

5. Diskussion

5. 1. CCR3 mRNA-Expression und Zytokin- und Chemokin- mRNA-Expressionsprofil bei eosinophiler Polyposis nasi

In dieser Studie wurde die mRNA-Expression des Chemokinrezeptors CCR3, der CC-Chemokine Eotaxin und RANTES und der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IFN- γ bei Patienten mit chronisch hyperplastischer Pansinusitis und einer Kontrollgruppe untersucht. Zusätzlich wurden die Ergebnisse innerhalb der Patientengruppe hinsichtlich einer möglichen zugrundeliegenden Ätiologie wie einer Allergie oder ASS- Intoleranz verglichen. Nach Auswertung der Literatur ist dies die erste Studie, die sich mit der mRNA-Expression des CCR3- Rezeptors und der Chemokine Eotaxin und RANTES im Gewebe von eosinophilen Nasenpolypen beschäftigt. Zusätzlich wurde die simultane mRNA-Expression verschiedener Zytokine untersucht, denen eine Rolle in der Pathogenese der Polyposis nasi zugeschrieben wird. Die Selektionskriterien der Patientengruppe sollten zudem die Vergleichbarkeit der Daten ermöglichen.

Die komplexe Bedeutung des CCR3/ Eotaxin Systems- Gegensatz zu RANTES

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass sowohl in eosinophilen Nasenpolypen als auch im Nasenmuschelgewebe gesunder Kontrollpatienten der CCR3- Rezeptor und seine beiden Liganden Eotaxin und RANTES auf mRNA-Ebene exprimiert werden. Die Expression des CCR3- Rezeptors und seines spezifischen Liganden Eotaxin war in der Patientengruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Damit konnte erstmals eine erhöhte CCR3- und Eotaxin mRNA-Expression in der Nasenschleimhaut von Patienten mit Polyposis nasi im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Während die mRNA-Expression verschiedener CCR3 Liganden in Nasenpolypen in mehrfachen Studien untersucht (13, 29, 130, 156) und beschrieben wurde, gab es bislang keine Untersuchungen zur mRNA-Expression von CCR3 bzw. CCR3 und Eotaxin in Nasenmuscheln und Nasenpolypen. Frühere Studien konnten jedoch bereits eine CCR3 mRNA-Expression in nasalen T-Zell-Linien gesunder Kontrollpersonen belegen (179), immunhistologisch gelang der Nachweis CCR3⁺T-Zellen im Nasenpolypengewebe (55)

Dahingegen ist die wichtige Rolle des CCR3- Liganden Eotaxin in der Pathogenese der chronischen Sinusitis und Polyposis nasi in verschiedenen Studien untersucht und beschrieben (18, 196, 198) worden. Eotaxin konnte erstmals aus der Bronchoalveolarlavage (BAL) von Meerschweinchen, die mit Ovalbumin sensibilisiert und

anschließend damit exponiert worden waren, isoliert werden (70). Einige Zeit später wurde das humane Eotaxin kloniert (79). Erst der Arbeitsgruppe um Schröder gelang es 1996, Eotaxin aus den Überständen zytokinstimulierter humaner dermaler Fibroblasten zu isolieren (12). Inzwischen gehören zwei weitere Chemokine zur Eotaxin-familie: Eotaxin-2 und Eotaxin-3.

Die gemessene erhöhte Eotaxin mRNA-Expression im Polypengewebe der Patientengruppe lässt sich in der Literatur bestätigen und befindet sich in Übereinstimmung mit Studien anderer Autoren. So konnten Minshall et al. (106) eine vermehrte Eotaxin mRNA-Expression in Nasenmuscheln von Patienten mit chronischer Sinusitis und saisonaler allergischer Rhinitis belegen. Jahnsen et al. (69) berichteten über eine erhöhte mRNA-Expression von Eotaxin, Eotaxin-2 und MCP-4 bei Patienten mit Nasenpolypen gegenüber einer Kontrollgruppe. Pods et al. (130) untersuchten die Expression der CC- Chemokine Eotaxin und Eotaxin-2 und fanden auch hier eine erhöhte mRNA-Expression und Proteinsynthese in eosinophilen Nasenpolypen von Patienten mit ASS- Intoleranz und Asthma. Nonaka et al. (120) konnten zudem zeigen, dass aus Nasenpolypen gewonnene nasale Fibroblasten nach Stimulation mit einem Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) Eotaxin exprimieren und produzieren.

Die Eotaxin mRNA-Expression korrelierte zudem signifikant mit der mRNA-Expression des CCR3-Rezeptors. Die Interaktion von Eotaxin und CCR3 wurde bereits bei verschiedenen eosinophildominierten Erkrankungen als wichtiger pathogenetischer Faktor beschrieben. Eine deutlich vermehrte Eotaxin- und CCR3 mRNA-Expression fand man beispielsweise im Bronchialgewebe von Patienten mit Asthma bronchiale und bei akuter Exacerbation einer chronischen Bronchitis (18, 198). Auch bei Patienten mit atopischer Dermatitis zeigte sich in der befallenen Haut eine vermehrte CCR3- Eotaxin- mRNA-Expression (196).

Im Gegensatz zu Eotaxin konnte für RANTES kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Auch war zwischen der mRNA-Expression des CCR3- Rezeptors und der RANTES mRNA-Expression und der Eotaxin – und der RANTES- mRNA-Expression keine Korrelation nachweisbar. RANTES wird u.a. von Endothelzellen, Fibroblasten, T-Lymphozyten und Eosinophilen produziert und aktiviert im Gegensatz zu Eotaxin über verschiedene CC- Chemokinrezeptoren, nämlich CCR1, CCR3 und CCR5 Monozyten, T-Lymphozyten, eosinophile und basophile Granulozyten (43, 44).

RANTES ist deshalb unspezifischer für Eosinophile, die hauptsächlich CCR3 exprimieren. Dies demonstriert auch eine Arbeit von Terada et al. (176): Nach Neutralisierung von Eotaxin mit einem monoklonalen anti-Eotaxin-Antikörper nahm die durch nasale Mukosa-Homogenisate induzierte eosinophile transendotheliale Migration in gleichem Ausmaß ab, wie bei der Behandlung mit einem monoklonalen anti-CCR3-Antikörper. Bei der Behandlung mit einem monoklonalen anti-RANTES-Antikörper ergab sich nur eine minimale Inhibierung.

In der Literatur gibt es hinsichtlich der RANTES mRNA-Expression bei Polyposis nasi widersprüchliche Angaben. Bartels et al. (13) beschrieben eine erhöhte Eotaxin- und RANTES mRNA-Expression in eosinophilen Nasenpolypen atopischer Patienten. Bei den nicht atopischen Patienten war nur die Eotaxin-Expression erhöht. Shin et al. (156) hingegen fanden lediglich eine signifikant erhöhte Eotaxin mRNA-Expression in Nasenpolypen allergischer und nicht allergischer Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, während für RANTES kein Unterschied in der mRNA-Expression in Nasenpolypen allergischer und nichtallergischer Patienten sowie gesunden Kontrollen aus der Concha inferior nachweisbar war. Er führte dies auf unterschiedliche Untersuchungsmethoden zurück. Caversaccio et al. (29) fanden in eosinophilen Nasenpolypen zwar sehr hohe Proteinlevel für RANTES, sahen jedoch auch keine Unterschiede zu einer Kontrollgruppe und vermuteten deshalb, dass RANTES mehr eine Rolle in der normalen Homöostase, als in der Pathogenese der Polyposis nasi zukommt. Dafür spricht, dass RANTES- mRNA in allen Gewebeproben der Kontrollgruppe nachweisbar war. Möglicherweise spielen hier jedoch auch andere Mechanismen wie Zell- zu Zell Kontakte vor allem zwischen Eosinophilen und Endothel -bzw. Epithelzellen eine wichtige Rolle. Terada et al. (174) konnten zeigen, dass durch einen Signaltransfer zwischen diesen Zellen die RANTES Produktion geblockt wurde, um die weitere Migration von Eosinophilen zu verhindern. Das Ausmaß dieser Blockierung hing dabei direkt von der Anzahl der involvierten Eosinophilen ab.

