutaflor® von über 90% der Patienten gut vertragen wurde. Eine positive Wirkung wurde bei Patienten mit funktionellen Darmerkrankungen (84%) und bei Patienten mit Reizdarmsyndrom (78%) als gut bzw. sehr gut beschrieben.

Gerade zur begleitenden Behandlung von chronischen Darmerkrankungen und hier als Schwerpunkt zur adjuvanten Therapie der CU finden sich überwiegend positive Studienergebnisse. Kruis et al. [13] zeigten bei 120 Patienten mit einer inaktiven CU in einer doppelblinden kontrollierten Studie, dass die Wirkung von EcN, gemessen anhand des klinischen Aktivitätsindex der CU, gleichwertig zu einer Gabe von 500 mg pro Tag Mesalazin war.

Dies wurde in weiteren Studien bestätigt. Rembacken et al. [26] zum Beispiel haben Patienten mit aktiver CU nach einwöchiger Antibiotika-Therapie und folgender Remission in zwei Gruppen randomisiert, wobei 59 Patienten Mesalazin, also das Mittel der Wahl, und 57 Patienten EcN erhielten. Die Therapie der Remissionsphase erfolgte bis zu zwölf Monate und es wurde festgestellt, dass zur Erhaltung der Remission die EcN-Substitution äquivalent zur Mesalazin-Gabe war. Die EcN-Gruppe hatte im Median 185 Remissionstage und die Mesalazin-Gruppe 175 Tage.

Nicht nur für die Remissionsphase bei CU liegen gute Untersuchungsergebnisse vor, sondern auch zur unterstützenden Behandlung des M. Crohn, scheint EcN zumindest in vitro ein therapeutisches Potential zu besitzen. Dies konnte zum Beispiel von Boudeau et al. [28] in einem Vergleich von invasiven E. coli und EcN und deren Wirkung auf Epithelzellen bei M. Crohn Patienten gezeigt werden.

Für die Behandlung weiterer darmassoziierter Störungen und Erkrankungen, darunter die Therapie von chronischer Obstipation [29], der Divertikulose [30] und des Reizdarmsyndroms [31], gibt es zahlreiche Untersuchungen mit EcN.

Zur Aufrechterhaltung der Remissionsphase bei gesicherter Divertikulose konnten Fric et al. [30] feststellen, dass die EcN-Gabe die Remissionsperiode signifikant verlängerte und sich die Symptome unter Behandlung besserten, wobei 15 Patienten erst die Standardtherapie in Form von Antibiotika und Aktivkohle erhielten und damit durchschnittlich 2,43 Remissionsmonate erzielten und anschließend eine EcN-Substitution erhielten, mit der durchschnittlich 14,1 Remissionsmonate erreicht wurden. Insbesondere die Wirkungen auf die Stuhlregulierung scheint entscheidend zur Behandlung von funktionellen Darmerkrankungen zu sein.

So konnten Möllenbrink et al. [29] in einer randomisierten doppelblinden klinischen Studie zeigen, dass Patienten mit einer idiopathischen chronischen Obstipation

durchschnittlich 1,5 Stühle pro Woche mehr als im Vergleich zu einer Placebo behandelten Gruppe hatten, nachdem sie vier Wochen EcN eingenommen hatten.

Ebenfalls die Stuhlregulierung betreffend, erwies sich EcN erfolgreich zur Behandlung des Reizdarmsyndroms. Plassmann et al. [31] konnten bei 150 Patienten mit Reizdarmsyndrom zeigen, dass die gebildete Subgruppe mit Diarrhöen eine signifikant reduzierte Stuhlfrequenz aufwies.

Alle zitierten Studien weisen ausdrücklich darauf hin, dass die Einnahme von EcN keine bzw. nur geringe unerwünschte Wirkungen hervorrief.

Die Wirksamkeit von EcN wurde mittels molekularbiologischer Analysen untersucht. Zyrek et al. [32] konnten als zu Grunde liegenden Effekt der probiotischen Eigenschaften von EcN eine veränderte Expression von Protein Kinase C zeta (PKC) und dem Protein Zonula occludens 2 (ZO-2) finden, welche maßgeblich an dem Wiederaufbau der zerstörten Epithelbarriere im Darm bei entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt sind.

Tabelle 3 Klinische Anwendungen von EcN (Mutaflor®) gemäß [33].

Intestinale Erkrankungen	Extraintestinale Erkrankungen*
Idiopathische chronische Diarrhö	Arthritiden bei CED
Reizdarmsyndrom	Tumorprophylaxe
Chronische Obstipation	Perioperative Prophylaxe
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	Zukünftig auch Allergie?
Divertikulose	

*bisher nicht ausreichend in klinischen Studien gesichert

1.7 Immunmodulation durch EcN bei allergischen Erkrankungen

Aufgrund der bereits erwähnten besonderen LPS-Struktur besitzen EcN eine immunmodulatorische Fähigkeit, die insbesondere die TH1/TH2-Regulation betrifft. Verschiedene Studien bei Menschen haben gezeigt, dass Endotoxine bzw. LPS immunmodulatorische Effekte haben [34, 35] und dass EcN die TH1-dominierte Immunantwort hochregulieren kann [34]. Des Weiteren wird durch Kostimulation die IFN- γ -Ausschüttung gefördert, die wiederum über eine Hemmung der Mastzellaktivierung und durch gleichzeitig verstärkt produziertes IL-10 allergische Entzündungen hemmen kann [34] wie in Abbildung 4 dargestellt. Die Hochregulation von TH1-Zellen und die Hemmung der allergischen Entzündungsreaktion begünstigt die potentiell präventiven und therapeutischen Ansätze bei allergischen Krankheiten durch EcN. Die genauen immunologischen Effekte einer EcN-Substitution in vivo sind bisher nur in einzelnen Untersuchungen erforscht worden. Ursprung der immunologischen Wirkung von EcN ist der Einfluss auf die Schleimhäute mittels einer Aktivierung des Toll-Like-Rezeptor (TLR)-Signalwegs [25, 36]. Primärer Wirkungsort der EcN-Substitution ist die Darmschleimhaut, auf die EcN modulierend Einfluss nehmen kann. Wie bereits erwähnt, kann nicht nur der Wiederaufbau der Epithelbarriere unterstützt werden [32], sondern grundsätzlich die Funktion der Epithelbarriere moduliert werden über eine beta-defensin 2-Induktion [37]. Entscheidend für die Wirkung außerhalb des Gastrointestinaltrakts scheint die Wirkung von EcN auf dendritische Zellen zu sein. Adam et al. [25] konnten in ihrer Untersuchung im Zellversuch mit *Bone Marrow derived Dendritic Cells* (BMDC) zeigen, dass EcN in der Lage ist, dendritische Zellen zu aktivieren, in dem wichtige kostimulatorische Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 über den TLR4-Signalweg herauf reguliert werden. Dies scheint ein entscheidender Mechanismus für die präventive Wirkung von EcN zu sein, da dendritische Zellen maßgeblich an der Entstehung und Unterhaltung einer TH2-Antwort bei der allergischen Rhinokonjunktivitis beteiligt sind. In vivo konnte die gleiche Untersuchung zeigen, dass ebenfalls teilweise über TLR4-Signalwege eine EcN-Gabe die bei einer TH2-vermittelten Allergie typische Entwicklung einer Eosinophilie und Neutrophilie in den Atemwegen verhindern konnte. Auch in klinischen Untersuchungen zeigte sich dieses präventive Potential bereits. So wurde bei Lodinová-Zádníková et al. [38-40] in einer

Langzeitstudie, in der Neugeborene EcN erhielten, gezeigt, dass die Prävalenz von Allergien nach zehn und 20 Jahren in den EcN-kolonisierten Personen signifikant geringer war als in den Kontrollgruppen.

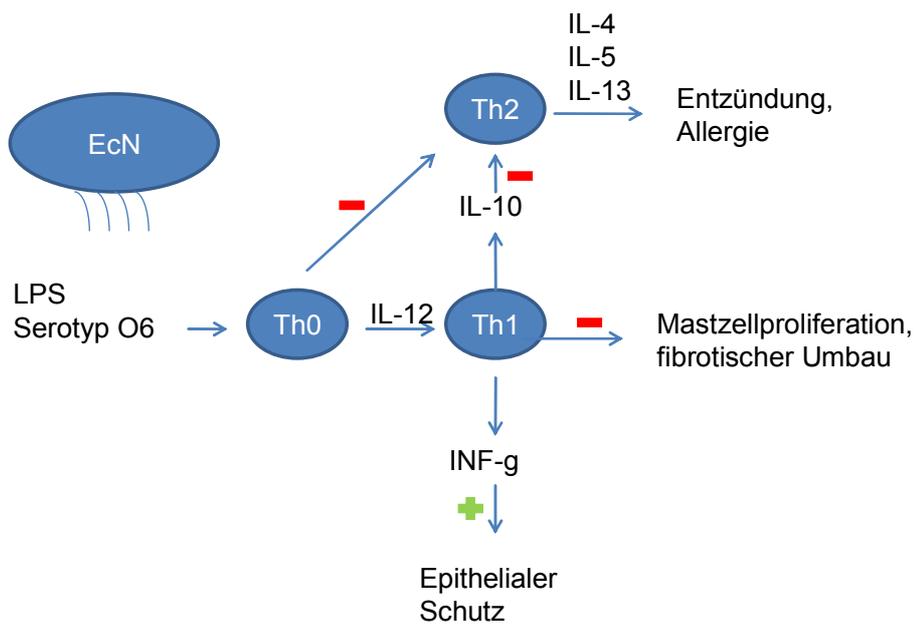


Abbildung 4 Immunmodulation durch LPS, frei nach [35, 41].

2. Zielsetzung

Der allergischen Rhinokonjunktivitis liegt unter anderem eine veränderte lokale Immunantwort mit einer TH1/TH2-Verschiebung in Richtung TH2 zugrunde. Sie kann mit systemisch erhöhten IgE-Werten einhergehen und ist eine weit verbreitete Erkrankung. Die Prävalenz der allergischen Rhinokonjunktivitis nimmt mit zunehmenden Umweltveränderungen zu. Die Behandlung ist oftmals unzureichend und begünstigt somit das Entstehen des allergischen Asthma bronchiale, einer potentiell lebensbedrohlichen Erkrankung. Die immunmodulatorische Wirkung von apathogen EcN wurde in vitro gezeigt, wo es zu einer Aktivierung der TH1-Immunantwort kommt. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es die Wirksamkeit und Verträglichkeit von EcN im Rahmen einer Placebo-kontrollierten klinischen Studie zu evaluieren und somit die therapeutische Bedeutung für die allergische Rhinokonjunktivitis zu prüfen.

3. Methoden

3.1 Studiendesign

Die vorliegende Studie wurde als *investigator initiated trial* (IIT) geplant und durchgeführt. Das Design war monozentrisch, randomisiert, doppelblind und Placebo-kontrolliert. Patienten mit einer behandlungsbedürftigen Gräserpollenallergie erhielten randomisiert entweder E. coli Stamm Nissle 1917 (EcN) oder ein Placebo in Form von Kapseln. Die Verabreichung der Kapseln erfolgte über einen Zeitraum von sechs Monaten. Die gesamte Studiendauer lag bei zehn Monaten, wobei diese mit dem Screening im Januar 2009 begann und im Oktober 2009 mit dem Follow-up (FU) endete (siehe Abbildung 5).

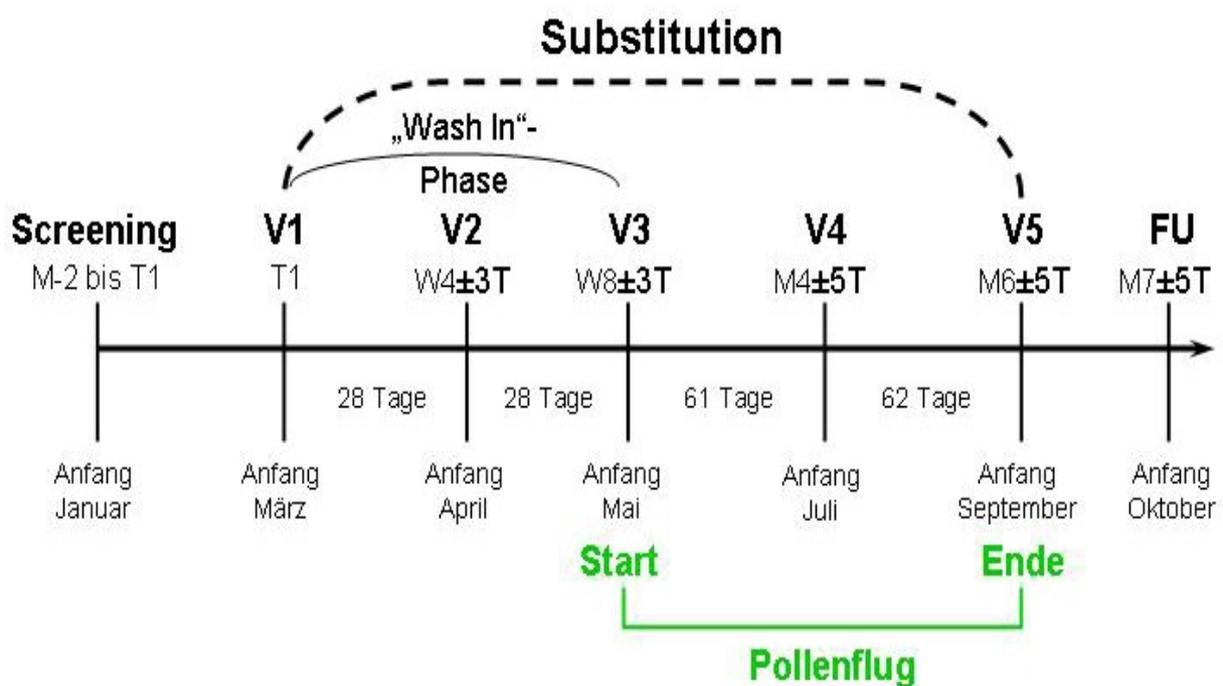


Abbildung 5 Ablaufschema der Studie

Die erste Visite fand vor Substitutionsbeginn statt. Die zweite folgte vier Wochen nach Ersteinnahme und vier Wochen vor Pollenflugstart. Kurz vor der Gräserpollensaison und acht Wochen nach Substitutionsbeginn wurde die dritte Visite durchgeführt. Visite vier lag in der Gräserpollensaison und die Abschlussvisite fand am Ende des Pollenfluges statt und beendete ebenfalls die Einnahme der Studienmedikation. Letztlich folgte noch der Follow-up Termin acht Wochen nach Substitutionsende. Alle Visiten fanden in den Räumlichkeiten der Klinik der Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin statt.