Zusammenfassend zeigen die Daten eine Hochregulation der Eotaxin- und der CCR3 mRNA-Expression in eosinophilen Nasenpolypen. Die erhöhte Expression und die Korrelation des CCR3-Rezeptors und seines Liganden Eotaxin weisen darauf hin, dass dem CCR3/ Eotaxin- System auch in der Pathogenese der eosinophilendominierten Polyposis nasi eine Schlüsselposition zukommt.

Das Zytokinprofil

In dieser Studie wurde erstmals das Zytokinprofil eosinophiler Nasenpolypen von Patienten mit vergleichbarem klinischem Befund und vergleichbarer Ausprägung der Gewebeseosinophilie auf mRNA-Ebene untersucht. In der Literatur sind hier in den letzten Jahren z.T. kontroverse Befunde beschrieben, die sich vor allem auf eine mangelnde Charakterisierung und Vergleichbarkeit des selektierten Patientengutes sowie auf eine relativ kleine Anzahl untersuchter Patienten zurückführen lassen (140).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich bei den Patienten mit chronisch hyperplastischer Pansinusitis und hochgradiger Gewebeseosinophilie in den untersuchten Nasenpolypen eine signifikant erhöhte IL-4, IL-5 und IL-10 mRNA-Expression, wobei IL-5 mRNA in dieser Studie in der Kontrollgruppe nicht nachweisbar war. Dagegen konnte für IFN- γ kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

Die hier untersuchten Zytokine sollen nun zunächst einzeln diskutiert werden:

IL-10

Die Auswertung der Daten ergab eine Hochregulation der IL-10 mRNA-Expression in den Nasenpolypen- im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine gesteigerte Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 ist bislang bei zahlreichen chronisch entzündlichen Dermatosen festgestellt worden (3). Ebenso konnte eine erhöhte Anzahl IL-10 mRNA⁺ Zellen in der Nasenschleimhaut von Patienten im 2. Jahr einer Hyposensibilisierung beobachtet werden (121). Ansonsten ist jedoch über die Rolle dieses Zytokins, insbesondere bei der Polyposis nasi wenig bekannt.

IL-10, das erstmals 1988 von Mosmann (112) als „cytokine synthesis inhibiting factor“ beschrieben wurde und Effekte auf zahlreiche Zellen hat, wird von TH0,- TH1 und TH2-Lymphozyten, CD4-positiven und CD8-positiven Zellen synthetisiert, wobei TH2-Subpopulationen mehr IL-10 produzieren als TH1-Zellen (112). Seine antiinflammatorischen Effekte werden in erster Linie durch die Suppression von Makrophagen, Monozyten und T-Lymphozyten vermittelt (28). IL-10 hemmt beim Menschen die Proliferation und Zytokinsynthese von TH1, TH0 und TH2-Zellen mit Ausnahme von IL-4 (111). IL-10 wirkt auch auf B-Lymphozyten unter besonderen Umständen stimulierend und erhöht die Zahl der Immunglobulinproduzierenden Zellen. Die antiinflammatorischen Wirkungen von IL-10 erstrecken sich auch auf

Granulozyten des peripheren Blutes, indem auch in diesen Zellen die Zytokinsynthese supprimiert wird (76). Die nachgewiesene Hochregulation der IL-10 mRNA-Expression in eosinophilen Nasenpolypen nasi könnte zwei wesentliche Funktionen erfüllen: In erster Linie ist die Hochregulation dieses Zytokins als Gegenregulation zur Hemmung anderer, ebenfalls hochregulierter insbesondere proinflammatorischer Zytokine und damit als ein begrenzender Faktor der Entzündungsreaktion zu bewerten. Neben seiner antiinflammatorischen Funktion kommt dem IL-10 beim Menschen jedoch auch eine wichtige Rolle bei der Selektion der Immunantwort -TH2 versus TH1 zu. Die Induktion der Entwicklung der TH2-Subpopulation wird durch IL-4 propagiert (163). IL-10 hemmt dabei die Synthese von IFN- γ bei unveränderter IL-4-Produktion durch T-Lymphozyten. Die Hochregulation von IL-10 könnte also auch zu einer Verschiebung der Immunantwort in Richtung eines mehr TH2-dominierten Zytokinprofils beitragen.

IFN- γ

Das Ergebnis der IFN- γ mRNA-Expression scheint diese These zu bestärken. Während alle TH2-Zytokine (IL-10, IL-4, IL-5) im Polypengewebe verstärkt exprimiert wurden, konnte eine solche Hochregulation für das proinflammatorisch wirkende, allerdings TH1 assoziierte Zytokin IFN- γ nicht nachgewiesen werden. Die IFN- γ mRNA-Expression war hier gegenüber der Kontrollgruppe verringert, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Im Gegensatz dazu konnten Lee et al. (87) eine erhöhte IFN- γ mRNA-Expression in 14 untersuchten Nasenpolypen gegenüber 6 Patienten einer Kontrollgruppe nachweisen. Eine Allergie war bei 4 (28%) der Patienten nachweisbar. In dieser Studie war der Anteil der Allergiker demgegenüber deutlich höher (47%), so dass die nicht erhöhte IFN- γ Expression möglicherweise auf einen Unterschied im selektierten Patientengut zurückzuführen ist.

Interferone wurden vor mehr als 30 Jahren anhand ihrer antiviralen Aktivität erkannt. Neben der antiviralen Aktivität greifen IFN vielfältig in die Immunregulation ein (39). So hemmt IFN- γ die IL-4 Synthese und fügt sich damit in die Reihe der Zytokine ein, die die Differenzierung und das Wachstum von TH1-Populationen fördern und von TH2-Zellen supprimieren. IFN- γ ist damit ein wesentlicher Gegenspieler bei atopischen Erkrankungen. Gleichzeitig ist IFN- γ aber auch ein stark proinflammatorisch-wirkendes Zytokin, da es die IL-1 und TNF α -Synthese fördert und die Synthese von IL-10 hemmt (6, 32).

Neben diesen vielfältigen Effekten führt IFN- γ zu einer Heraufregulation des CD95-Rezeptors und somit zu einer verkürzten Überlebenszeit eosinophiler Granulozyten (96). Überwiegen wie in dieser Studie TH2-Zytokine, wird die Apoptose der Eosinophilen durch die Down-Regulation des CD95-Rezeptors gehemmt (96). Die im Gegensatz zu allen anderen TH2 Zytokinen nicht heraufregulierte Expression von IFN- γ könnte also durch den erhöhten Anteil allergischer Patienten in der Studie, aber auch mit der Tatsache zusammenhängen, dass in der Patientengruppe nur Polypen berücksichtigt wurden, die eine hochgradige Eosinophilie aufwiesen.