Das Studiendesign sah vor, dass ausreichend lange vor dem Pollenflugstart die Verabreichung der Kapseln begonnen werden konnte, sodass eine sog. „Wash In“-Phase von acht Wochen stattfand. Über die gesamte Studiendauer wurde zu mehreren Terminen Blut entnommen. Zum Screening wurden ein Sicherheitslabor sowie der IgE-Wert gegenüber Lieschgras der Patienten bestimmt. Zur Abschlussvisite wurde dann der IgE-Wert im Blut nach der Supplementierung und der Pollensaison gemessen. Weitere immunologische Blutparameter wurden zur ersten, dritten und letzten Visite sowie dem Follow-up Termin bestimmt. Weiterhin wurden ab der ersten Visite zu jedem Termin Fragebögen ausgeteilt sowie das Auftreten unerwünschter Ereignisse dokumentiert.

Ab der ersten Visite, die gleichzeitig den Start der Kapseleinnahme darstellte, wurden die Patiententagebücher zu jeder Visite ausgegeben und in der darauf folgenden wieder eingesammelt. Das letzte Tagebuch wurde zur fünften Visite eingesammelt, sodass vom Start bis zum Ende der Substitution sowie der gesamten Gräserpollensaison Patiententagebuch-Daten gesammelt wurden.

Zum Screening und bei der Abschlussvisite am Ende der Saison wurde eine körperliche Untersuchung durchgeführt sowie bei Bedarf, z.B. im Rahmen eines unerwünschten Ereignisses. Als klinische Tests wurden zum Screening und an allen nachfolgenden Terminen, bis auf die erste Visite, ein Haut-Prick-Test (*Skin Prick Test*, SPT) und an der ersten und letzten Visite je ein konjunktivaler Provokationstest (KPT) durchgeführt.

Die Studie wurde im Einverständnis und nach Erlaubnis der zuständigen Ethik Kommission des Landesamt für Soziales und Gesundheit (Eudra-CT Nummer: 2008-006335-12) durchgeführt. Das Untersuchungskollektiv wurde mündlich und schriftlich

aufgeklärt und eine Einwilligungserklärung wurde von jedem randomisierten Probanden unterschrieben.

Die Untersuchung erfolgte explorativ mit 30 Probanden, da es keine vorherigen Studien zu EcN und dessen immunmodulierenden Effekt in der Klinik gab, so dass eine Effektgrößenabschätzung vorab nicht möglich war. Aufgrund des relativ kurzen Behandlungszeitraum wurde eine Ausfallquote (*Drop-out*) von 10% geschätzt, sodass insgesamt 34 (10% = 3,33 auf 4 Patienten gerundet) Patienten eingeschlossen werden sollten.

3.2 Patientenrekrutierung und Randomisierung

Es wurden in einer Screeningphase (Zeitraum für die Eingangsuntersuchungen) insgesamt 46 Probanden untersucht und die Eignung gemäß der Einschluss- und Ausschlusskriterien (Tabelle 4) für die klinische Studie geprüft. Bei diesem ersten Termin wurde ein Haut-Prick-Test, Blutentnahmen für das Sicherheitslabor und den spezifischen IgE-Wert gegenüber Lieschgras, eine körperliche Untersuchung mit Anamnese, bei Frauen ein Schwangerschaftstest sowie die mündliche und schriftliche Aufklärung durchgeführt. Schließlich konnten 34 Patienten in die klinische Studie eingeschlossen und randomisiert werden. Die Randomisierung erfolgte durch die Biometriker des Koordinationszentrum für klinische Studien (KKS) der Charité, Campus Virchow-Klinikum.

Tabelle 4 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<p>schriftliche Einwilligung</p> <p>18 - 65 Jahre, beide Geschlechter</p> <p>behandlungsbedürftige Gräserpollenallergie seit ≥ 2 Jahren</p> <p>retrospektiver Symptom-Score (rSS) ≥ 12 Punkte</p> <p>positiver SPT mit einer Quaddelgröße von ≥ 3 mm auf Gräser</p> <p>positives spezifisches IgE (sIgE) gegen Gräser (CAP-Klasse ≥ 2)</p> <p>Frauen: Bereitschaft zur Kontrazeption</p>	<p>ganzjährige Rhinokonjunktivitis</p> <p>chronische Diarrhö > 3 Monate</p> <p>schwere gastrointestinale Erkrankungen</p> <p>chronische Sinusitis</p> <p>Asthma Gina II bis IV</p> <p>gramnegative Antibiotika</p> <p>Anwendung von Mutaflor®</p> <p>spezifische Immuntherapie in den letzten 6 Monate</p> <p>schwere Grund- oder Begleiterkrankungen</p> <p>Abweichungen von Normwerten im Sicherheitslabor</p> <p>immunsuppressive Therapie</p> <p>Unverträglichkeit gegenüber den Inhaltsstoffe von Mutaflor®, Placebo und Begleitmedikation</p> <p>Unterbringung in einer Anstalt</p> <p>Schwangerschaft und Stillzeit</p> <p>gleichzeitige Teilnahme an einer anderen Studie</p> <p>Drogen- und Alkoholabusus, fehlende Compliance</p>

3.3 Behandlung

Bei dem verwendeten Prüfpräparat handelte es sich um Handelsware (Mutaflor®) der Firma Ardeypharm GmbH, Herdecke mit dem E. coli Stamm Nissle 1917 (EcN). Eine Kapsel enthielt $2,5 - 25 \times 10^9$ lebensfähige Bakterien E. coli Stamm Nissle 1917.

Das Placebopräparat enthielt keinen Wirkstoff. Weitere Inhaltsstoffe beider Präparate sind in Tabelle 5 aufgeführt. Beide Präparate wurden im Kühlschrank bei $+2$ bis $+8^\circ\text{C}$ gelagert. Die Studienmedikation beider Behandlungsgruppen unterschied sich nicht in der äußeren Form. In beiden Fällen handelte es sich um magensaftresistente, an beiden Enden abgerundete Hartgelatine-Steckkapseln mit rosa-braun-gefärbtem

Überzug, die eine zylindrische Form hatten und die in Röhrchen mit identischen Etiketten aufbewahrt wurden.

Die Behandlung begann nach der ersten Visite. Es wurde drei Tage lang zuerst je eine Kapsel, ab dem vierten Tag dann je zwei Kapseln zu einer Mahlzeit eingenommen. Die tägliche Einnahme wurde in einem ebenfalls täglich zu führenden Tagebuch dokumentiert. Die Substitution endete mit der Abschlussvisite.

Während der gesamten Behandlungsdauer wurde für beide Behandlungsgruppen eine Basisversorgung mit antiallergischen Medikamenten gewährleistet.

Tabelle 5 Inhaltsstoffe der Behandlungspräparate

Inhaltsstoffe EcN	Inhaltsstoffe Placebo
Maltodextrin	Maltodextrin
Talkum	Talkum
Poly(methacrylsäure-co-methylacrylat)	Poly(methacrylsäure-co-methylacrylat)
Macrogol (4000)	Macrogol (4000)
Triethylcitrat	Triethylcitrat
Glycerol 85%	Glycerol 85%
Eisen(III)-hydroxid-oxid x H ₂ O	Eisen(III)-hydroxid-oxid x H ₂ O
Titandioxid	Titandioxid
Gelatine	Gelatine
Gelbes Wachs	Gelbes Wachs
Carnaubawachs	Carnaubawachs
Schellack	Schellack
gereinigtes Wasser	gereinigtes Wasser
2,5 - 25 x 10 ⁹ EcN	

3.4 Untersuchungen

Bei jeder klinischen Studie wird ein primärer Zielparameter festgelegt, mit welchem der Ausgang der klinischen Studie bewertet wird. Weiterhin werden sekundäre Zielparameter definiert, um detailliertere Aussagen bezüglich der beobachteten Wirkungen treffen zu können.

3.4.1 Symptom-Medikamenten-Score

Der primäre Zielparameter dieser Studie war die Fläche unter der Kurve (*Area under the curve*, AUC) der täglichen Summe des Symptom-Medikamenten-Scores (SMS) während der Gräserpollensaison. Als Gräserpollensaison wurde ein Zeitraum von 45 Tagen definiert (14 Tage vor und 31 Tage nach dem Gräserpollen-Spitzenwert).

Der SMS wurde anhand der Patiententagebücher errechnet, in denen die allergischen Symptome und der Medikamentenverbrauch täglich während der Gräserpollensaison dokumentiert wurden. Jeder Patient wurde aufgefordert, die täglichen Symptome und den Verbrauch der Begleitmedikation im Tagebuch über den Zeitraum von sechs Monaten (beginnend mit der ersten Visite und endend mit der Abschlussvisite) zu dokumentieren.

Für die Auswertung mussten mindestens 75% der täglichen SMS dokumentiert sein.

Gemäß der EMEA-Empfehlungen (*European Medicines Agency*) [42] wurden die allergischen Symptome, die in Tabelle 6 aufgeführt sind, berücksichtigt und auf einer 4-Punkte-Skala von 0 bis 3 bewertet und summiert. Der maximale tägliche Symptom-Score betrug 30 Punkte. Die Intensität der Symptome wurde wie folgt eingeteilt:

0 = keine Symptome

1 = leicht (minimal belästigende Symptome)

2 = moderat (lästige aber tolerierbare Symptome)

3 = stark (Symptome beeinflussen das tägliche Leben und den Schlaf)

Tabelle 6 Symptome und Bewertung im Patiententagebuch

Symptome	max.Punkte/Tag
Symptome der Nase:	
laufende Nase	3
verstopfte Nase	3
Niesen	3
juckende Nase	3
Symptome der Augen:	
juckende Augen	3
rote Augen	3
tränenende Augen	3
Symptome der Lunge:	
Husten	3
Giemen	3
Dyspnoe	3
Maximale Gesamtpunktzahl	30

Der SMS wurde berechnet, indem die tägliche Summe der Symptome addiert wurde und mit der Einnahme antiallergischer Medikamente zusammen gezählt wurde. Der SMS wurde dann durch die Anzahl der Tage dividiert.

Die Begleitmedikation wurde wie in Tabelle 7 nach den Empfehlungen der *World Allergy Organization* (WAO) [14] bepunktet:

Tabelle 7 Antiallergische Begleitmedikation und Bewertung

Medikamente	max.Dosis/Tag
Cetirizin Tabletten (2 Punkte pro 10 mg)	2
Cromoglycin Augentropfen(0,5 Punkte pro Tropfen)	2
Nasonex® Nasenspray (1 Punkt pro Sprühstoß)	4
Prednisolon Tabletten (3 Punkte pro 10 mg)	15
Salbutamol (inhalativ) (1 Punkt pro Inhalation 200 µg)	8
Maximale Gesamtpunktzahl	31

Für die Festlegung des Erhebungszeitraums zur Bestimmung des SMS war der Gräserpollenflug in der Pollensaison 2009 entscheidend. Die Pollenzählung fand im

Allergie-Centrum der Charité Berlin statt, die seit 2006 über eine eigene Pollenfalle verfügt und den Pollenflug für den Standort Charité Mitte täglich bestimmt. Das Allergie-Centrum-Charité zählt damit zu den zehn Referenzmessstellen der Stiftung Deutscher Polleninformationsdienst für Pollenflugvorhersagen in Deutschland. Der Gräserpollen-Spitzenwert trat am 3.6.2009 auf, sodass als der zu verwendende Zeitraum für den SMS der 20.05.2009 bis zum 3.7.2009 berechnet wurde.

3.4.2 Sekundäre Zielparameter

Weitere Zielgrößen, die zur Beurteilung des Effektes der EcN-Substitution herangezogen wurden, waren die Erhebung des Medikamenten-Scores und des Symptom-Scores sowie weitere klinische Untersuchungsparameter wie der Haut-Prick-Test und der konjunktivale Provokationstest. Die allgemeine und subjektive Befindlichkeit der Patienten wurde zusätzlich überprüft, indem Fragebögen zur Lebensqualität eingesetzt wurden sowie die Anzahl der symptomfreien bzw. -schwachen Tage erhoben und eine allgemeine retrospektive Einschätzung bezüglich der Wirksamkeit von Arzt und Patienten am Ende der Studie durchgeführt wurde.

3.4.2.1 Medikamenten-Score (MS) und Symptom-Score (SS)

Neben dem kombinierten Symptom-Medikamenten-Score als Hauptzielgröße, wurden auch die beiden zugrundeliegenden Scores im Einzelnen betrachtet. Für den MS wurden die Punkte der dokumentierten verwendeten antiallergischen Medikamente addiert. Der SS errechnete sich ebenfalls durch die Addition der einzelnen Punkte. Beide Scores wurden wie unter 2.4.1 bereits beschrieben bepunktet und bewertet.

3.4.2.2 Haut-Prick-Test (SPT)

Der SPT mit Gräserpollenallergenextrakt (Fa. ALK-Abelló, Wedel, Deutschland) erfolgte entsprechend der Empfehlungen von GA²LEN [43]. Im Screening wurden insgesamt acht Allergene (Hasel, Erle, Birke, Gräser, Beifuß, Hausstaubmilbe, Schimmelpilz und Katze, alle Fa. ALK-Abelló, Wedel, Deutschland) untersucht. Im Verlauf der Studie wurde nur die Hauttestung mit Gräserpollenextrakt im Verlauf untersucht (Visite 2, 3, 4,

5 und Follow-up). Als Positivkontrolle wurde eine Histaminlösung (10 mg/ml) und als Negativkontrolle eine physiologische Kochsalzlösung verwendet.

Im Screening musste die durch den Gräserpollenallergenextrakt ausgelösten Quaddel als Einschlusskriterium mindestens 3 mm groß sein. Im Verlauf wurden die Patienten darauf hingewiesen, dass mindestens drei Tage vor dem SPT keine antiallergischen Medikamente wie Cetirizin eingenommen werden durften. Die jeweiligen Lösungen wurden auf vorher desinfizierter Haut aufgetragen und nach dem Einstich nach 15 Minuten Einwirkzeit mit dem Lineal abgelesen.

3.4.2.3 Konjunktivaler Provokationstest (KPT)

Der KPT wurde nach einer standardisierten Verfahrensanweisung des Allergie-Centrums-Charité durchgeführt. Kurz zusammengefasst wird in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tabelle 8) und in Abständen von zehn Minuten eine allergene Lösung, abwechselnd in die unteren Bindehautsäcke getropft. Der Test wurde als positiv bewertet, wenn mindesten zwei von vier folgenden Symptomen vorhanden waren: Juckreiz, Tränenfluss, Rötung und Schwellung. Trat auch bei Höchstkonzentration keine Reaktion auf, wurde der KPT als negativ bewertet.

Tabelle 8 Darstellung der im Konjunktivalen Provokationstest (KPT) verwandten Konzentrationen der allergenen Lösung.

Verhältnis	Konzentration (SQ/ml)
1:5	20.000
1:2	50.000
1:1	100.000

3.4.2.4 Lebensqualität Fragebögen (RQLQ)

Als weiterer sekundärer Zielparameter wurde die Lebensqualität vor und nach der Pollensaison sowie während der Substitution ermittelt. Dafür wurden die Fragebögen zur Lebensqualität bei Rhinitis/Rhinokonjunktivitis (RQLQ) nach Juniper [44-48]

verwandt. Zu allen Visiten wurden die Fragebögen ausgeteilt, sodass insgesamt zu sechs Terminen RQLQs von den Patienten ausgefüllt wurden.

Der RQLQ umfasste sieben sog. Items, die verschiedene Tätigkeiten und Symptome abdeckten und mit 0 bis 7 Punkte bewertet werden konnten. Die Items Tätigkeiten, Schlaf und praktische Probleme umfassten je drei Unterpunkte. Das Item allgemeine Beschwerden war in sieben Unterpunkte aufgeteilt und die Items, die sich mit den betroffenen Organen, also Auge und Nase sowie der Befindlichkeit befassten, hatten je vier Punkte. Die Patienten bewerteten jeweils die vergangenen sieben Tage vor der jeweiligen Visite und konnten je nach Beschwerden Punkte zwischen 0 und 7 Punkten verteilen, wobei 0 keinen Beschwerden und 7 maximalen Beschwerden entsprachen. Für jedes Item ergab sich so eine Punktzahl, die durch die Anzahl der jeweiligen Unterpunkte dividiert wurde, sodass jedes Item in der Endauswertung maximal sieben Punkte haben konnte. Für die Auswertung eines Fragebogens wurden die Punkte der sieben Items addiert und durch die Anzahl der Items, also wiederum durch sieben, dividiert, sodass sich im Gesamtergebnis immer eine Punktzahl zwischen 0 und 7 ergab. Die errechneten Punkte wurden tabellarisch festgehalten und der Verlauf der einzelnen Patienten sowie der Behandlungsgruppen im Placebo-EcN-Vergleich dokumentiert. Zur Auswertung wurden zum einen die Punkte im Gruppenvergleich herangezogen und zum anderen die Differenzen zwischen den Gesamtpunkten der einzelnen Visiten gebildet. Die Differenzen stellen die Änderung der Lebensqualität dar, sodass eine große Differenz eine starke Änderung und eine kleinere Differenz eine geringere Änderung der Lebensqualität widerspiegelt. Juniper [44-47] definierten zudem eine sog. minimale klinisch wichtige Änderung (*minimal clinic important difference*, MCID), die jedoch nicht als statistisch signifikant einzustufen ist. Von einer MCID spricht man, wenn die Differenz bei -1/0/+1 liegt.

3.4.2.5 Symptomfreie Tage und retrospektiver Symptomscore

Schließlich wurden noch die Anzahl der symptomfreien bzw. -schwachen Tage im Vergleich zwischen EcN und Placebo ermittelt sowie eine allgemeine Bewertung der Rhinokonjunktivitis-Symptome der Pollenflugsaison des Vorjahres im Vergleich zur Pollenflugzeit während der Substitution durchgeführt. Der Vergleich der Symptome in

der jeweiligen Saison erfolgte mit dem sog. retrospektiven Symptom-Score (rSS), der als Einschlusskriterium mindestens 12 Punkte betragen musste. In dem rSS wurden die Symptome wie im Tagebuch abgefragt und konnten mit jeweils 0 bis 3 Punkten bewertet werden. Es wurde der rSS von 2008 zu 2009 sowie zwischen Placebo- und EcN-Gruppe betrachtet.

3.4.2.6 Globale Bewertung der Gräserpollensaison

Letztlich wurde noch eine persönliche Einschätzung der Patienten erhoben, die die Gräserpollensaison 2009 im Vergleich zur vorherigen Saison bewerten sollten. Dabei konnten sie angeben, ob die behandelte Saison viel besser, besser, gleich oder schlechter als die vorherige war.

3.4.3 Zusatzparameter

Als Zusatzparameter wurden vor und nach Substitution sowie im Placebo-EcN-Vergleich der spezifische IgE-Wert, die gastrointestinalen Beschwerden und gastrointestinale Beschwerden von pollenassoziierten Nahrungsmitteln ermittelt.

3.4.3.1 Messung von Immunglobulin E

Zur Bestimmung von Gesamt- und spezifischen Immunglobulin (Ig) E wurde den Patienten vor und nach der Substitution Blutproben zur Serumgewinnung entnommen. Die Messung von Gesamt- und sIgE erfolgte im Labor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin.

3.4.3.2 Gastrointestinale Beschwerden

Mögliche bestehende oder neu aufgetretene gastrointestinale Beschwerden wurden auf einer Visualskala vor und nach Substitution sowie im Vergleich EcN und Placebo dokumentiert. Dabei konnte der Patient selbständig auf einer vorgegebenen Achse die möglichen Symptome einordnen, wobei die Achse einer Linie von zehn Zentimeter entsprach, deren linkes Ende keinen Symptomen und das rechte Ende maximale Beschwerden symbolisierten. Die von den Patienten markierte Stelle wurde mittels Lineal abgemessen und tabellarisch festgehalten.

3.4.3.3 Pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie

Mögliche gastrointestinale Beschwerden nach Genuss von pollenassoziierten Nahrungsmitteln wurden ebenfalls auf einer Visuallskala vor und nach Substitution dokumentiert. Bei der ersten Visite wurde nach den Symptomen gefragt und, ob diese stets bei dem Verzehr des jeweiligen Lebensmittel auftrat oder ob nur während der Gräserpollensaison. Der Aufbau entsprach ansonsten dem der gastrointestinalen Visuallskala.

3.4.4 Sicherheit und Compliance

Um die Sicherheit der Patienten zu gewährleisten und um deren Compliance zu kontrollieren, wurde neben der allgemeinen und spezifischen Anamnese und der körperlichen Untersuchung auch die Dokumentation von unerwünschten Ereignissen (*adverse events*, AE) und die Eintragungen der Tagebücher herangezogen.

Mit der Anamnese wurde sichergestellt, dass die Patienten nicht an schwerwiegenden, chronischen Erkrankungen leiden, die die Behandlung beeinflussen konnten. Zudem wurden alle dauerhaften Begleitmedikamente aufgenommen.

Die Compliance wurde kontrolliert, indem die Patienten die tägliche Einnahme der Studienmedikation in den ausgehändigten Tagebüchern dokumentieren mussten. Zusätzlich diente das Tagebuch der genauen Dokumentation aller auftretenden unerwünschten Ereignisse und deren medikamentösen Behandlung. Um eine kontinuierliche Kontrolle zu gewährleisten, wurde das Tagebuch über die gesamte Substitution einmal im Monat vom Studienteam kontrolliert und ausgetauscht.

Bei allen Patienten wurde vor und nach der Behandlung eine körperliche Untersuchung durchgeführt. Um sicherzustellen, dass die Patienten an keinen schweren Lungenerkrankungen, wie an einem schweren Asthma (GINA-Grad III oder IV) litten, erfolgte beim Screening die Messung der Lungenfunktion durch eine Spirometrie. Hierbei wurde die Einsekundenkapazität (FEV1) bestimmt.

Zusätzlich zu den im Patiententagebuch dokumentierten unerwünschten Ereignissen wurden unerwünschte Ereignisse durch das Studienpersonal bei Visite zwei bis fünf und beim Follow-up erfasst. Unerwünschte Ereignisse wurden in den dafür vorgesehenen CRF-Bogen dokumentiert.

Blutproben zur Bestimmung laborchemische Sicherheitsparameter wurden vor der Randomisierung und dem Beginn der Substitution mit EcN oder Placebo beim Screening entnommen. Das Blutvolumen für die Sicherheitslaborparameter betrug ca. 20 ml. Bei Frauen wurde vor Beginn der Substitution ein Urin-Schwangerschaftstest durchgeführt.

3.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung der primären und sekundären Endpunkte erfolgte explorativ und deskriptiv mittels des Software-Programms SPSS in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin. Es wurden hierzu statistische Maßzahlen (Mittelwert, Median, Streuung) berechnet sowie graphische Darstellungen (Histogramm, Boxplot) der Verteilung der AUC des SMS für jede Therapiegruppe angefertigt. Die Nullhypothese, dass kein Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen besteht, wurde zweiseitig auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ getestet. Über den Einfluss von EcN auf die Symptomatik einer durch Gräserpollen-induzierten Rhinokonjunktivitis gab es keine Informationen bzw. Vordaten. Die Auswertung begann erst nach Beendigung der Dateneingabe. Es erfolgte einerseits die Auswertung der gesamten Untersuchungspopulation, einschließlich der Drop-outs (*Full Analysis Set*, FAS). Andererseits erfolgte eine separate Auswertung über die Patienten, die die klinisch wissenschaftliche Untersuchung komplett durchlaufen haben und von denen 75% der SMS-Daten vorlagen (*Per Protocol*, PP).

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungskollektiv

Von 46 gescreenten Patienten konnten 34 Patienten in die klinische Studie randomisiert werden (17 EcN, 17 Placebo). Bei den zwölf ausgeschlossenen Patienten wurden nicht alle Ein- und Ausschlusskriterien erfüllt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9 Übersicht aller Patienten, die eine Einwilligung unterschrieben haben, aber nicht randomisiert werden konnten (sog. *Screening failure*).

Ausschluss Gründe
slgE < CAP 2
Chronische Sinusitis
Einnahme von gramnegativen wirksamen Antibiotika
slgE < CAP 2
Asthma (GINA > I)
Schwere Grunderkrankung (Spondylarthritis)
rSS = 09 (< 12 Punkte)
rSS = 10 (< 12 Punkte)
Schwere Grunderkrankung (Morphea profunda)
SPT Gräser < 3 mm
Einwilligung zurückgezogen
Einwilligung zurückgezogen

Bei allen 34 eingeschlossenen Patienten wurde die Behandlung (EcN- bzw. Placebo-Substitution) begonnen, sodass die Anzahl der *Full Analysis Set* (FAS)-Gruppe ebenfalls 34 betrug. Nach Beendigung der klinischen Untersuchung und kompletter Dateneingabe erfolgte ein sog. *Blind Data Review*-Treffen. Bei diesem Treffen wurde festgelegt, dass drei Patienten, aufgrund ihres frühen Studienabbruches aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Ein weiterer Patient wurde aufgrund seiner unerwünschten Ereignisse in Form von anatomisch bedingter Sinusitis sowie darauffolgender OP und medikamentöser Behandlung nicht in die *Per Protocol* (PP)-Gruppe eingeschlossen. So ergab sich schließlich dass die PP-Gruppe aus 30 Patienten (16 EcN, 14 Placebo) bestand (Abbildung 6). Für diese Arbeit wurden alle weiteren Angaben und statistischen Analysen mit der PP-Gruppe durchgeführt.

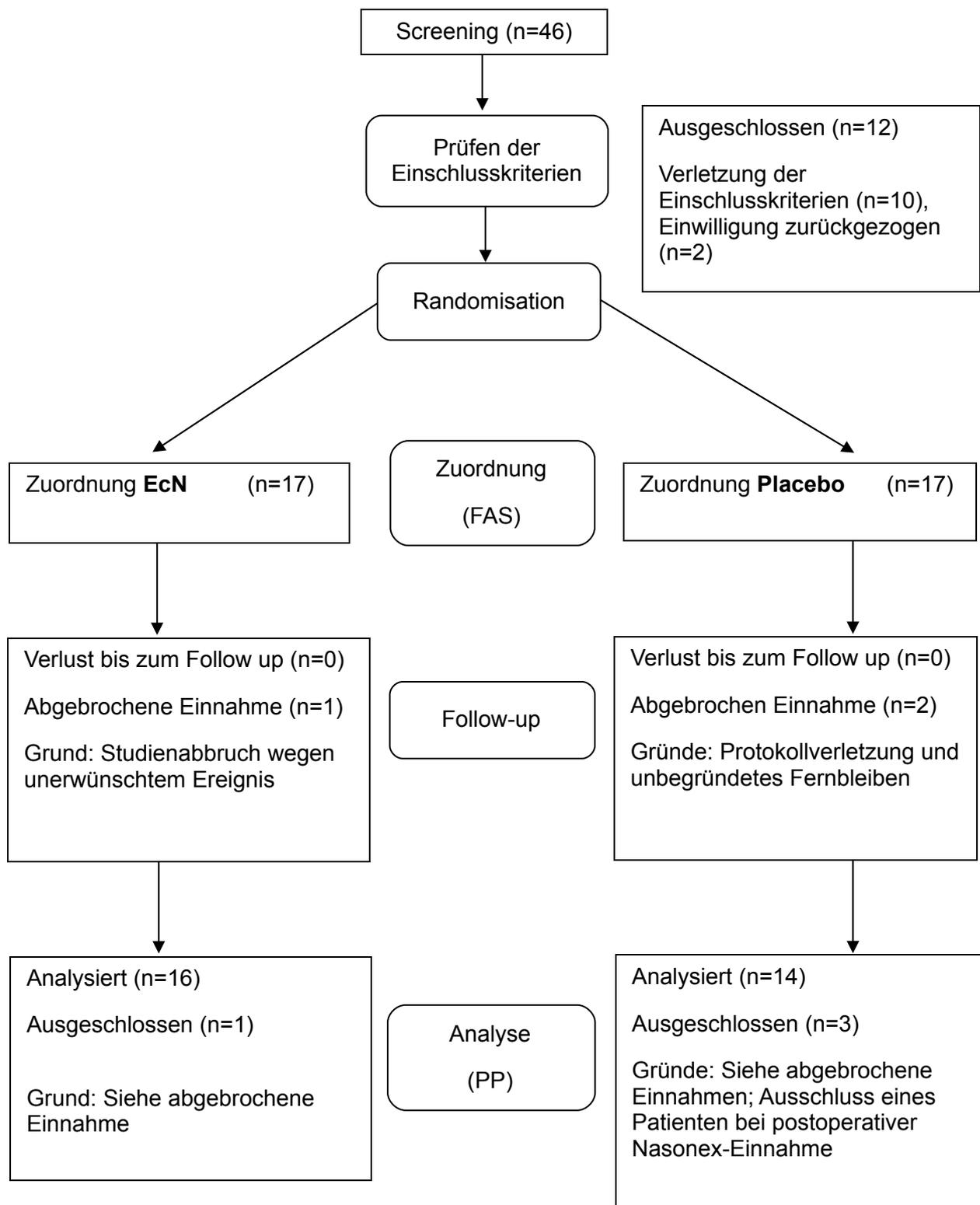


Abbildung 6 CONSORT-Studien-Flussdiagramm über die Patientenzahlen während der verschiedenen Studienabschnitte.