IL-4 und IL-5

Die Hochregulation der mRNA-Expression für die TH2- Zytokine IL-4 und IL-5 in Nasenpolypen befindet sich in Übereinstimmung mit den in der Literatur publizierten Daten: In verschiedenen Studien wurden beide Zytokine bei der Polyposis nasi als erhöht exprimiert angegeben. So fanden Min et al. (105) ebenfalls eine erhöhte Expression dieser beiden Zytokine in Nasenpolypen im Vergleich zu Kontrollgewebe aus der unteren Nasenmuschel. In einer weiteren Studie (87) konnte auch nur im Polypengewebe jedoch nicht in Nasenmuscheln von Kontrollpersonen IL-5 mRNA detektiert werden. Beim Menschen ist IL-5 ein fast eosinophilen-spezifisches Zytokin, es wirkt auf unreife und reife Eosinophile, verstärkt die Degranulation und Zytotoxizität der Zellen, führt zur Aktivierung und zum verlängerten Überleben im Gewebe und zur Chemotaxis bzw. Gefäßwandadhäsion über die Induktion von Adhäsionsmolekülen aus der Gruppe der Integrine (172). In-vivo-Beobachtungen haben zudem gezeigt, dass IL-5 eine zentrale Rolle bei der Hämatopoese der eosinophilen Granulozyten spielt. IL-5 ist dabei für Eosinophile spezifisch, während IL-3 und GM-CSF auch die Differenzierung von Neutrophilen und Makrophagen induzieren (103). Eosinophile sind aber nicht nur Effektorzellen, sondern zugleich Quelle für IL-5. So fanden Bachert et al. (7) eine erhöhte Anzahl IL-5 positiver Zellen in Nasenpolypen, die auch positiv für MBP und gespaltenes ECP waren: Mehr als 50% der Eosinophilen waren positiv für IL-5, die insgesamt 70% der IL-5 positiven Zellen repräsentierten.

Auch für IL-4 wurde neuerlich der Nachweis erbracht, dass 80% der Eosinophilen in Nasenpolypen selbst IL-4 mRNA exprimieren (119). Dieses atopieassoziierte Zytokin wurde 1982 als Wachstums- und Differenzierungsfaktor für B-Lymphozyten erkannt und 1986 nach Isolierung der cDNA als Interleukin-4 bezeichnet. Der hochaffine IL-4-Rezeptor wird auf B- und T-Lymphozyten, auf Makrophagen und Monozyten,

Mastzellen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, auf Fibroblasten und Endothelzellen gefunden. IL-4 fördert selektiv die transendotheliale Migration von Eosinophilen und wirkt auf Eosinophile direkt migrationsfördernd, sofern diese zuvor durch IL-3 und GM-CSF geprimt wurden.

Bei abschließender Betrachtung des Zytokinprofils ergibt sich nunmehr folgendes Bild: Sowohl proinflammatorisch wirkende Zytokine wie IL-5 als auch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 wurden in der Patientengruppe signifikant verstärkt exprimiert. Die mRNA-Expression aller TH2-assoziierten Zytokine, darunter das für eosinophile Granulozyten bedeutsame Zytokin IL-5 und das atopieassoziierte Zytokin IL-4 war ebenfalls signifikant erhöht. Für die Expression eines typischen TH1 assoziierten Zytokins -IFN- γ konnte kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Den Ergebnissen zufolge scheint der eosinophile Nasenpolyp kein spezifisches TH1-Profil aber auch kein Vollbild eines typischen TH2-Profiles- sondern vielmehr ein kombiniertes TH2/ TH1-Profil mit Betonung der TH2-Zytokine aufzuweisen.

Zusammenhang zwischen der mRNA- Expression der Zytokine, Chemokine und CCR3

Anhand der Ergebnisse der Korrelationsanalyse sollen nun mögliche Zusammenhänge zwischen der mRNA- Expression der einzelnen Mediatoren genauer analysiert und diskutiert werden. Die Berechnung des Spearman'schen Korrelationskoeffizienten spiegelt dabei den rein mathematischen Zusammenhang zwischen den ermittelten Werten und nicht das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen Zellen und Mediatoren wider. Die Korrelationsanalyse ist deshalb als eine vereinfachte Darstellung der Zusammenhänge zu werten und kann nur als Anhaltspunkt für eine mögliche Koregulation herangezogen werden.

Zytokine

Die IL-10 mRNA-Expression zeigte dabei eine zweiseitig signifikante Korrelation mit der IL-4- und IL-5 mRNA- Expression, was die Aussage einer gemeinsamen Hochregulation der TH2-Zytokine unterstützt. Im Gegensatz dazu konnte aber eine negative Korrelation zwischen den IL-10- und IFN- γ Werten nicht nachgewiesen werden, obwohl ja die Synthese von IFN- γ durch IL-10 gehemmt wird. Dagegen bestand auf mRNA- Ebene eine negative Korrelation zwischen IFN- γ und IL-4, die ja auch als Gegenspieler fungieren. IFN- γ hemmt bekanntermaßen die IL-4 Synthese

und IL-4 fördert wiederum die Entwicklung von T-Lymphozyten in die TH2 Richtung und hemmt TH1-Zellen bzw. deren Produktion von IFN- γ . Diese Daten stützen die Annahme eines gemischtes TH2/TH1-Profiles mit Betonung der TH2-Zytokine. Die Ergebnisse weisen zudem auf eine Koregulation der TH2- Zytokine IL-10, IL-4 und IL-5 sowie eine negative Regulation zwischen den Zytokinen IL-4 und IFN- γ in eosinophilen Nasenpolypen hin.

Chemokine und CCR3 / Zytokine

Die Untersuchung der simultanen mRNA-Expression von CCR3 bzw. Eotaxin und RANTES und der mRNA-Expression der Zytokine mit Hilfe der Korrelationsanalyse sollte zeigen, ob es auch hier Hinweise für einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression dieser Mediatoren gibt, ob also die Rezeptor- und Chemokinexpression abhängig von einem bestimmten Zytokinmilieu ist.

Für die CCR3 mRNA-Expression ergab sich hier eine positive zweiseitige Korrelation mit der mRNA-Expression der Zytokine IL-10, IL-4 und IL-5. Der Zusammenhang zwischen der CCR3- und der IL-5 mRNA-Expression wird durch Angaben in der Literatur gestützt. So konnten Tiffany et al. (178) zeigen, dass die CCR3 Expression auf Eosinophilen durch IL-5 induziert wird. Die Arbeitsgruppe von Till (179) wies nach, dass nasale T-Zellen in Kultur nach Zugabe von IL-4 CCR3 exprimieren. Ausgangspunkt für die Differenzierung von eosinophilen Granulozyten sind CD34⁺-Vorläuferzellen, die sich nicht wie bisher vermutet allein im Knochenmark sondern auch im Gewebe von Nasenpolypen finden, so dass hier auch eine lokale Unterhaltung der nachgewiesenen eosinophilen Entzündung denkbar ist (78). Für die CD34-positiven Vorläuferzellen im Knochenmark konnte eine Hochregulation des CCR3 Rezeptors durch die TH2- Zytokine IL-4 und IL- 5, sowie eine Down-Regulation durch IFN- γ nachgewiesen werden (84).