Beide Behandlungsgruppen waren bezüglich ihrer Alters- und Geschlechtszusammensetzung vergleichbar. Das durchschnittliche Alter in der EcN-Gruppe lag bei 35,6 Jahren (20-54) und in der Placebo-Gruppe bei 36,1 Jahren (22-49), wobei der Frauenanteil in beiden Gruppen mit 68,8 % in der EcN-Gruppe und mit 57,1% in der Placebo-Gruppe höher war. Auch die Ergebnisse in den verschiedenen Voruntersuchungen waren gut vergleichbar: So hatten die durchschnittlichen SPT-Quaddeln im Screening eine Größe von $7,5 \pm 0,52$ mm (EcN) und $8,3 \pm 0,60$ mm (Placebo). Die sIgE-Werte beim Screening betragen 17,8 kU/l (2,4-100,0) in der Placebo-Gruppe und 14,6 kU/l (1,1-100,0) in der EcN-Gruppe. Des Weiteren unterschieden sich beide Gruppen nicht signifikant in ihrer Beurteilung der vorhergehenden Gräserpollensaison im Jahr 2008. So wurden durchschnittlich $16,93 \pm 0,72$ Punkte (Placebo) und $16,44 \pm 0,62$ Punkte (EcN) im rSS vergeben. Je 11,8 % in beiden Gruppen brachen die Teilnahme an der Studie vorzeitig ab, wobei ein Patient (EcN-Gruppe) seine Einwilligung aufgrund eines unerwünschten Ereignisses zurückzog, ein anderer die Einschlusskriterien brach (Placebo-Gruppe) und zwei nicht mehr erschienen (je einer aus der EcN- und einer aus der Placebo-Gruppe).

Tabelle 10 Patienten Charakteristika zu Beginn der Untersuchung.

Parameter	EcN-Gruppe	N	Placebo-Gruppe	N	p
Alter	35,6 (20-54)	16	36,1	14	>0,903
Frauen	68,80%	11	57,10%	8	>0,529
sIgE Screen	14,6 kU/l (1,1-100,0)	16	17,8 kU/l (2,4-100,0)	14	>0,919
SPT Screen	$7,5 \pm 0,52$ mm	16	$8,3 \pm 0,60$ mm	14	>0,350
RQLQ Visite 1	0,28 Punkte (0-2,37)	16	0,88 Punkte (0-2,85)	14	>0,103
rSS 2008	$16,44$ Punkte $\pm 0,62$	16	$16,93$ Punkte $\pm 0,72$	14	>0,608
GIT Visite 1	0,45 cm (0,00-7,10)	16	2,10 cm (0,00-5,40)	14	>0,852
PaNa Visite 1	2,80 cm (1,50-3,60)	5	6,90 cm (1,00-8,50)	5	>0,128

4.2 Klinische Wirksamkeit der EcN-Behandlung

Zur Beurteilung der klinischen Wirksamkeit der EcN-Behandlung wurden der kombinierte Symptom-Medikamenten-Score sowie jeweils der Symptom-Score als auch der Medikamenten-Score separat ausgewertet.

4.2.1 Rhinokonjunktivitis Symptom-Medikamenten-Score

Der durchschnittliche Rhinokonjunktivitis Symptom-Medikamenten-Score (SMS) für den vordefinierten Zeitraum von 45 Tagen während der Gräserpollensaison lag in der Placebo-Gruppe bei $243,39 \pm 53,98$ (AUC-Werte) und bei $326,99 \pm 53,58$ (AUC-Werte) in der EcN-Gruppe und war damit in der Placebo-Gruppe geringer, jedoch nicht signifikant geringer als in der EcN-Gruppe (Abbildung 7).

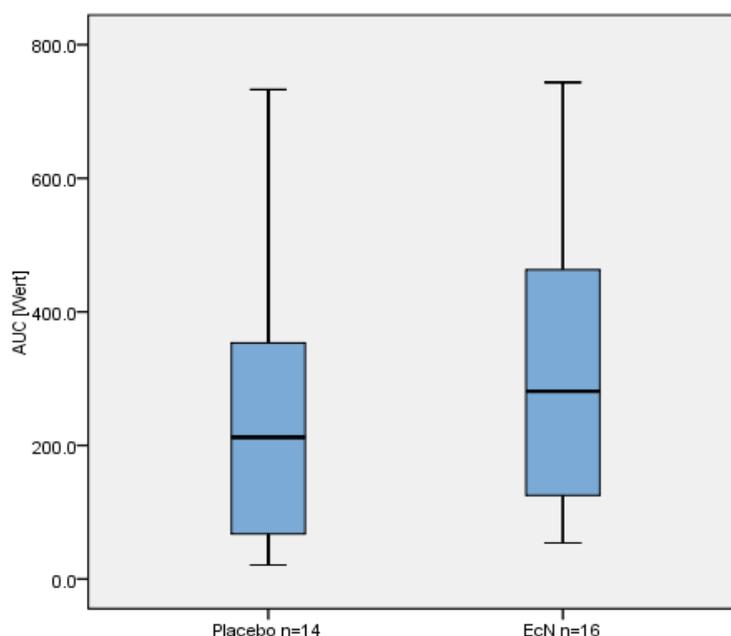


Abbildung 7 SMS dargestellt als durchschnittliche AUC-Werte, $p > 0,281$

Wie in Abbildung 8 dargestellt, folgten beide Behandlungsgruppen dem tatsächlichen Gräserpollenflug nur geringfügig. Der Gräserpollenflug hatte am Tag 14 (entspricht dem 03.06.2009) seinen ersten und höchsten Spitzenwert mit knapp 60 gemessenen Pollen pro Quadratmeter. Insgesamt verlief der Pollenflug 2009 mild und erreichte nur

vereinzelt weitere Spitzen, die jedoch stets unter dem ersten Höchstwert lagen. Beide Behandlungsgruppen hatten schon zum Gräserpollensaisonbeginn hin einen SMS über null, d.h. bereits vor dem Gräserpollenflug wurden Symptome angegeben und Medikamente eingenommen, da 75,0 % in der EcN-Gruppe und 92,9 % in der Placebo-Gruppe nicht monosensibilisiert auf Gräser, sondern multisensibilisiert meist auch auf Frühblüher und Birkenpollen (elf Patienten in der Placebo- und sechs Patienten in der EcN-Gruppe) waren.

Am ersten Tag der betrachteten Zeitspanne lag die EcN-Gruppe mit einem SMS von 5,0 Punkten (0,0-22,0) schon geringfügig über den Werten der Placebo-Gruppe mit im Median 3,5 Punkten (0,0-18,0), was sich im Verlauf auch nicht änderte (siehe Abbildung 8). Während der SMS der EcN-Gruppe geringfügig, aber annähernd noch erkenntlich dem Pollenflug folgte, nahmen die SMS-Werte der Placebo-Gruppe stetig ab, wobei beide Behandlungsgruppen, dabei die Placebo-Gruppe mit einem SMS von 1,5 Punkten (0,0-17,0) und die EcN-Gruppe mit einem SMS Wert von 4,0 Punkten (0,0-17,0), an Tag 45 etwas niedriger lagen als am ersten Tag.

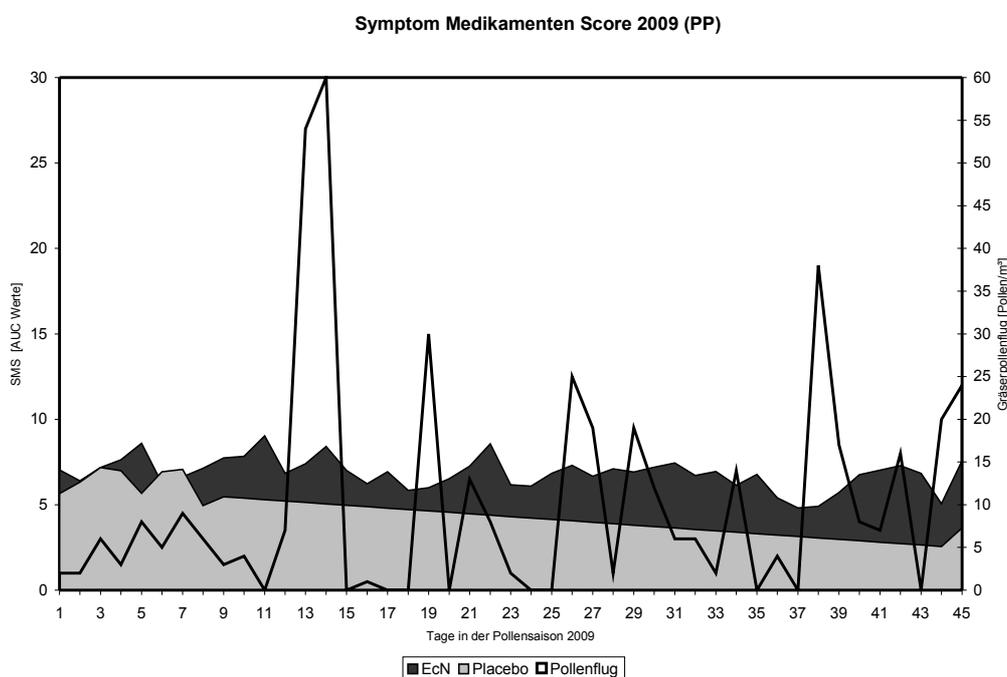


Abbildung 8 Darstellung des SMS der beiden Behandlungsgruppen sowie dem Gräserpollenflug 2009. Der SMS wird als Fläche unter der Kurve (AUC) dargestellt.

4.2.2 Symptom-Score und Medikamenten-Score

Dem SMS entsprechend verliefen auch die Scores für die Symptome und den Medikamentenverbrauch. In der EcN-Gruppe lag die Summe des Symptom-Scores (SS) bei 127,0 Punkten (40,0-510,0) und im Durchschnitt bei 2,8 Punkten (0,9-11,3). Die Summe des Medikamenten-Scores (MS) betrug in dieser Gruppe 93,5 Punkte (0,0-206,0) und im Durchschnitt 2,1 Punkte (0,0-4,6). In der Placebo-Gruppe waren die Summe und der Durchschnitt des SS etwas höher als in der EcN-Gruppe und beliefen sich auf 189,0 Punkte (14,0-431,0) in der Summe und auf 4,2 Punkte (0,3-9,6) im Durchschnitt. Ein anderes Bild zeigte sich im MS, der in der Placebo-Gruppe geringer war und in der Summe 20,8 Punkte (0,0-244,0) und im Durchschnitt 0,5 Punkte (0,0-5,4) betrug (siehe Abbildung 9).

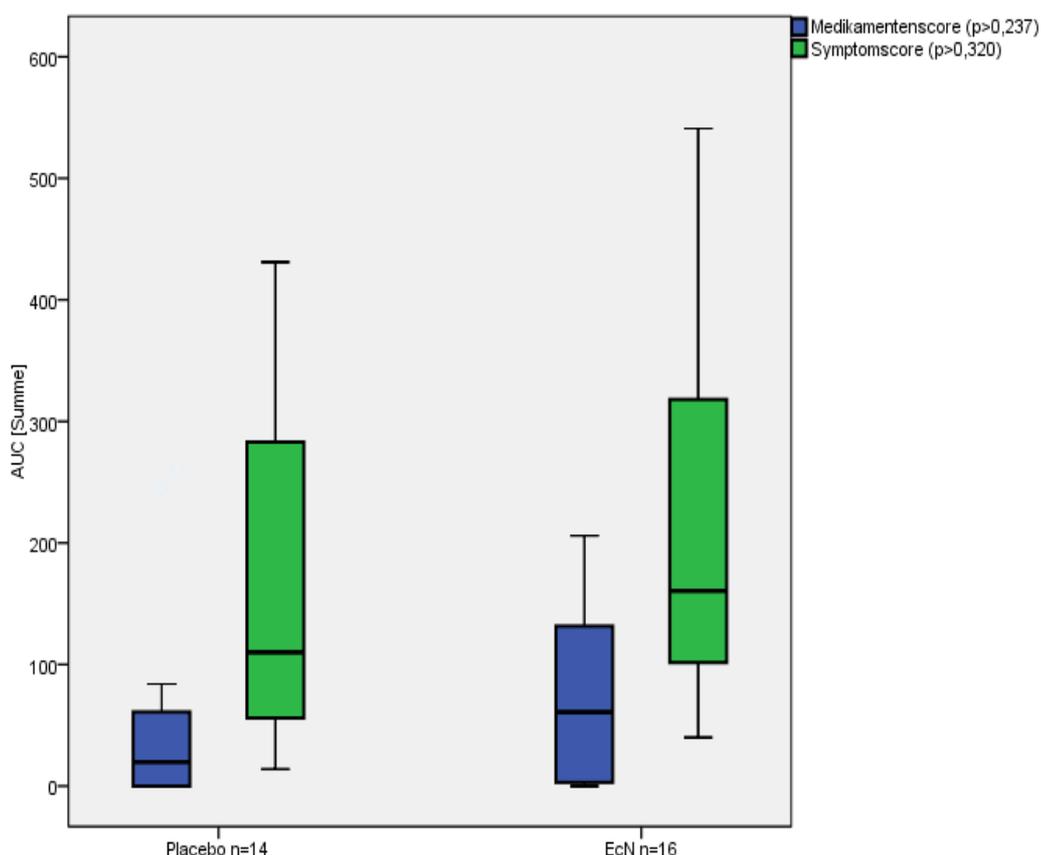


Abbildung 9 Boxplot-Darstellung der Medikamenten- und Symptom-Scores im Verlauf der Supplementierung, Patientenzahl insgesamt n=30.

4.3 Immunologische Parameter während der EcN-Behandlung

4.3.1 Klinische Parameter

Um mögliche Effekte der immunmodulierenden Wirkung der Substitution mit EcN darzustellen, wurden zu Beginn, im Verlauf und nach der Substitution wiederholt der Gräser-Prick-Test, der konjunktivale Provokationstest und die sIgE-Messung im Blut durchgeführt.

4.3.1.1 Haut-Prick-Test (SPT)

Die Gräser-Prick-Tests wurden zum Screening, zu allen Visiten und zum Follow-up Termin gemacht. In beiden Behandlungsgruppen waren die Ergebnisse gleich verteilt und es lässt sich ein zum Pollenflug passender Verlauf erkennen, wobei es kurz vor der Gräserpollensaison bei der dritten Visite ein Absinken der durchschnittlichen Quaddelgröße kommt (siehe Abbildung 10). In der EcN-Gruppe wurden zum Screening 16 Patienten geprickt, die eine mittlere Quaddelgröße von $7,50 \pm 0,52$ mm aufwiesen. Zur Visite zwei (14 Patienten) stieg der Wert auf $7,93 \pm 2,47$ mm und sank zur dritten Visite (15 Patienten) wieder ab auf $6,17 \pm 2,13$ mm. Visite vier (15 Patienten) fand während der Gräserpollensaison statt, sodass die durchschnittliche Quaddelgröße wieder auf $7,13 \pm 2,13$ mm und auf $7,50 \pm 3,71$ mm in der Abschlussvisite (16 Patienten) anstieg und somit den Screening-Wert erreichte. Bei dem Follow-up Termin (16 Patienten) sank die mittlere Quaddelgröße geringfügig auf $7,47 \pm 2,62$ mm ab. Die Prick-Test-Ergebnisse in der Placebo-Gruppe waren vergleichbar, wobei die ermittelten Werte, bis auf die in der vierten Visite, stets über denen der EcN-Gruppe lagen, wobei der Unterschied zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant war. Zum Screening lag die mittlere Quaddelgröße bei 14 geprickten Patienten $8,25 \pm 2,23$ mm und zur zweiten Visite (14 Patienten) $8,07 \pm 2,01$ mm. Auch hier sank kurz vor Start der Gräserpollensaison bei der dritten Visite (13 Patienten) der Wert auf $6,42 \pm 1,98$ mm. Zur vierten Visite (14 Patienten) stieg die durchschnittliche Quaddelgröße auf $6,57 \pm 1,73$ mm und zur Abschlussvisite (12 Patienten) auf $7,75 \pm 1,74$ mm. Beim Follow-up wurden 13 Patienten geprickt, die eine mittlere Quaddelgröße von $7,27 \pm 1,18$ mm hatten. So zeigte sich im SPT eine geringe Verringerung der Quaddelgröße bei der

dritten Visite und insgesamt eine geringfügige Verringerung in der letzten Visite im Vergleich zum Screening, doch konnte weder im Vorher-Nachher-Vergleich noch im Gruppen-Vergleich eine signifikante Änderung festgestellt werden (Abbildung 10).

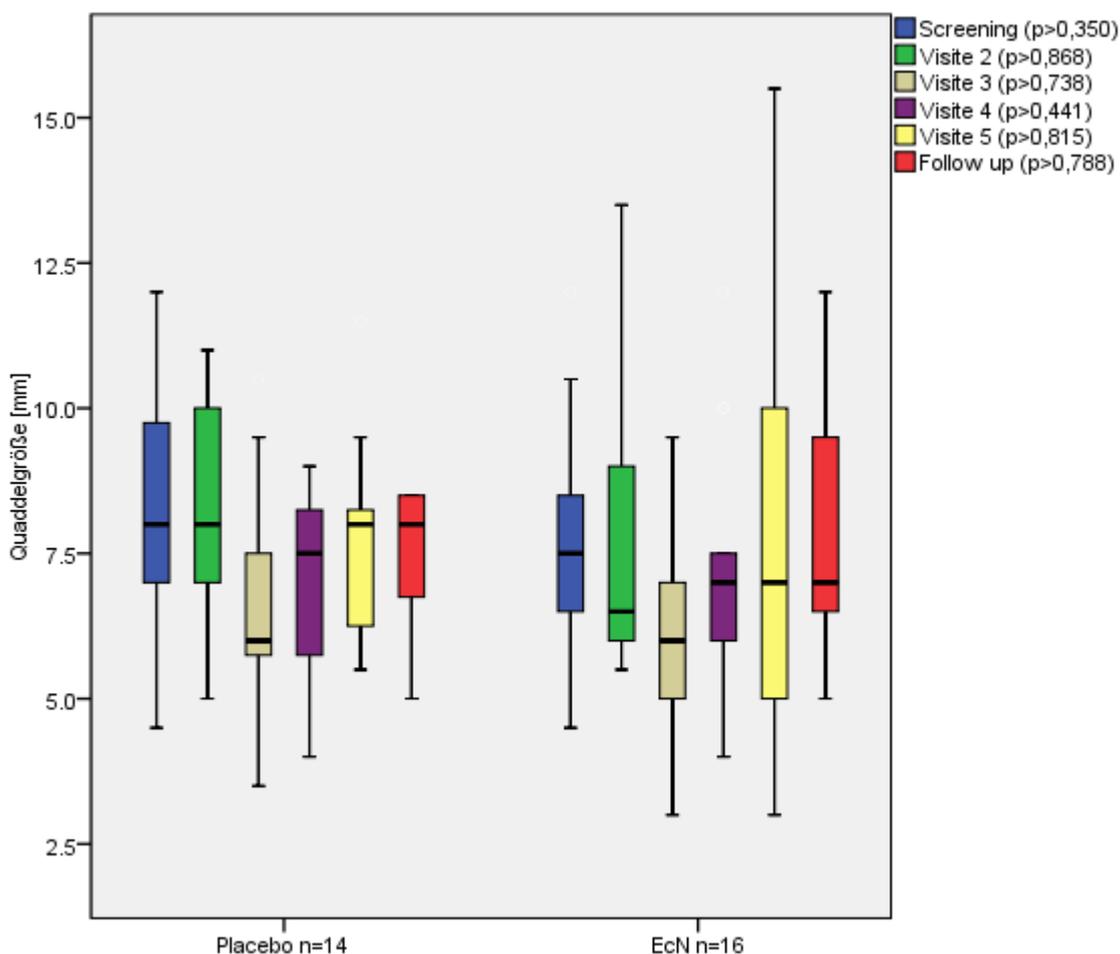


Abbildung 10 Boxplot-Darstellung der Ergebnisse des Haut-Prick-Test (SPT) im Verlauf der Supplementierung, Patientenzahl insgesamt n=30.

4.3.1.2 Konjunktivaler Provokationstest (KPT)

Ähnlich verhielt es sich auch im KPT, bei dem es weder zwischen den Behandlungsgruppen noch im Erstvisite-Abschlussvisite-Vergleich Unterschiede gab. In der ersten Visite zeigte sich in der EcN-Gruppe eine negative Reaktion sowie 13 positive Reaktionen. Bei zwei Patienten wurde der KPT nicht durchgeführt. Von den

Positivreaktionen waren 56,3% bereits bei der niedrigsten Konzentration (1:5), 18,8% bei mittlerer Konzentration (1:2) und 6,3% bei Höchstkonzentration (1:1) sichtbar positiv. In der Placebo-Gruppe gab es einen negativen KPT, elf positive Reaktion und zwei nicht durchgeführte Tests. Auch hier war die Hälfte mit 50% bereits bei der niedrigsten Konzentration positiv reaktiv. Weitere 21,4% reagierten positiv bei der mittleren Konzentration und 7,1% erst bei der Höchstkonzentration. In der Abschlussvisite zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier gab es in der EcN-Gruppe zwölf positive Reaktionen und viermal wurde der KPT nicht durchgeführt. Von den zwölf Positivreaktionen waren 68,8% bei niedrigster Konzentration und 6,3% bei Höchstkonzentration sichtbar. In der Placebo-Gruppe traten zehn positive Reaktionen auf und auch hier wurde der KPT viermal nicht durchgeführt. Von den zehn Positivreaktionen waren 50% bei niedrigster Konzentration, 14,3% bei mittlerer und 7,1% bei höchster Konzentration positiv. Im Vergleich zum Screening gab es tendenziell mehr Reaktionen bei den niedrigeren Konzentrationen, insbesondere in der EcN- Gruppe, wobei die Unterschiede zum Screening und zur Placebo-Gruppe nicht signifikant waren.

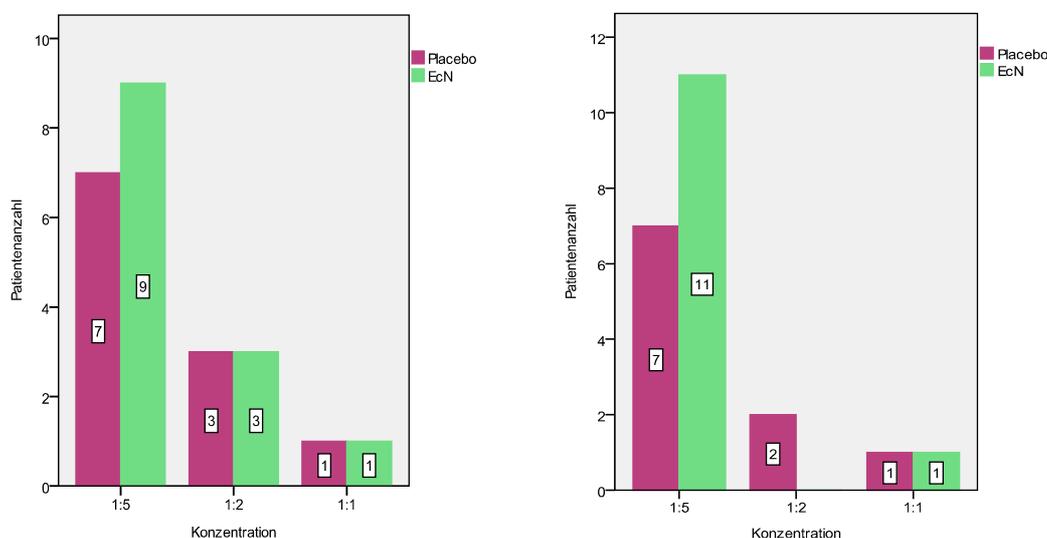


Abbildung 11 und 12 Nach Konzentrationen geordnete Darstellung der Patientenzahlen bei positiver Reaktion im durchgeführten KPT während der ersten (links) und fünften (rechts) Visite. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungskollektiven $p > 0,817$ in der ersten Visite (links) und $p > 0,500$ in der fünften Visite (rechts).

4.3.1.3 Spezifische IgE-Bestimmung im Serum

Anders als die klinischen Untersuchungen, zeigte sich bezüglich der sIgE-Werte bei der Abschlussvisite ein geringer nicht signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Während sich in der Placebo-Gruppe im Vergleich zum Screening ein sIgE-Wert von 17,8 kU/l (2,4-100,0) fand, der im Verlauf auf höhere Werte (24,1 kU/l (8,7-100,0)) anstieg, sank bzw. blieb der sIgE-Wert in der EcN-Gruppe gleich (vor: 14,6 kU/l (1,1-100,0) und nach: 14,2 kU/l (0,9-100,0)). Zu keinem Zeitpunkt gab es in einem der durchgeführten klinischen Untersuchungen und Tests signifikante Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

4.4 Globale klinische Wirkung und Beurteilung der EcN-Behandlung

Neben dem SMS als Hauptzielgröße und den immunologischen Untersuchungen wurde die Lebensqualität vor, während und nach der Behandlung beobachtet sowie die Angaben über symptomfreie und -schwache Tage ausgewertet und eine allgemeine Beurteilung durch die Patienten erhoben.

4.4.1 Lebensqualität

Neben den klinischen und immunologischen Parametern wurde die Lebensqualität während der Studie erfasst. Dafür wurden die einzelnen Items der Lebensqualitätsfragebögen ausgewertet und die Differenzen zu der jeweiligen vorherigen Visite gebildet. Die Auswertung erfolgte anhand der Vorgaben nach Elisabeth F. Juniper [44-47], sodass insgesamt sieben Gruppen gebildet wurden, wobei eine Änderung von -1/0/+1 Punkten eine sogenannte minimal klinisch wichtige Differenz (MCID) darstellt und somit noch keine signifikante Änderung bedeutet. Je größer die Änderung war, als desto klinisch bedeutsamer wurde diese dann eingestuft. Im Verlauf der Untersuchung war zwar ein allgemeiner phasenhafter Verlauf, passend zum Pollenflug, sichtbar, dennoch waren sowohl in beiden Behandlungsgruppen weder die absolute Punktzahl noch die Änderung zur vorhergehenden Visite so groß, dass von klinischer Relevanz oder signifikanten Änderung gesprochen werden kann. Insgesamt gab es in beiden Gruppen vornehmlich nur Änderungen, die der MCID zuzuordnen

waren. Es wurden also insgesamt eher geringe Werte erfasst, was für eine insgesamt gute Lebensqualität, auch während der Pollensaison, spricht. In der EcN-Gruppe lag der Median der RQLQ-Punkte in der ersten Visite bei 16 befragten Patienten bei 0,28 Punkten (0-2,37) und bei erneut 16 Befragten in der Abschlussvisite bei 0,34 Punkten (0-3,46), während die Placebo-Gruppe mit 0,88 Punkten (0-2,85) und 14 befragten Patienten in der Erstvisite leicht höher und in der fünften Visite mit 0,27 Punkten (0-1,60) von 13 Patienten etwas unter dem Wert der Erstvisite und dem Wert der EcN-Gruppe lag (siehe Abbildung 13).

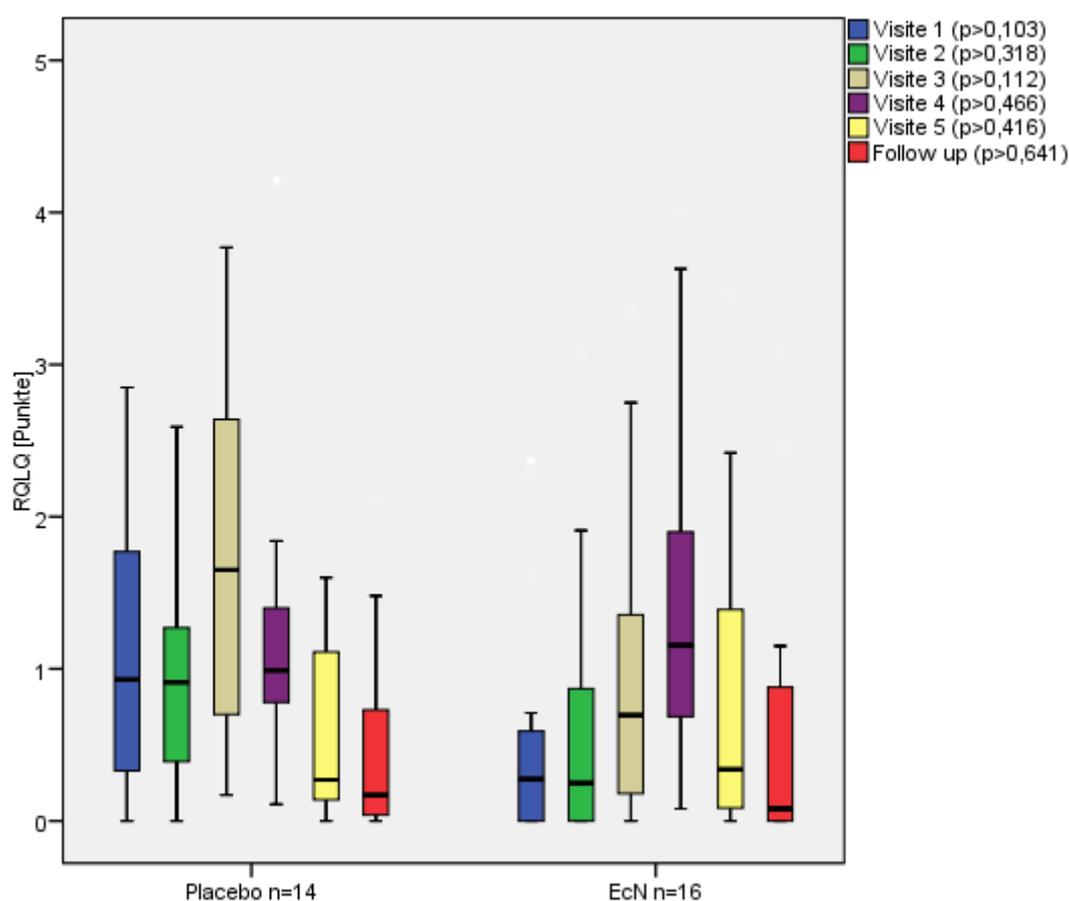


Abbildung 13 Boxplot-Darstellung der Lebensqualität vor und im Verlauf der Supplementierung, Angabe der medianen absoluten Punkte aus allen erhobenen Lebensqualitätsfragebögen, Patientenzahl insgesamt n=30.