Welchen Zusammenhang gibt es nun zwischen der mRNA-Expression der untersuchten Zytokine und Chemokine? In der Literatur wird in einem in-vivo-Mausmodell ein TH1 Zytokinprofil mit der Expression von RANTES, das Vorliegen eines TH2- Zytokinprofils mit einer Eotaxin- Expression assoziiert (31). Die eigenen Daten ergaben eine Korrelation der Eotaxin mRNA-Expression mit der IL-10 und IL-4 mRNA-Expression, während sich für RANTES eine positive Korrelation der mRNA-Werte mit IL-10 und IL-5 ergab. Der Einfluss von IL-4 auf die Eotaxin Expression wurde durch verschiedene Studien belegt. Terada et al. (175) konnten in kultivierten nasalen Fibroblasten eine durch IL-4 induzierte Eotaxin- Produktion feststellen. Nach

einer Studie von Mochizuki et al. (108) induziert IL-4 die Eotaxin Produktion und Expression in dermalen Fibroblasten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Miyamasu et al. (107), die diesen Effekt an verschiedenen Zellen untersucht haben und zusätzlich feststellten, dass die Eotaxin Produktion und Expression durch IFN- γ inhibiert wird. BEAS-2B humane bronchiale Epithelzellen wurden mit TH2- Zytokinen (IL-4) kultiviert, wodurch eine signifikante Erhöhung der Eotaxinsynthese und Expression induziert wurde. Dies hatte keinen Einfluss auf RANTES, wobei sich die RANTES Synthese und Expression nach Stimulation mit IFN- γ erhöhte (53). Auch humane Lungen-Fibroblasten wurden durch TH2 Zytokine zur Eotaxin Produktion, durch IFN- γ zur RANTES Produktion polarisiert (177).

Insgesamt weisen die zahlreichen Korrelationen zwischen den verschiedenen Mediatoren auf die ausgeprägte Komplexität des Zytokin-Chemokinnetzwerkes hin. Der Wert der CCR3 mRNA-Expression ist direkt mit dem Grad der Eosinophilie assoziiert, da der CCR3-Rezeptor überwiegend von Eosinophilen exprimiert wird. Bei vergleichbarer hoher Eosinophilie in der Patientengruppe weist die Korrelation zur Expression der Zytokine IL-10, IL-4 und IL-5 auf deren Rolle bei der Entstehung und Unterhaltung der Eosinophilie in den untersuchten Nasenpolypen hin. Ob Zytokine jedoch auch die Feinregulierung der Chemokinrezeptoren beeinflussen, kann durch die vorliegende Studie nicht beantwortet werden. Dies ist sicher eine interessante Fragestellung für weitere Untersuchungen. In der Patientengruppe mit vergleichbar ausgeprägtem Krankheitsbild und hoher Gewebeeosinophilie wurde ein gemischtes TH2/TH1-Profil mit Betonung der TH2-Zytokine ermittelt. Die in der Literatur beschriebene Zuordnung der Chemokine Eotaxin bzw. RANTES zu dem jeweiligen Profil lässt ein daran orientiertes Chemokinprofil erwarten. Die Betonung des TH2 Profils und die erhöhte mRNA-Expression von Eotaxin sowie die Korrelation u.a. mit der IL-4 mRNA-Expression in der Patientengruppe weisen auf einen solchen Zusammenhang hin. Im Gegensatz dazu gab es keinen Unterschied in der RANTES mRNA-Expression- jedoch korrelierte auch hier die Expression mit TH2 Zytokinen. Als mögliche Gründe hierfür können die Komplexität der Wechselbeziehungen und die Selektion des Patientengutes angeführt werden. Die Untersuchung des Zytokin-Chemokinprofils erfolgte nicht in der Entstehungsphase der Erkrankung, sondern in einem fortgeschrittenen Stadium und spiegelt den Zustand in diesem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung wider. Möglicherweise kommt RANTES in einem früheren Stadium der Erkrankung eine wichtige Rolle zu.

Die Rolle ätiologischer Faktoren

Zahlreiche Theorien über die Entstehung der Polyposis nasi wurden seit ihrer Erstbeschreibung vor mehr als 3000 Jahren aufgestellt. Neben frühen Theorien, welche ein Drüsenwachstum oder eine Verstopfung der Ausführungsgänge nasaler Schleimdrüsen postulierten, wurden eine Basalmembranruptur mit interstitieller Ödembildung (85), eine Vaskulitis (104) und Enzymabnormalitäten (150) diskutiert. Zum typischen histologischen Bild nasaler Polypen gehört eine ausgeprägte Gewebeseosinophilie. Auch bei allergischen Erkrankungen ist die Zahl eosinophiler Granulozyten in nasalem Schleimhautgewebe erhöht (116). Dies gilt ebenso für Patienten mit ASS- Intoleranz, wo Sladek et al. (161) große Mengen eosinophiler Granulozyten in bronchialem und nasalem Gewebe von Patienten mit ASS-Intoleranz fand. Das häufige Vorkommen eosinophiler Granulozyten hat dazu geführt, dass insbesondere Atemwegsallergien, aber auch eine ASS-Intoleranz mit der Pathogenese dieses Krankheitsbildes in Verbindung gebracht werden (50, 56, 109).

Allergie

Die allergische Rhinitis ist eine der häufigsten Atemwegserkrankungen und die häufigste immunologische Erkrankung überhaupt (52). Zur Epidemiologie atopischer Erkrankungen in Europa liegen bislang ca. 20 Publikationen vor. Die Angaben zur Prävalenz der allergischen Rhinitis variieren hierin zwischen 0,5% und 26,3%, mit einer Häufung bei ca. 15% (194). In unserem selektierten Krankengut lag die Prävalenz von Inhalationsallergien bei 47 %, welche somit ca. dreimal höher war, als im Bevölkerungsdurchschnitt zu erwarten.

Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit den Ergebnissen von Drake-Lee, welcher keine erhöhte Prävalenz von Allergikern in seinem Krankengut von Polyposispatienten fand (40). Auch Caplin et al. fanden unter 3000 atopischen Patienten eine Polyposis nasi nur in 0,5% der Fälle (27). Der Grund für eine erhöhte Prävalenz in unserem Patientengut mag darin begründet liegen, dass es sich zum einen bei den von uns behandelten Patienten um ein vorselektiertes Krankengut einer Universitätsklinik handelte zum anderen auch mit den Selektionskriterien. Immerhin bestand bei 30% der Patienten mit Allergie bereits eine Rezidivpolyposis. Auch Hilka et al. (63) und Stoop et al. (167) fanden eine deutlich erhöhte Rezidivrate bei Polyposispatienten mit Atemwegsallergien und konnten die Verhinderung von Polyposisrezidiven bei adäquater Allergiebehandlung nachweisen. Asero et al. (4) untersuchten 68 Patienten mit Polyposis nasi ohne eine akute allergische Symptomatik und konnten

bei Testung eines breiten Allergenspektrums bei 63% einen positiven Befund feststellen, dahingegen nur bei 17% der Kontrollgruppe. Kaldenbach et al. (71) wiesen bei 22% der untersuchten Polyposispatienten eine klinisch bedeutsame Inhalationsallergie nach.