4.4.2 Symptomfreie und –schwache Tage

Mit der Tagebuchdokumentation wurden auch die symptomfreien und -schwachen Tage ausgewertet. Hier zeigte sich ein größerer, aber nicht signifikanter Unterschied zwischen Placebo- und EcN-Gruppe. Während die EcN-Gruppe im Median 5,5 (0-40) symptomfreie bzw. -schwache Tage hatte, lag der Wert in der Placebo-Gruppe bei 17,5 (0-44) symptomfreien bzw. -schwachen Tagen.

4.4.3 Globale Bewertung der Gräserpollensaison 2009

Schließlich wurden die Patienten bei der Abschlussvisite befragt, ob und inwiefern sich die Stärke der Symptome zu vorherigen Saison geändert haben (siehe Abbildung 14). In der EcN-Gruppe haben 12,5% die behandelte Saison als viel besser, 37,5% als besser und ebenfalls 37,5% als gleich bewertet. Nur zwei Patienten haben die Saison als schlechter empfunden. In der Placebo-Gruppe zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei 28,57% die Saison als schlechter beurteilten. Des Weiteren bewerteten 14,29% der Placebo-Patienten die Saison als viel besser, 35,72% als besser und 14,29% als gleich.

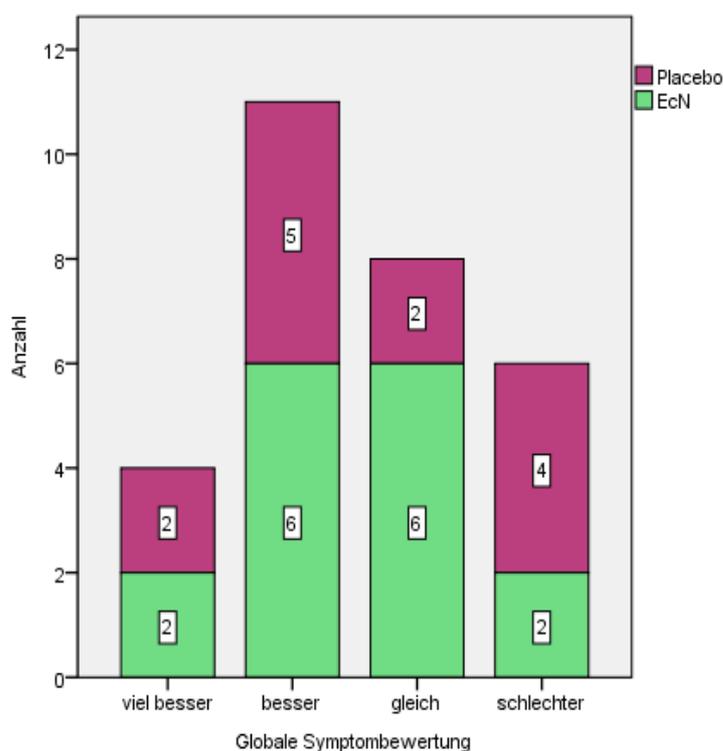


Abbildung 14 Globale Symptombewertung für die Pollensaison 2009 im Vergleich zur Pollensaison 2008

4.4.4 Retrospektiver Symptom-Score (rSS)

Um die Wirkung der EcN-Behandlung auf die Beschwerden in der Pollensaison im Verlauf zu zeigen, wurde zu Beginn der Untersuchung der rSS zur Gräserpollensaison 2008 erhoben. In der EcN-Gruppe lag dieser durchschnittlich bei $16,44 \pm 0,62$ Punkten und in der Placebo-Gruppe durchschnittlich bei $16,93 \pm 0,72$ Punkten. Nach der Behandlung wurde der rSS erneut für 2009 ermittelt. In der EcN-Gruppe ergab sich ein Wert von durchschnittlich $12,31 \pm 1,31$ Punkten und in der Placebo-Gruppe von $13,85 \pm 1,48$ Punkten. Die ermittelten Unterschiede waren nicht statistisch signifikant. Somit verringerte sich der Punktwert von 2008 zu 2009 in der EcN-Gruppe um 4,13 Punkte und in der Placebo-Gruppe um 3,08 Punkte.

4.5 Zusätzliche Parameter

Die möglichen Auswirkungen der EcN-Supplementierung auf den Gastrointestinaltrakt (GIT) und die Auswirkung des Gräserpollenfluges auf eine pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie (PaNa) wurden mittels der Visualskalen dokumentiert.

4.5.1 Gastrointestinale Visualskala

In der EcN-Gruppe lagen die im halben Jahr vor Behandlungsbeginn auftretenden GIT-Symptome bei 16 befragten Patienten im Median bei 0,45 cm (0,00-7,10) und in der Placebo-Gruppe (14 Patienten) bei 2,10 cm (0,00-5,40). Nach der behandelten Saison gab die EcN-Gruppe (16 Patienten) 1,40 cm (0,00-7,00) und die Placebo-Gruppe (13 Patienten) 2,60 cm (0,30-5,40) an. Die Vorher-Nachher-Unterschiede in den jeweiligen Gruppen sind statistisch nicht signifikant.

4.5.2 Pollenassoziierte Nahrungsmittelallergie Visualskala

In der EcN-Gruppe gaben vor EcN-Substitution fünf Patienten an, an einer pollenassoziierten Nahrungsmittelallergie (PaNa) zu leiden, wovon alle ganzjährig bei jedem Verzehr des entsprechenden Nahrungsmittels reagierten. Im Median gaben die betroffenen Patienten aus der EcN-Gruppe 2,80 cm (1,50-3,60) in der ersten Visite an und bei gleicher Anzahl verringerte sich der angegebene Wert auf 0,10 cm (0,00-0,50)

in der Abschlussvisite. In der Placebo-Gruppe gab es ebenfalls fünf Patienten mit einer anamnestisch bestehenden PaNa, von denen ein Patient nur in der Gräserpollensaison Symptome hatte. In der Erstvisite im Median gaben die Betroffenen aus der Placebo-Gruppe einen Wert von 6,90 cm (1,00-8,50) an. Bei der Abschlussvisite waren nur noch zwei betroffene Patienten in der Placebo-Gruppe vorhanden und gaben einen Wert von 3,90 cm (0,10-7,70) an.

4.6 Sicherheit

Die Patienten hatten regelmäßig Kontakt mit dem Studienteam, das sowohl in den Visiten als auch telefonisch bei Bedarf zur Verfügung stand. Es wurden insgesamt 162 (FAS) bzw. 144 (PP) unerwünschte Ereignisse dokumentiert, wovon 18,52% (FAS bezogen) möglicherweise mit der Studienmedikation zusammenhingen und in einem Fall ein sicherer Zusammenhang festgestellt wurde. Von den 144 unerwünschten Ereignissen traten 69 in der EcN-Gruppe und 75 in der Placebo-Gruppe auf. In der EcN-Gruppe gab es zehn unerwünschte Ereignisse, die bezüglich der Kausalität als „möglich“ eingestuft wurden. Ein Patient zog aufgrund von gastrointestinalen Beschwerden (stärkste Flatulenzen) seine Einverständniserklärung zur Teilnahme zurück. Nach der Entblindung ergab sich, dass dieser Proband EcN erhalten hatte. In der Placebo-Gruppe wurden 14 unerwünschte Ereignisse dokumentiert, die als „möglicher“ Zusammenhang zur Kapselgabe eingeschätzt wurden. Insgesamt waren alle unerwünschten Ereignisse von milder bis mittlerer Intensität und konnten mittels Abwarten oder medikamentös (zum Beispiel in Form von nicht verschreibungspflichtigem ASS oder Ibuprofen bei Kopfschmerzen) behoben werden bzw. besserten sich die Symptome innerhalb weniger Tage. Es gab keine durch die Studienmedikation bedingten schweren unerwünschten Ereignisse.

Tabelle 11 Allgemeine Übersicht aller stattgefunden unerwünschten Ereignisse (ITT, beide Behandlungsgruppen, gesamter Studienverlauf).

		ITT Gruppe Gesamt 34 Patienten	
Kategorie		F	N
Zusammenhang	Nein	132	9
	Möglich	29*	10
	Ja	1*	1
Gesamt		162	20
Intensität	Mild	96	28
	Moderat	65	25
	Schwer	1	1
Gesamt		162	54
Ausgang	Erholt	152	33
	Anhaltend	5	4
	Stabilisiert	4	4
	Patient starb	0	0
	Ungewiss	1	1
Gesamt		162	42
Intervention- Die Studienmedikation betreffend	Behandlung unverändert	158	33
	Einnahme verringert	0	0
	Dauerhaft unterbrochen	3	2
	Zeitweise unterbrochen	1	1
Gesamt		162	36
Intervention – Andere	Medikamentös	79	31
	Keine	83	4
	Sonstiges	0	0
Gesamt		162	35

F = Fallzahl der AEs, N = Anzahl der Patienten mit einem AE

* nur gastrointestinale AEs

5. Diskussion

5.1 Orale EcN-Substitution bei erwachsenen Patienten mit Gräserpollenallergie – ein Pilotprojekt

Die Ausgangshypothese der vorliegenden klinischen Untersuchung wurde aufgrund publizierter experimenteller in vitro-Arbeiten entwickelt, die kurz gefasst, auf einen Einfluss von EcN auf die Ausprägung der TH1/TH2-Antwort hinweisen [25, 48-52]. Jedoch wurde in der Literatur primär ein präventiver Effekt postuliert, während therapeutische Effekte eher nur angenommen wurden. Humanstudien beschäftigten sich bisher vor allem mit der EcN Gabe bei Schwangeren und Neugeborenen und die Ergebnisse waren teilweise widersprüchlich bzw. sehr variable [38-40; 48, 49]. In diesem Pilotprojekt wurde erstmals eine EcN-Supplementierung bei Erwachsenen im Rahmen einer symptomatischen Therapie der allergischen Rhinokonjunktivitis, in diesem Fall durch Gräserpollen induziert, durchgeführt und untersucht. Aufgrund der mangelnden Literatur bzw. nicht vorhandener Studien und Daten konnte die vorliegende Untersuchung sich nur bedingt an Vordaten und Methodik anderer Untersuchungen orientieren. Daher wurden zahlreiche Parameter ausgewählt, um eine klinische Wirkung der EcN-Gabe zu evaluieren. Der Hauptzielparameter stellte die AUC des SMS über einen vorher definierten Zeitraum von 45 Tagen dar. Die AUC zur Darstellung des Scores wurde bereits in früheren Studien, die klinische Effekte von Therapien bestimmen wollten, angewandt [53, 54]. Der Zeitraum von 45 Tagen wurde vor der Durchführung im Studienprotokoll festgelegt und in dem *Blind Data*-Treffen beibehalten. Grundlage hierfür ist, dass ein Zeitraum vor, in diesem Fall die gewählten 14 Tage, und ein Zeitraum nach dem höchsten Pollenflug, hier 31 Tage, betrachtet werden kann, um die Auswirkung der Pollensaison zu beurteilen. Hier ist anzumerken, dass in der relevanten Gräserpollensaison 2009 ein verhältnismäßig milder Pollenflug vorlag und, dass es einen zweiten Höchstwert im August, also außerhalb des bestimmten Zeitraums, gab. Des Weiteren war die Fallzahl mit 34 Patienten relativ gering, wobei dies zum einen so im Protokoll und rechnerisch festgelegt wurde. Zum anderen ergab sich diese geringe Zahl aufgrund der Tatsache, dass hier zunächst explorativ eine mögliche Wirkung der Behandlung festgestellt werden sollte, um gegebenenfalls ein

größeres Folgeprojekt zu starten. Dennoch bedingt diese Patientenzahl natürlich nur eine begrenzte Aussagefähigkeit der ermittelten Ergebnisse.

Bei der allgemeinen Planung des Studienablaufs bleiben noch einige weitere Faktoren zu diskutieren. Die beiden sehr unterschiedlichen Pollensaisons (2008 stärkerer, 2009 milderer Pollenflug) führten wahrscheinlich dazu, dass bestimmte Parameter in beiden Behandlungsgruppen verbesserte Ergebnisse erzielten. Die Erhebung und Auswertung der Lebensqualität erfolgte anhand des Mini-RQLQ für allergische Rhinokonjunktivitis nach Juniper und zeigte für 2009 eine geringere Reduktion der Lebensqualität. Der retrospektive Symptom-Score war in der untersuchten Saison 2009 geringer als in der Saison zuvor. Auch die globale Evaluation der Untersuchung zeigt, dass die allgemeine Einschätzung der allergischen Beschwerden als vornehmlich verbessert eingestuft wurde. Im Gegensatz dazu zeigten andere Parameter wie der SPT im Vorher-Nachher-Vergleich keine Verbesserungen, was für beide Behandlungsgruppen gilt. Der SPT sowie die Blutentnahmen und der KPT erfolgten nach den klinischen Standards der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité Berlin, wobei der SPT nach den Empfehlungen von GA²LEN [43] stattfand. Hier kann diskutiert werden, ob ein längerer Beobachtungszeitraum, zum Beispiel zwei Jahre und somit zwei Pollensaisons verbesserte Ergebnisse erzielt hätte. Dass die Behandlungsdauer einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit haben kann, zeigen zum Beispiel Studien mit spezifischer Immuntherapie. Während die SCIT bereits nach zweimonatiger Anwendung wirksam ist, erfordert die Behandlung mittels der SLIT mehr Zeit, um klinisch wirksam zu werden. Auch wenn EcN bereits nach acht Wochen Therapie im Stuhl nachweisbar sind und mit relativ kurzen Behandlungszeiträumen Erfolge in der Therapie bei entzündlichen Darmerkrankungen beobachtet wurden, so könnte für den erwünschten immunmodulatorischen Effekt eine längere Therapiedauer nötig sein. Ein weiterer Faktor für eine möglicherweise erforderliche prolongierte Behandlungsdauer ist der Wirkungsort. Während bei Darmerkrankungen die EcN-Behandlung direkt am Ort der Erkrankung ansetzt, sind für die Wirkungen bei der allergischen Rhinokonjunktivitis nicht nur die erfolgreiche Kolonisation der EcN im Darm wichtig, sondern auch die erfolgreiche Immunmodulation der dendritischen Zellen und der Signalfluss über die

TLR4-Wege, sowie schließlich die erfolgreiche Reduktion der eosinophilen Reaktionen in den Atemwegen.

Weitere Punkte, die der Diskussion bedürfen, bestehen bei einigen der ermittelten Ergebnisse, die im Folgenden erläutert werden.