ASS-Intoleranz

Die Acetylsalicylsäure-(ASS-) Unverträglichkeit wurde bereits kurz nach Einführung von Aspirin® im Jahre 1899 durch Hirschberg als anaphylaktoide Reaktion beschrieben (64). Im Jahre 1922 berichteten Widal und Kollegen, dass ASS-Unverträglichkeit, nasale Polypen und Asthma bronchiale häufig gemeinsam auftreten (191). Diese klinische Entität wurde später mit dem Begriff „Aspirintrias“ belegt. Gemäß der Cyclooxygenasetheorie (171) wird für die Entstehung der klinischen Symptome die Hemmung der Cyclooxygenase, des Schlüsselenzyms für die Metabolisierung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen, durch ASS verantwortlich gemacht. Dadurch wird Arachidonsäure vermehrt in die Biosynthese von Leukotrienen und HPTE's (Hydroperoxyeicosatetraensäurederivaten) umgeleitet. Zusätzlich scheint bei Patienten mit ASS-Intoleranz die Leukotriensynthese durch eine Überproduktion von 12-HETE (144) und eine fehlende Hemmungskontrolle durch Prostaglandin E₂ (PGE₂) (145) verstärkt zu sein.

Zur Häufigkeit von Erkrankungen der oberen Atemwege durch eine ASS-Intoleranz liegen nur wenige, in der Regel ebenfalls an einem selektierten Krankengut durchgeführte Untersuchungen vor (130, 170). In der Gruppe der Asthmatiker wurde bei 9-44% - im Mittel etwa bei 20% - der Patienten eine pathologische Reaktion auf ASS beschrieben. Dies würde einer kumulativen Prävalenz von 1-2% in der Gesamtbevölkerung entsprechen. Selektioniert man die Patienten mit Asthma und anamnestischen Hinweisen auf eine ASS-Intoleranz, so lässt sich in etwa 78% die Diagnose einer ASS-Intoleranz durch eine orale Provokationstestung bestätigen. Schapowal fand unter 2564 Patienten mit den Symptomen einer perennialen Rhinitis in 6,4% eine ASS-Intoleranz (146, 148). Bei den Patienten mit einer Polyposis nasi stieg diese Zahl auf 15% (n = 1099). Umgekehrt entwickeln zwischen 36 und 70% der Patienten mit einer ASS-Sensitivität Nasenpolypen (148, 153, 154). Unsere Ergebnisse bestätigen diese Angaben. Wir fanden in unserem selektierten Krankengut eine ASS-Intoleranz (eingeschlossen Patienten mit zusätzlich Allergie) sogar in 31% der Fälle. Die Rate der Rezidivpolyposis lag in dieser Patientengruppe bei 50%.

ASS-Intoleranz und Allergie

Die höchste Rezidivrate, nämlich 75% fanden wir jedoch bei denjenigen 5 Patienten (17%), bei denen gleichzeitig eine ASS-Intoleranz und eine Allergie vorlag. Diese Patientengruppe zeigte eine signifikant erhöhte Rezidivrate gegenüber der Gruppe der Allergiker ($p=0,029$) und der Gruppe ohne Allergien ($p=0,023$). Über Untersuchungen zur Koinzidenz von Atemwegsallergien und ASS-Intoleranz bei Polyposispatienten wurde bislang kaum berichtet. Kaldenbach et al. fanden diese Kombination ebenfalls in einem vorselektierten Krankengut mit Polyposis nasi in einem überraschend hohen Anteil von 15 % der Fälle. Gerade bei Problempatienten mit Polyposisrezidiven nach vorausgegangener suffizienter Nasennebenhöhlenoperation dürfte daher das gleichzeitige Vorkommen von ASS-Intoleranz und Allergie eine Rolle spielen.

NARES: (nichtallergische Rhinitis mit Eosinophiliesyndrom)

In unserem Krankengut gab es ebenfalls Patienten $n=10$ (33%), die weder eine ASS-Intoleranz noch eine Allergie aufwiesen. Auch Settigiani et al. (153) fanden unter 142 Patienten in 15% eine Sekret-Eosinophilie der Nase ohne Nachweis eines zugrundeliegenden Pathomechanismus. Dieses Phänomen wurde im Bereich der Nase als NARES bezeichnet: nichtallergische Rhinitis mit Eosinophiliesyndrom. Die Beschreibung eines eigenständigen Krankheitsbildes für diesen Befund wird jedoch widersprüchlich diskutiert (114). Möglicherweise handelt es sich dabei auch um die Vorstufe einer ASS-sensitiven Polyposis nasi (109).

Die Auswertung der verschiedenen ätiologischen Faktoren in der Patientengruppe weist auf eine multifaktorielle Pathogenese der Polyposis nasi hin. Offensichtlich können verschiedene Ätiologien eine Gewebeeosinophilie über z.T. unterschiedliche Pathomechanismen verursachen, die dann ab einem bestimmten Krankheitsstadium in dieselbe „Endstrecke“, eine chronisch-hyperplastische Schleimhauterkrankung münden. Aufgrund der Selektionskriterien war in unserem Patientengut der Anteil an Patienten mit einer Allergie und/ oder ASS- Toleranz deutlich höher als bei vergleichbaren Studien. Gerade bei Problempatienten mit Polyposisrezidiven nach vorausgegangener suffizienter Nasennebenhöhlenoperation dürften Faktoren wie eine Allergie oder ASS- Intoleranz und insbesondere wie diese Studie belegen konnte, das gleichzeitige Vorkommen dieser beiden Faktoren eine große Rolle spielen. Da diese Patienten trotz des heute verfügbaren, technisch aufwendigen Operationsinstrumentariums durch Rezidiveingriffe gefährdet sein können, sollte eine

möglichst eingehende Diagnostik zur Evaluierung konservativer Therapiemöglichkeiten hinsichtlich einer Vermeidung eines erneuten Rezidivs erfolgen.

Die mRNA-Expression von CCR3, Eotaxin und RANTES in den verschiedenen ätiologischen Gruppen

Bislang wurden in dieser Arbeit nur die Unterschiede in der Zytokin- und Chemokin- mRNA-Expression zwischen der Kontroll- und der Patientengruppe untersucht und bewertet. Wenn man nun davon ausgeht, dass die Polyposis durch verschiedene Ätiologien verursacht wird, die über unterschiedliche Pathomechanismen zur Polyposis nasi führen, stellt sich die Frage, ob die verschiedenen Ätiologien durch ein eigenes mRNA-Expressionsprofil der Chemokine und Zytokine zu unterscheiden sind, bzw. ob dieses Profil bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf noch detektierbar ist. Im Folgenden sollen nun die Unterschiede in der mRNA-Expression der untersuchten Parameter zwischen den einzelnen Gruppen analysiert und diskutiert werden

Der Vergleich der mRNA-Expression des Chemokinrezeptors CCR3 in den verschiedenen Untergruppen ergab, dass die Gruppe, bei der gleichzeitig eine ASS-Intoleranz und eine Allergie vorlag gegenüber den übrigen Patienten ein signifikant höheres CCR3- Expressionsniveau aufwies. Zwischen allen anderen Gruppen konnte kein Unterschied verifiziert werden. Der CCR3 Rezeptor ist der dominierende Rezeptor auf eosinophilen Granulozyten (41, 45, 46) und korreliert folglich mit der Anzahl der Eosinophilen. In dieser Studie wurden sämtliche Mediatoren nicht mit der Zahl der Eosinophilen korreliert, sondern auf der Grundlage einer vergleichbaren hochgradigen Gewebeeosinophilie (>100/HPF) analysiert. Der Unterschied in der CCR3- mRNA Expression kann möglicherweise auf eine in der Gruppe der Allergiker mit ASS- Intoleranz noch deutlich höhere Eosinophilie zurückzuführen sein.