5.2 Immunmodulatorische Kompetenz von EcN in der Klinik

In der vorliegenden Untersuchung wurde klinisch die immunmodulatorische Wirksamkeit von EcN bei Patienten mit einer allergischen Rhinokonjunktivitis evaluiert. Bis auf drei Langzeitstudien von Lodinová-Zádníková et al. [38-40] existieren zur praktischen Anwendung von EcN als Therapeutikum oder als präventive Behandlung einer bestehenden allergischen Rhinokonjunktivitis nur wenige Studien, die ausschließlich Neugeborene und den Verlauf nach EcN- und Kontrollbehandlung betrachten. In dieser Pilotstudie wurden bereits sensibilisierte bzw. klinisch relevant erkrankte Patienten, bezüglich der Wirkung einer kontinuierlichen EcN-Gabe zwei Monate vor und während der Pollenflugsaison untersucht. Grundlage für die erwartete Modulation der Immunantwort waren publizierte in vitro- und Tierstudien, die den Einfluss von EcN und anderen *E. coli* Stämmen auf das Immunsystem bereits gezeigt haben. So konnten Gerhold et al. [50, 55-57] durch eine LPS-Gabe bei sensibilisierten Mäusen eine Verschiebung Richtung TH1-Zytokin-Produktion vor allem bezüglich des IL-10 zeigen. In vitro-Studien, die mit peripheren Blutzellen (PBMC) arbeiteten, konnten einen Zusammenhang zwischen *E. coli* und TNF- α -Stimulation [50] sowie zwischen LPS und einer TH2-Zytokin IL-4 und IL-5 Inhibition nachweisen [51, 58]. Helwig et al. [59] konnten einen Zusammenhang zwischen der *E. coli* Konzentration und der dadurch induzierten Zytokinkonzentration darstellen. Hohe *E. coli* Konzentrationen induzieren eine hohe TNF- α aber eine geringe IL-10 Produktion im Vergleich zu Probiotika. Simon et al. [51] untersuchten die LPS-Wirkung auf PBMC-Zellen von Menschen mit atopischer Dermatitis und konnten hier ebenfalls eine Inhibition der TH2-Zytokinproduktion feststellen. Unterstützt wurden diese Beobachtungen durch Ergebnisse von Rasche et al. [52], die in vitro nach Stimulation peripherer T-Zellen in Gegenwart von *E. coli* eine verstärkte TH1-Antwort und eine verminderte TH2-Antwort zeigen konnten, die sich in einer erhöhten IFN- γ und einer erniedrigten IL-4 Produktion

ausdrückte. Diese Effekte waren auch in Anwesenheit von Allergenen bei gleichzeitiger *E. coli* Stimulation messbar. Adam et al. [25] haben im Mausversuch ebenfalls eine EcN induzierte IL-10 und IL-12 Produktion sowie eine Aktivierung der dendritischen Zellen (DC) über den TLR4-Signalweg festgestellt. Dementsprechend wurde geschlossen, dass die immunmodulatorische Wirkung von EcN über den TLR4-Weg vermittelt wird. Diese Ergebnisse erlauben zusammenfassend die Vermutung, dass auch bereits erkrankte Allergiker möglicherweise einen Nutzen von einer EcN-Supplementierung haben könnten, in dem die, durch die Allergene stimulierte TH2-Antwort reduziert und die TH1-Zytokin-Produktion herauf reguliert wird. In der vorliegenden Studie wurden erwachsene Patienten betrachtet, die anamnestisch seit mindestens zwei Jahren an einer Gräserpollenallergie leiden und bei denen eine korrespondierende Gräserpollensensibilisierung mittels der sIgE-Messung CAP-Klasse 2 gegenüber Lieschgras nachgewiesen werden konnten. In diesem betrachteten Untersuchungskollektiv konnte in der EcN-Gruppe keine statistisch signifikante klinische Wirkung gegenüber der Placebo-Gruppe beobachtet werden. In allen klinischen Tests wie dem SPT und dem KPT sowie den (s)IgE-Werten, aber auch in dem erhobenen SMS und den Lebensqualitätsfragebögen konnte die EcN-Gabe keine Überlegenheit erzielen. Dass die untersuchte EcN-Gruppe gegenüber der Vergleichsgruppe nicht überlegen war, kann auf verschiedenen Faktoren beruhen. Zum einen sollten die Behandlungsgruppen insbesondere in Hinblick auf Geschlechterverteilung und dem Sensibilisierungsstatus (mono- und polysensibilisiert) sowie studienbedingter Faktoren wie den Substitutionszeitraum und –dosis diskutiert werden. Die Behandlungsgruppen waren bezüglich ihrer Altersverteilung und den klinischen Ausgangsparametern wie SPT, sIgE und rSS im Wesentlichen miteinander vergleichbar. Ein größerer Unterschied ergab sich bezüglich der Geschlechterverteilung. Der Frauenanteil war in beiden Gruppen höher als der Männeranteil, aber in der EcN-Gruppe waren mit 70 % nochmals mehr Frauen als in der Placebo-Gruppe mit 57,1 %. Hier kann diskutiert werden, ob Frauen die Symptome der Allergie stärker wahrnehmen und auch eher zur helfenden Medikation greifen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die weiblichen Geschlechtshormone ein TH2-Zytokin-Profil begünstigen [60]. Beispielhaft wurden die symptomschwachen und –freien Tage sowie die globale Gräserpollensaison Bewertung

mit dem Geschlecht in beiden Gruppen korreliert. Es ergaben sich keine Korrelationen, im Sinne einer negativeren Bewertung oder weniger symptomfreien oder –schwachen Tagen bei Frauen. Aufgrund der relativ hohen Werte im SMS zu Beginn der Gräserpollenflugsaison, die beide Behandlungsgruppen aufwiesen, wobei die EcN-Gruppe geringfügig über der Placebo-Gruppe lag, wurden nochmals die verschiedenen Sensibilisierungen in Form von klinisch anamnestischen Angaben als auch dem SPT betrachtet und evaluiert. Hier wurde berücksichtigt inwiefern sich weitere Pollenallergien auf den erhobenen SMS auswirken. Dabei konnte gezeigt werden, dass zwar 37,5 % in der EcN-Gruppe und 78,6 % in der Placebo-Gruppe auch an einer Birkenpollen- oder Frühblüherallergie litten, was die höheren Scores und auch die RQLQ-Werte zu Beginn der Untersuchung erklärt. Dennoch konnte keine signifikante Korrelation von Gräserpollen-Monosensibilisierung und geringeren Beschwerden, bessere globale Bewertung und weniger symptomfreien und –schwachen Tagen festgestellt werden. Um die beobachteten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zu bewerten, wurden die einzelnen Werte sämtlicher Parameter nochmals genauer betrachtet. Es fällt auf, dass die EcN-Gruppe bezüglich der meisten Untersuchungsparameter der Placebo-Gruppe gering überlegen war. Da jedoch keine der Untersuchungen einen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen aufzeigen konnte, stellte sich nun noch die Frage, warum die EcN-Gabe zu keiner klinisch messbaren Verbesserung der allergischen Symptome führte. Die EcN-Substitution erfolgte nach einem bewährten Behandlungsschema, das garantieren sollte, dass zum Start des Gräserpollenflugs eine ausreichende Darmkolonisation erfolgt ist. In vitro-Studien haben jedoch bereits eine dosisabhängige Wirkung auf die TH1/TH2-Balance festgestellt, wobei bei ausreichender Menge an LPS bzw. EcN ein TH1-Shift möglich war, bei zu hohen Dosen jedoch eine Verstärkung der allergischen Immunantwort messbar wurde [25, 35]. Somit kann hier vermutet werden, dass die Menge an lebensfähigen E. coli Bakterien in den verabreichten Kapseln zwar ausreichte, um lokal zu wirken, aber möglicherweise zu gering war, um eine systemische TH1-Verschiebung zu induzieren. Des Weiteren wurde genau zu dem Zeitpunkt mit der Einnahme begonnen, in dem bereits ein Großteil der Patienten Symptome aufgrund von weiteren Allergien (s.o.) entwickelte. Auch andere Therapieverfahren wie zum Beispiel die subkutane

Immuntherapie (SIT) werden vorzugsweise im Herbst, also in einem möglichst allergenarmen Zeitraum begonnen, sodass hier nahe liegt, dass eine Erstsustitution während Allergenkarenz möglicherweise verbesserte Ergebnisse hätte erzielen können. Insgesamt konnte die vorliegende Untersuchung keinen klinisch messbaren immunmodulatorischen Effekt mit einer oralen EcN-Behandlung bei Gräserpollenallergikern aufzeigen.

5.3 EcN als immunmodulatorisches Therapeutikum

Aufgrund der erzielten Ergebnisse ist die EcN-Substitution zur Behandlung der saisonalen allergischen Rhinokonjunktivitis nicht geeignet. Auch Flinterman et al. [49] konnten mit einer Probiotika Substitution in vivo keinen therapeutischen Effekt bei - allerdings hier Nahrungsmittelallergie - finden. Die Annahme, dass möglicherweise keine ausreichende effektive Dosis mit der verabreichten Menge an EcN erreicht wurde, wird unwahrscheinlicher, wenn man die aufgetretenen unerwünschten Ereignisse betrachtet, da einige Patienten aus der EcN-Gruppe durchaus Nebenwirkungen, die einer erfolgreichen Kolonisierung entsprachen, wie zum Beispiel milde Diarrhoe und Flatulenz, zeigten. Dies gibt letztlich aber keine Gewissheit darüber, wie viel EcN unter Substitution sich im Darm angesiedelt hat, um dann einen Einfluss auf die allergische Immunantwort zu nehmen. Hier wären beispielsweise Stuhlproben hilfreich gewesen, mit denen die erfolgreiche EcN-Besiedlung über eine spezifische PCR nachgewiesen werden kann. Um neben den klinischen Wirkungen eine mögliche systemische immunmodulierende Wirkung zu zeigen, wurden parallel Blutproben im Verlauf der Untersuchung regelmäßig abgenommen, um die allergenspezifische Aktivierung von Basophilen und die allergenspezifische periphere T-Zell-Antwort im Labor zu untersuchen. (Daten wurden nicht von der Promovierenden erhoben, daher nicht im Ergebnisteil dargestellt.) Hierbei wurde zu vier Zeitpunkten ein Basophilen-Aktivierungstest (BAT) durchgeführt, bei dem die Basophilen-Aktivierung nach Stimulation mit Gräserallergenen mittels CD203c-Marker und Durchflusszytometrie gemessen wurde. Hier war auffällig, dass in dem ersten BAT in beiden Gruppen durchgängig hohe Ausgangswerte gemessen wurden. Im Verlauf waren die Basophilenaktivierungswerte

in beiden Gruppen vermindert. Damit zeigte der BAT im Verlauf verbesserte Werte, dies jedoch in beiden Gruppen ohne signifikanten Unterschied. Zusätzlich wurde die T-Zell-Aktivierung und die Zytokin-Produktion zu den gleichen Zeitpunkten wie der BAT bestimmt. Für die T-Zell-Aktivierung wurde CD154 (CD40-Ligand) als Marker verwendet und die Zytokine IL-4, IL-10 und IFN- γ gemessen. Mittels der Messung verschiedener Zytokine sollte die TH1- und TH2-Aktivierung und ein möglicher EcN-vermittelter TH-Zell-Shift gezeigt werden. Auch in dieser Untersuchung konnten keine Unterschiede in den Gruppen und keine TH1-TH2-Zell-Verschiebung gezeigt werden. Damit wird deutlich, dass die klinischen Beobachtungen mit den Immunparametern übereinstimmen und die EcN-Behandlung in dieser Untersuchung zu keinem systemischen immunmodulierenden Effekt führte. Des Weiteren haben Bickert et al. [61] im Mausversuch zeigen können, dass EcN zwar eine allergische Immunantwort reduzieren können, wenn sie zum Zeitpunkt der TH2- Reifung anwesend sind, aber keinen Effekt auf diese Antwort haben, wenn EcN oral sensibilisierten Tieren gegeben wurde. Auch hier wird deutlich, dass der präventive Effekt durchaus klinisch messbar sein kann, aber auch, dass EcN wahrscheinlich eher präventiv als therapeutisch wirksam ist. Auch wenn ein Großteil der Ergebnisse keine signifikante Verbesserung gegenüber der Placebo-Gruppe erbrachte, lässt sich zumindest bezüglich der Zusatzparameter, d.h. den erhobenen Visualskalen, die den Schweregrad der pollenassoziierten Nahrungsmittelallergien (PaNa) abbilden sollten, eine deutliche Verbesserung in der EcN-Gruppe erkennen. Somit könnte man zumindest die Vermutung anstellen, dass eine EcN-Gabe zwar keine Besserung bei polleninduzierter allergischer Rhinokonjunktivitis bringt, aber möglicherweise bei einer Nahrungsmittelallergie ein noch zu untersuchendes Potential besitzt. Unterstützt wird diese Theorie durch Arbeiten wie von Savilahti et al. [62], die eine Probiotika vermittelte Wirkung auf Nahrungsmittelallergien feststellen konnten. Jedoch waren die Ergebnisse teilweise sehr variabel und in weiteren Untersuchungen wie bei Flinterman et al. [49] konnte eine Wirkung nur in vitro, aber nicht in vivo gefunden werden. Aufgrund der erhobenen Ergebnisse sowie der aktuellen Literatur, die nach wie vor begrenzt ist, scheint EcN als Therapeutikum einer Typ1-Allergie wahrscheinlich nicht geeignet zu sein. Ferner legt diese Untersuchung nahe, dass EcN als adjuvantes Therapeutikum

auch in Kombination mit der medikamentösen Therapie einer allergischen Rhinokonjunktivitis nicht wirksam ist.

5.4 Ausblick - EcN Grenzen und Möglichkeiten

Die vorliegende klinische Untersuchung zeigt die Möglichkeiten und Grenzen einer EcN-Behandlung im Rahmen der Therapie der allergischen Rhinokonjunktivitis. Trotz positiver in vitro und experimenteller Ergebnisse kann die EcN-Substitution in der klinischen Anwendung bei Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis im Rahmen einer additiven Therapie keine Verbesserung der Symptomatik erreichen. Dennoch sollte eine probiotisch orientierte, adjuvante Therapie mittels EcN nicht komplett verworfen werden. Zum einen wäre es sinnvoll, ähnliche klinische Studien durchzuführen, die die aufgezeigten möglichen beeinflussenden Faktoren ausschließen, d.h. also zum Beispiel eine Substitution in der pollenfreien Saison begonnen wird und die Einnahme über einen längeren Zeitraum erfolgt. Da der größte Teil der Studien einen deutlich präventiven Effekt zeigen konnten, sollte hier zukünftig der Schwerpunkt klinischer Untersuchungen liegen.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Die allergische Rhinokonjunktivitis ist eine sehr häufige Erkrankung. Daten früherer experimenteller Studien lassen einen therapeutischen Nutzen von E. coli Nissle 1917 zur Behandlung der allergischen Rhinokonjunktivitis vermuten.

Ziel: Ziel der vorliegenden klinischen Untersuchung war, die Wirksamkeit und Verträglichkeit einer E. coli Nissle 1917 Behandlung klinisch zu evaluieren und die Frage zu klären, ob eine orale Substitution bei Gräserpollenallergikern einen klinisch messbaren Effekt als Zeichen einer systemischen Immunmodulation hervorruft.

Methoden: Die vorliegende Arbeit ist eine klinische, monozentrische, doppelblinde, Placebo-kontrollierte und explorative Pilotstudie. Die Patienten wurden nach definierten Ein- und Ausschlusskriterien rekrutiert und über 6 Monate behandelt. Es wurden verschiedene klinische und immunologische Parameter bestimmt.

Ergebnisse: 34 Patienten wurden eingeschlossen und 30 vollständig behandelt. Keine der ermittelten Ergebnisse konnte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen aufweisen. Der Symptom-Medikamenten-Score konnte als Hauptzielparameter der vorliegenden Untersuchung ebenfalls keine statistisch signifikante Überlegenheit einer EcN-Therapie gegenüber der Placebo-Gabe aufzeigen.

Schlussfolgerung: Es wurden keine klinischen oder systemisch immunmodulatorischen Effekte der E. coli Nissle 1917 Behandlung bei Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis im Vergleich zum Placebo festgestellt. Somit zeigen die Daten, dass die orale Supplementierung von E. coli Nissle 1917 nicht zur adjuvanten Behandlung der allergischen Rhinokonjunktivitis geeignet ist. Weitere Forschungsarbeiten sollten vor allem die Bedeutung von E. coli Nissle 1917 zur Prävention allergischer Erkrankungen prüfen.

7. Abkürzungsverzeichnis

AE	Adverse Event
AR	Allergische Rhinokonjunktivitis
ARIA	Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma
AUC	Area Under the Curve
BAT	Basophilen-Aktivierungstest
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BMDC	Bone Marrow derived Dendritic Cells
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRF	Case Report Form
CU	Colitis Ulcerosa
DC	Dendritische Zelle
E. coli	Escherichia coli
EcN	Escherichia coli Nissle 1917 (Mutaflor®)
EMA	European Medicines Agency
FAS	Full Analysis Set
FEV1	Forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
GINA	Globale Initiative für Asthma
H1-Blocker	Histaminblocker
Ig	Immunglobulin
IIT	Investigator Initiated Trial
INF	Interferon
IL	Interleukin
KKS	Koordinationszentrum für Klinische Studien
KPT	Konjunktivaler Provokationstest
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin

LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leukotriene
MCID	Minimal clinic important difference
MHCII	Major Histocompatibility Complex II
MS	Medikamenten-Score
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKC	Proteinkinase C
PP	Per Protocol
RQLQ	Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire
rSS	Retrospektiver Symptom-Score
SCIT	Spezifische Cutane Immuntherapie
slgE	Spezifisches Immunglobulin E
SIT	Spezifische Immuntherapie
SLIT	Spezifische Linguale Immuntherapie
SMS	Symptom-Medikamenten-Score
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SPT	Skin Prick Test
SRS-A	Slow reacting substance-A
SS	Symptom-Score
TH	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
WAO	World Allergy Organization
ZO-2	Zonula occludens 2

8. Literaturverzeichnis

- 1 Löffler G, Petrides P. Allergien. In: Biochemie und Pathobiochemie, Siebte, korrigierte Auflage, Springer Verlag, Heidelberg 2003;1155-1156
- 2 Schlaud M, Atzpodien K, Thierfelder W. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2007 May-Jun;50(5-6):701-10.
- 3 Ait-Khaled N, Pearce N, Anderson HR, Ellwood P, Montefort S, Shah J; ISAAC Phase Three Study Group Global map of the prevalence of symptoms of rhinoconjunctivitis in children: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three. Allergy. 2009 Jan;64(1):123-48.
- 4 Mortz CG, Lauritsen JM, Andersen KE, Bindslev-Jensen C. Acta Derm Venereol. 2003;83(3):194-201.
- 5 Broide The pathophysiology of allergic rhinoconjunctivitis. Allergy Asthma Proc. 2007 Jul-Aug;28(4):398-403.
- 6 Mc Hugh MK, Symanski E, Pompeii LA, Delclos GL. Prevalence of asthma among adult females and males in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 2001-2004. J Asthma. 2009 Oct;46(8):759-66.
- 7 Passalacqua G, Durham SR; Global Allergy and Asthma European Network. Allergic rhinitis and its impact on asthma update: allergen immunotherapy. J Allergy Clin Immunol. 2007 Apr;119(4):881-91.
- 8 Valero A, Ferrer M, Sastre J et al. A new criterion by which to discriminate between patients with moderate allergic rhinitis and patients with severe allergic rhinitis based on the Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma severity items. J Allergy Clin Immunol. 2007 Aug;120(2):359-65.
- 9 Antonicelli L, Micucci C, Voltolini S et al. Relationship between ARIA classification and drug treatment in allergic rhinitis and asthma. Allergy. 2007 Sep;62(9):1064-70.
- 10 Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N; Aria Workshop Group; World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma. J Allergy Clin Immunol. 2001 Nov;108(5 Suppl):S147-334.
- 11 Cingi C, Kayabasoglu G, Nacar A. Update on the medical treatment of allergic rhinitis. Inflamm Allergy Drug Targets. 2009 Jun;8(2):96-103.
- 12 Rosenwasser LJ Treatment of allergic rhinitis. m J Med. 2002 Dec 16;113 Suppl 9A:17S-24S.

- 13 Price D, Bond C, Bouchard J et al. International Primary Care Respiratory Group (IPCRG) Guidelines: Management of allergic rhinitis, *Prim Care Respir J*. 2006 Feb;15(1):58-70. Epub 2005 Dec 27.
- 14 Canonica GW, Baena-Cagnani CE, Bousquet J, Bousquet PJ, Lockey RF, Malling HJ, et al. Recommendations for standardization of clinical trials with Allergen Specific Immunotherapy for respiratory allergy. A statement of a World Allergy Organization (WAO) taskforce. *Allergy* 2007;62:317-24.
- 15 Niggemann B, Jacobsen L, Dreborg S et al. PAT Investigator Group. Five-year follow-up on the PAT study: specific immunotherapy and long-term prevention of asthma in children. *Allergy* 2006 Jul;61(7):855-9.
- 16 Mahr TA. Therapy in allergic rhinoconjunctivitis: new horizons. *Allergy Asthma Proc*. 2007 Jul-Aug;28(4):404-9. Review.
- 17 Canonica GW, Bousquet J, Mullol J, Scadding GK, Virchow JC. A survey of the burden of allergic rhinitis in Europe. *Allergy*. 2007;62 Suppl 85:17-25.
- 18 Hecker M, Spezifische und generelle Stressantwort von *Escherichia coli* und anderen Bakterien. In: Alfred-Nissle-Gesellschaft, Hrsg. Symposiumband zum 3. Interdisziplinären Symposium "Darmflora in Symbiose und Pathogenität". Ökologische, physiologische und therapeutische Aspekte von *Escherichia coli*, Ansbach, 28.-29. Nov. 1997, Hagen, 1998:29-35
- 19 Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004;53(11):1617-23.
- 20 Grozdanov L, Raasch C, Schulze J et al. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol*. 2004;186:5432-41.
- 21 Grozdanov L, Zähringer U, Blum-Oehler G et al. A single nucleotide exchange in the wzy gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol*. 2002 Nov;184(21):5912-25.
- 22 Blum G, Marre R, Hacker J. Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6. *Infection*. 1995 Jul-Aug;23(4):234-6.
- 23 Blum-Oehler G, Grozdanov L, Dobrindt U et al. Das gläserne Bakterium: Mikrobielle Genomanalyse. In: Alfred-Nissle-Gesellschaft, Hrsg. "Symposiumsband zum 4. Interdisziplinären Symposium "Darmflora in Symbiose und Pathogenität". Mikrobiologische Grundlagen und klinische Anwendung von *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917, Berlin, 10.-11. Nov. 2000. Hagen, 2001:23-31.

- 24 Do VT, Baird BG, Kockler DR. Probiotics for maintaining remission of ulcerative colitis in adults. *Ann Pharmacother*. 2010 Mar;44(3):565-71. Epub 2010 Feb 2.
- 25 Adam E, Delbrassine L, Bouillot C et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 activates DC and prevents house dust mite allergy through a TLR4-dependent pathway. *Eur J Immunol*. 2010 Jul;40(7):1995-2005.
- 26 Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet*. 1999 Aug 21;354(9179):635-9.
- 27 Schutz E. The treatment of intestinal diseases with Mutaflor. A multicenter retrospective study. *Fortschr Med*. 1989;107(28):599-602.
- 28 Boudeau J, Glasser AL, Julien S, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003 Jul 1;18(1):45-56.
- 29 Möllenbrink M, Bruckschen E. Treatment of chronic constipation with physiologic *Escherichia coli* bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the *E. coli* Nissle 1917 strain (Mutaflor). *Med Klin (Munich)*. 1994 Nov 15;89(11):587-93.
- 30 Fric P, Zavoral M. The effect of non-pathogenic *Escherichia coli* in symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003;15(3):313-5.
- 31 Plassmann D, Schulte-Witte H. Treatment of irritable bowel syndrome with *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN): a retrospective survey. *Med Klin (Munich)*. 2007 Nov 15;102(11):888-92.
- 32 Zyrek AA, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U, Schmidt MA. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol*. 2007 Mar;9(3):804-16. Epub 2006 Nov 3.
- 33 Schulze J, Sonnenborn U, Oelschlaeger T, Kruis W. Probiotika-Mikroökologie, Mikrobiologie, Qualität, Sicherheit und gesundheitliche Effekte. Sonderausgabe, Stuttgart 2008;90-93,135-137.
- 34 Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:379-92.
- 35 Kim YK, Oh SY, Jeon SG et al. Airway exposure levels of lipopolysaccharide determine type 1 versus type 2 experimental asthma. *J Immunol* 2007;178:5375-82.
- 36 Mercenier A, Pavan S, Pot B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr Pharm Des*. 2003;9(2):175-91.

- 36 Zoumpopoulou G, Tsakalidou E, Dewulf J, Pot B, Grangette C. Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model. *Int J Food Microbiol*. 2009 Apr 30;131(1):40-51. Epub 2009 Mar 4.
- 37 Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF, Fellermann K. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun*. 2007 May;75(5):2399-407. Epub 2007 Feb 5.
- 38 Lodinova-Zadnikova R, Korych B, Gajdostikova K. Local and systemic antibody response in infants after oral administration of inactivated enteropathogenic *E. coli* serotype O111 and O55. *Folia Microbiol (Praha)* 1990;35:155-62.
- 39 Cukrowska B, Lodinova-Zadnikova R, Enders C, Sonnenborn U, Schulze J, Tlaskalova-Hogenova H. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scand J Immunol* 2002;55:204-9.
- 40 Lodinova-Zadnikova R, Cukrowska B, Tlaskalova-Hogenova H. Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years). *Int Arch Allergy Immunol* 2003;131:209-11.
- 41 Schulze J, Schiemann M, Sonnenborn U. In: 120 Jahre *E. Coli* - Bedeutung in Forschung und Medizin. Alfred-Nissle-Gesellschaft e.V., Hagen, 2006;13-18,32-50
- 42 European Medicines Agency. Guideline on the clinical development of products for specific immunotherapy for the treatment of allergic diseases: Committee for medicinal products for human use (CHMP), London, November 20, 2008, at http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003605.pdf
- 43 Heinzerling L, Frew AJ, Bindslev-Jensen C et al. Standard skin prick testing and sensitization to inhalant allergens across Europe - a survey from the GALEN network. *Allergy* 2005;60:1287-300.
- 44 Juniper EF, Thompson AK, Ferrie PJ, Roberts JN. Development and validation of the mini Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire. *Clin Exp Allergy*. 2000 Jan;30(1):132-40.
- 45 Juniper EF, Thompson AK, Ferrie PJ, Roberts JN. Validation of the standardized version of the Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Aug;104(2 Pt 1):364-9.
- 46 Juniper EF, Guyatt GH, Griffith LE, Ferrie PJ. Interpretation of rhinoconjunctivitis quality of life questionnaire data. *J Allergy Clin Immunol*. 1996 Oct;98(4):843-5.

- 47 Juniper EF, Guyatt GH, Streiner DL, King DR. Clinical impact versus factor analysis for quality of life questionnaire construction. *J Clin Epidemiol.* 1997 Mar;50(3):233-8.
- 48 Dotterud CK, Storrø O, Johnsen R, Oien T. Probiotics in pregnant women to prevent allergic disease: a randomised, double-blind trial. *Br J Dermatol.* 2010 Jun 9.
- 49 Flinterman AE, Knol EF, van Leperen-van Dijk AG et al. Probiotics have a different immunomodulatory potential in vitro versus ex vivo upon oral administration in children with food allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;143(3):237-44.
- 50 Gerhold K, Blumchen K, Bock A, Franke A, Avagjan A, Hamelmann E. Endotoxins and allergy: lessons from the murine model. *Pathobiology* 2002;70:255-9.
- 51 Simon D, Braathen LR, Simon HU. Increased lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor-alpha, interferon-gamma and interleukin-10 production in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2007;157:583-6.
- 52 Rasche C, Wolfram C, Wahls M, Worm M. Differential immunomodulating effects of inactivated probiotic bacteria on the allergic immune response. *Acta Derm Venereol* 2007;87:305-11.
- 53 Worm M. Efficacy and tolerability of high dose sublingual immunotherapy in patients with rhinoconjunctivitis. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2006;38:355-60.
- 54 Pfaar O, Klimek L. Efficacy and safety of specific immunotherapy with a high-dose sublingual grass pollen preparation: a double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;100:256-63.
- 55 Gerhold K, Avagyan A, Seib C et al. Prenatal initiation of endotoxin airway exposure prevents subsequent allergen-induced sensitization and airway inflammation in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:666-73.
- 56 Gerhold K, Bluemchen K, Franke A, Stock P, Hamelmann E. Exposure to endotoxin and allergen in early life and its effect on allergen sensitization in mice. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:389-96.
- 57 Gerhold K, Blumchen K, Bock A, Seib C, Stock P, Kallinich T. Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:110-6.
- 58 Min JW, Park SM, Rhim TY et al. Effect and mechanism of lipopolysaccharide on allergen-induced interleukin-5 and eotaxins production by whole blood cultures of atopic asthmatics. *Clin Exp Immunol.* 2007 Mar;147(3):440-8.

- 59 Helwig U, Lammers KM, Rizzello F et al. Lactobacilli, bifidobacteria and E. coli nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells. *World J Gastroenterol*. 2006 Oct 7;12(37):5978-86.
- 60 Girón-González JA, Moral FJ, Elvira J et al. Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. *Eur J Endocrinol*. 2000 Jul;143(1):31-6.
- 61 Bickert T, Trujillo-Vargas CM, Duechs M et al. Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 suppresses allergen- induced Th2 responses in the airways. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;149(3):219-30.
- 62 Savilahti E, Kuitunen M, Vaarala O. Pre and probiotics in the prevention and treatment of food allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2008 Jun;8(3):243-8.

9. Erklärung an Eides Statt

„Ich, Jennifer Berg, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Klinischer Einsatz und Immunmodulation durch apathogene Escherichia coli Nissle 1917 bei Gräserpollenallergikern“ 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.“

10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.