Für das spezifisch an den Rezeptor bindende Chemokin Eotaxin, das ebenfalls mit der Zahl der Eosinophilen im Gewebe von Nasenpolypen korreliert (156) waren dagegen in der mRNA-Expression keine Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar. Pods et al. (130) fanden Unterschiede in der Eotaxin mRNA-Expression in Nasenpolypen von Patienten mit und ohne ASS- Intoleranz, jedoch unterschieden sich die Gruppen auch durch die Anzahl der Eosinophilen.

Hinsichtlich der RANTES mRNA-Expression war kein Unterschied zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe eruiert, interessanterweise gab es jedoch

bei der detaillierten Auswertung signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe mit ASS-Intoleranz und Allergie und der Gruppe der nicht allergischen Patienten sowie der Gruppe der Allergiker. Die Herunterregulation von RANTES in der Gruppe mit ASS-Intoleranz und Allergie lässt auf eine mögliche Potenzierung von Mechanismen bei Kombination dieser beiden Ätiologien schließen. Möglicherweise spielen hier Regulationsmechanismen wie Zell- zu Zell Kontakte zwischen Eosinophilen und Endothel- bzw. Epithelzellen eine wichtige Rolle, die den weiteren Zustrom von Eosinophilen hemmen sollen. Terada et al. (174) konnten zeigen, dass durch einen Signaltransfer zwischen diesen Zellen die RANTES Produktion geblockt wurde, um die weitere Migration von Eosinophilen zu verhindern. Das Ausmaß dieser Blockierung hing dabei direkt von der Anzahl der involvierten Eosinophilen ab. In der Literatur gibt es bislang keine Untersuchungen zur RANTES mRNA-Expression von Patienten mit gleichzeitiger Allergie und ASS- Intoleranz. Lediglich für Patienten mit ASS- Intoleranz oder Allergie fanden sich hier Angaben. So konnten Pods et al. (130) keinen Unterschied in der RANTES mRNA-Expression von Patienten mit Polyposis nasi mit und ohne ASS-Intoleranz feststellen. Shin et al. (156) sahen ebenfalls keinen Unterschied zwischen allergischen und nicht allergischen Patienten mit Polyposis nasi.

Zytokin mRNA-Profil in Abhängigkeit von den ätiologischen Gruppen

Die Gruppe mit ASS-Intoleranz und Allergie zeigte gegenüber allen anderen Patienten die signifikant höchste mRNA-Expression für IL-4, der Unterschied war sogar signifikant zur Gruppe der Allergiker. Diese wiederum hatten ein signifikant erhöhtes IL-4- mRNA-Level im Vergleich zur Gruppe mit ASS- Intoleranz und den nicht allergischen Patienten. Insgesamt konnte also bei den Allergikern (Allergie und ASS-Intoleranz und Allergie) eine signifikante Hochregulation der IL-4 mRNA-Expression gegenüber den anderen Patienten festgestellt werden. Hier könnte die Allergie- als ein zugrundeliegender ätiologischer Faktor die IL-4 Hochregulation mit bewirkt und damit ein atopieassoziiertes TH2- geprägtes Zytokinprofil verursacht haben.

Dies scheint auch für das ebenfalls TH2- assoziierte Zytokin IL-10 zu gelten. Auch dieses Zytokin wurde bei den Allergikern signifikant höher exprimiert als bei den nicht allergischen Patienten.

Korrespondierend zu diesen Ergebnissen war das Expressionsniveau des TH1- assoziierten Zytokins IFN- γ in der Gruppe der nicht allergischen Patienten gegenüber

der Gruppe der Allergiker, der Gruppe mit ASS-Intoleranz und Allergie und auch gegenüber allen anderen Patienten signifikant erhöht. In der Gruppe der Allergiker war zusätzlich eine signifikante Down-Regulation gegenüber den Patienten mit ASS-Intoleranz zu verzeichnen. In den Nasenpolypen der nicht allergischen Patienten und der ASS- Intoleranten war also gegenüber den Allergikern die IFN- γ mRNA-Expression erhöht und damit der gegensätzliche Effekt nachweisbar– eine stärkere Ausprägung eines TH1- Profils bei nicht allergischen Patienten.

Im Gegensatz zu allen anderen Zytokinen ergab sich für die IL5 mRNA-Expression kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Dies erklärt sich aus der Selektion des Patientenguts und daraus, dass IL-5 beim Menschen ein fast eosinophilen spezifisches Zytokin ist. So repräsentieren Eosinophile insgesamt 70% der IL-5 positiven Zellen in Nasenpolypen (140). Das Auswahlkriterium der vergleichbaren, sehr hohen Zahl von Eosinophilen in den Nasenpolypen steht in engem Zusammenhang mit der IL-5 mRNA-Expression in allen Patientengruppen und scheint damit unabhängig von der möglicherweise zugrundeliegenden Ätiologie zu sein.

Ätiologische Faktoren wie Allergie, ASS- Intoleranz oder deren Kombination waren somit innerhalb der Patientengruppe auch mit signifikanten Unterschieden im Zytokin- und Chemokinexpressionsprofil verbunden. Allergische Patienten exprimierten mehr IL-4 und damit ein mehr TH2-assoziiertes Zytokinprofil, nicht allergische mehr IFN- γ und damit ein mehr TH1-assoziiertes Zytokinprofil. Dies könnte einerseits auf Unterschiede im Pathomechanismus bei verschiedenen zugrundeliegenden Ätiologien bei der Entstehung der Polyposis nasi hindeuten. Es lässt weiterhin darauf schließen, dass die Allergie- entgegen den Auffassungen in der Literatur neben der ASS-Intoleranz doch eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Polyposis nasi- evtl. als Triggerfaktor zukommen könnte. Dies gilt besonders, wenn sie in Kombination mit einer ASS-Intoleranz auftritt. Allen gemeinsam ist eine massive Gewebeseosinophilie mit ausgeprägter Polyposis nasi. In diesem Stadium waren alle vorrangig eosinophilen-assoziierten Mediatoren wie CCR3, Eotaxin und IL-5 vergleichbar hochreguliert und Unterschiede durch möglicherweise zugrundeliegende ätiologische Faktoren nicht mehr nachweisbar.

Korrelation der mRNA-Expression der Mediatoren mit der Anzahl der Vor-Operationen und der Dauer der Erkrankung

Während die Patienten hinsichtlich der Ausprägung der Erkrankung und der Zahl der Eosinophilen in den Nasenpolypen vergleichbar waren, gab es Unterschiede in der Dauer der Erkrankung und der Anzahl der Vor-Operationen. Die Korrelation zwischen diesen Daten und der mRNA-Expression der verschiedenen Mediatoren erfolgte um festzustellen, ob es hier einen möglichen Zusammenhang gibt.

Mit steigender Anzahl der Vor- Operationen war eine signifikant verringerte mRNA-Expression von IL-10 zu verzeichnen. Je länger die Erkrankung andauerte, desto höher war dagegen die IL-4 mRNA-Expression. Das vornehmlich antiinflammatorisch wirkende IL-10 hemmt die Proliferation und Zytokinsynthese von TH1, TH0 und TH2-Zellen – bis auf IL-4. Die Down- Regulation dieses antiinflammatorisch wirkenden Zytokins bei häufigen Polyposisrezidiven könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bei bestimmten Patienten mit einer besonderen Dynamik der Erkrankung zuungunsten von IL-10 verschoben ist.

Die Korrelation zwischen der Dauer der Erkrankung und der IL-4 mRNA-Expression könnte erklären, warum einige Autoren die Polyposis nasi mit einem TH2- Profil in Verbindung bringen, da sich die meisten Studien mit der Polyposis nasi im fortgeschrittenen Stadium beschäftigen.

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war die systematische Untersuchung der mRNA-Expression des CCR3- Rezeptors, der Chemokine Eotaxin und RANTES und der Zytokine IL-10, IL-4, IL-5 und IFN- γ im Gewebe von eosinophilen Nasenpolypen und der unteren Nasenmuschel von Kontrollpersonen. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten wurden Patienten mit vergleichbarem Stadium der Erkrankung und vergleichbarer Eosinophilie ausgewählt. Aufgrund dieser Kriterien war in unserem Patientengut der Anteil an Patienten mit einer Allergie und/ oder ASS- Intoleranz deutlich höher als bei vergleichbaren Studien.

Die Hochregulation und Korrelation der mRNA-Expression von CCR3 und Eotaxin in eosinophilen Nasenpolypen weist darauf hin, dass den CCR3/ Eotaxin-Interaktionen auch bei der Polyposis nasi eine Schlüsselposition in der selektive Rekrutierung eosinohiler Granulozyten zukommt.

Das Zytokinmuster der Patientengruppe zeigte ein gemischtes TH2/TH1-Profil, wobei die Expression der Zytokine IL-10, IL-4 und IL-5 gegenüber der Patientengruppe signifikant erhöht war. IFN- γ wurde in beiden Gruppen ohne signifikante Unterschiede exprimiert. Die Ergebnisse wiesen zudem auf eine Koregulation der mRNA-Expression der TH2- Zytokine IL-10, IL-4 und IL-5 sowie eine negative Regulation zwischen den Zytokinen IL-4 und IFN- γ hin. Ätiologische Faktoren wie Allergie, ASS- Intoleranz oder deren Kombination waren innerhalb der Patientengruppe auch mit signifikanten Unterschieden im Zytokin- und Chemokinexpressionsprofil verbunden. Allergische Patienten exprimierten mehr IL-4, nicht allergische mehr IFN- γ . Der hohe Anteil an Allergikern (47%) in der Gesamtgruppe der Patienten ist deshalb möglicherweise eine Erklärung für das Ergebnis der IFN- γ mRNA-Expression. Verschiedene Zytokin- und Chemokinprofile könnten auf Unterschiede im Pathomechanismus bei verschiedenen zugrundeliegenden Ätiologien bei der Entstehung der Polyposis nasi hindeuten. Hierbei scheint neben der ASS- Intoleranz auch die Allergie zumindestens als Triggermechanismus eine Rolle zu spielen. Allen gemeinsam ist eine massive Gewebeseosinophilie mit ausgeprägter Polyposis nasi. In diesem Stadium waren alle vorrangig eosinophilen-assoziierten Mediatoren wie CCR3, Eotaxin und IL-5 vergleichbar hochreguliert und Unterschiede durch möglicherweise zugrundeliegende ätiologische Faktoren nicht mehr nachweisbar. Die zahlreichen ermittelten Korrelationen zwischen den verschiedenen Mediatoren sind auf die ausgeprägte Komplexität des Zytokin-Chemokinnetzwerkes zurückzuführen. Die Daten stützen die Hypothese einer multifaktoriellen Genese der Polyposis nasi, wobei es durch verschiedene Faktoren (Allergene, Bakterien, Viren, Pilze, Komplement oder Autoantikörper) zur Aktivierung von Zellen, zur Freisetzung verschiedener entzündlicher Mediatoren und zur selektiven Migration vor allem von Eosinophilen kommt. Aus bislang ungeklärten Gründen ist diese Reaktion nicht zeitlich begrenzt, sondern unterhält sich offenbar über autokrine Regulationsmechanismen und führt dann indirekt durch die Aktivierung struktureller Zellen zur Ausbildung der Polypen. Eine erhöhte Zahl aktivierter eosinophiler Granulozyten kann somit auf verschiedenen Wegen zur Entstehung einer Polyposis nasi beitragen. Die Genese der Eosinophilie ist hierbei nebensächlich. Unterschiedliche Pathomechanismen münden dann in dieselbe „Endstrecke“, eine chronisch-hyperplastische Schleimhauterkrankung- die Polyposis nasi.

5. 2. CCR3- bindende Chemokine bei eosinophiler Polyposis nasi

In dieser Studie wurden die Proteinkonzentrationen verschiedener Eosinophilen-chemotaktischer Chemokine in Gewebeproben von Patienten mit Polyposis nasi und Kontrollen aus der Concha inferior untersucht und verglichen. Die untersuchten CC-Chemokine waren im einzelnen: Eotaxin, Eotaxin-2 und Eotaxin-3, RANTES, MCP-3, MCP-4. Ihnen gemeinsam ist die Bindung an den Chemokinrezeptor CCR 3, dem dominierenden Rezeptor auf eosinophilen Granulozyten.

Ausgehend von den Ergebnissen der mRNA-Expressionsstudie, wo bereits auf die Bedeutung des Chemokinrezeptors CCR3 und seiner Interaktionen mit Eotaxin in der Pathogenese der Polyposis nasi hingewiesen wurde, sollten nun weitere an diesen Rezeptor bindende Chemokine untersucht werden. In diese Studie wurden Patienten mit unterschiedlichem Grad einer Gewebeeosinophilie eingeschlossen, was eine Analyse der CC- Chemokinkonzentration in Abhängigkeit von der Eosinophilie ermöglichte. Zusätzlich wurden zahlenmäßig gleiche Patientengruppen ohne und mit Allergie sowie ASS- Intoleranz ausgewählt, um das Chemokinmuster bei unterschiedlichen Ätiologien zu vergleichen und sowohl den Einfluss der Eosinophilie als auch der Ätiologie auf das Chemokinmuster zu untersuchen und zu vergleichen. Nach heutigem Kenntnisstand ist dies die erste systematische Studie, die sich mit dem simultanen Proteinnachweis aller o.g. Chemokine im Gewebe von eosinophilen Nasenpolypen beschäftigt. Insbesondere für Eotaxin-3 Protein gibt es hierzu bislang keine Untersuchungen bei Polyposis nasi.

Alle untersuchten CC- Chemokine konnten in der Patientengruppe und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dabei gab es quantitative Unterschiede in der Proteinkonzentration und in der Anzahl der positiven Proben für jedes Chemokin. Insgesamt war die Proteinkonzentration in den Nasenpolypen der Patientengruppen für die CC- Chemokine Eotaxin, Eotaxin-2, Eotaxin-3 und MCP-4 gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Für RANTES und MCP-3 ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Dieses Ergebnis soll nun für die einzelnen Chemokine diskutiert werden.

Chemokine der Eotaxinfamilie

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Patientengruppe konnten alle 3 Eotaxine auf Proteinniveau im Gewebe nachgewiesen werden. Für alle untersuchten Eotaxine lag der Proteingehalt in der Polypengruppe signifikant über dem der Kontrollgruppe. Die Rangfolge hinsichtlich des Proteingehaltes war dabei in der Patientengruppe: Eotaxin 2 > Eotaxin 3 > Eotaxin.

Während die meisten Chemokine mehrere Zellen aktivieren, besteht ein Charakteristikum der CC-Chemokine der Eotaxinfamilie darin, dass sie überwiegend eosinophile Granulozyten aktivieren. Verschiedene Autoren konnten *in vitro* und *in vivo* die spezifische chemotaktische Potenz aller Eotaxine belegen (51, 74, 79, 80, 102, 131, 157). Nach Identifizierung von Eotaxin als relativ selektivem Aktivator eosinophiler Granulozyten (70) gelang zunächst die Klonierung von Eotaxin-2, das eine chemotaktische Aktivität auf Eosinophile in vergleichbarer Größenordnung aufweist (51). Eotaxin wird u.a. von nasalen Fibroblasten und Epithelzellen in der Zellkultur exprimiert. Auch in Fibroblasten der Haut und Lunge konnte inzwischen mRNA für Eotaxin nachgewiesen werden (12, 149). Darüber hinaus produzieren Fibroblasten große Mengen an Eotaxin Protein. Auch humane epitheliale Zelllinien produzieren Eotaxin (53).

Für beide Chemokine Eotaxin und Eotaxin-2 gelang im Gewebe von Patienten mit Polyposis nasi (69, 130) der Nachweis der Expression und Produktion. Eotaxin-2 konnte zudem mit Hilfe der RT-PCR, *in-situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie im Gewebe von Nasenpolypen (69, 130), im Lungengewebe von Patienten mit Asthma bronchiale allergicum - überwiegend in Zytokeratin⁺-Epithelzellen, CD3T Endothelzellen und CD68⁺ Makrophagen (198) und in der Haut von Atopie- Patchtest- Läsionen atopischer Patienten (199) nachgewiesen werden.

Caversaccio et al. (29) untersuchten den Eotaxin- und Eotaxin-2 Proteingehalt in Nasenpolypen von 8 Patienten und fanden neben einem signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe einen 20-fach erhöhten Gehalt an Eotaxin-2 gegenüber Eotaxin. In den eigenen Untersuchungen wurde hierfür der Faktor 1,6 ermittelt. Die Auswertung erfolgte jedoch in dieser Studie bezogen auf den Gesamtproteingehalt und nicht wie in der Caversaccio- Studie auf die untersuchte Menge Gewebe.

Im Jahr 1999 gelang es dann zwei Forschergruppen unabhängig voneinander ein weiteres Mitglied der Eotaxinfamilie, Eotaxin-3 zu klonieren (80, 157). Eotaxin-3 konnte bislang auf mRNA-Ebene in humanen Nabelschnur-Endothelzellen (157) und in Herz und Ovar identifiziert werden (80). Auf Einzelzellniveau wurde Eotaxin-3 mRNA bisher nur in nasalen und dermalen Fibroblasten (41, 130) nachgewiesen. Zudem konnte mittels LightCycler PCR gezeigt werden, dass alle drei Eotaxine konstitutiv auf mRNA-Ebene in dermalen Fibroblasten exprimiert werden (41). Die Eotaxin-3 mRNA-Expression oder der Proteingehalt im Gewebe von Nasenpolypen wurden bislang nicht untersucht. Damit konnten wir erstmals bei Patienten mit eosinophiler Polyposis nasi und der Kontrollgruppe Eotaxin-3 auf Proteinniveau nachweisen und gleichzeitig alle 3 Eotaxine simultan in Nasenpolypen und Gewebe aus der unteren Nasenmuschel detektieren.

Obwohl die Ähnlichkeit identischer Aminosäuren innerhalb der Eotaxinfamilie gering ist- die Sequenzhomologie beträgt zwischen Eotaxin-2 und Eotaxin nur 39% (51), zwischen Eotaxin-3 und Eotaxin 37%, zwischen Eotaxin-3 und Eotaxin-2 34% (157), besteht das Charakteristikum aller 3 Eotaxine in ihrer engen evolutionären und genetischen Verwandtschaft und ihrer spezifischen Aktivität, ausschließlich über den CC-Chemokinrezeptor CCR3 (51, 79, 80, 157) zu agieren. Hier ergibt sich natürlich die Frage der biologischen Relevanz der drei Eotaxine. Die vorliegenden Daten weisen jedenfalls darauf hin, dass alle 3 Mitglieder der Eotaxinfamilie eine Rolle in der Pathogenese der Polyposis nasi spielen.

RANTES

RANTES- Protein konnte als einziges CC-Chemokin in allen Proben der Patienten- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Der RANTES- Proteingehalt war dabei unter allen untersuchten CC- Chemokinen am höchsten. Jedoch gab es analog zur Untersuchung in der PCR- Studie keinen signifikanten Unterschied im Proteingehalt zwischen der Kontroll- und der Patientengruppe. Ebenfalls korrespondierend zu den kontroversen Ergebnissen für die RANTES mRNA-Expression gilt dies in der Literatur auch für den Nachweis auf Proteinniveau. Unsere Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Caversaccio überein, die ebenfalls hohe aber vergleichbare Proteinlevel in Nasenpolypen und Kontrollen aus der mittleren Nasenmuschel fanden (29). Allen et al. (2) dagegen wiesen in Homogenisaten von Nasenpolypen höhere RANTES-Protein –Level als im Gewebe einer Kontrollgruppe nach. RANTES aktiviert im Gegensatz zu Eotaxin über verschiedene CC-Chemokinrezeptoren, nämlich CCR1, CCR3 und CCR5 Monozyten, T-Lymphozyten, eosinophile und basophile Granulozyten. In Nasenpolypen scheinen Fibroblasten eine Hauptquelle für RANTES zu sein (102, 120, 143). Die eigenen Ergebnisse weisen ähnlich wie die der PCR- Analyse auf eine eher unspezifische Rolle von RANTES in der Genese der Polyposis nasi hin.

MCP-3 und MCP-4

Analog zu RANTES ergab sich auch für MCP-3 kein Unterschied im Proteingehalt der Gewebeproben der Kontroll- und der Patientengruppe. MCP-3 bindet an die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR3. Im Gegensatz dazu konnte für MCP-4, das auch über verschiedene Chemokinrezeptoren wirkt, nämlich CCR2, CCR3 und CCR11 ein solcher signifikanter Unterschied in der Proteinkonzentration festgestellt werden. Beide Chemokine aktivieren vor allem Monozyten und Lymphozyten, in geringerem Anteil auch Eosinophile (15, 74). Über die Proteinkonzentration von MCP-3 und MCP-4 in Nasenpolypen ist in der Literatur wenig bekannt. Wright et al. (193) beschrieben eine erhöhte MCP-3 und MCP-4 Expression

bei Patienten mit chronischer Sinusitis gegenüber Kontrollpersonen. Bartels et al. (102) konnten dagegen keine MCP-3 mRNA-Expression in Nasenpolypen oder Gewebeproben der Concha inferior von Kontrollpersonen feststellen. Dagegen wurde über eine erhöhte MCP3 mRNA- Expression in der Bronchialschleimhaut von Asthmatikern berichtet (66).

Über den Anteil der verschiedenen an den CCR3- Rezeptor bindenden Chemokine bei der Aktivierung eosinophiler Granulozyten ist bislang wenig bekannt. Die wichtige Rolle der Eotaxine demonstriert eine Arbeit von Terada (176): Nach Neutralisierung von Eotaxin mit einem monoklonalen anti-Eotaxin-Antikörper nahm die durch nasale Mukosa- Homogenisate induzierte eosinophile transendotheliale Migration in gleichem Ausmaß ab, wie bei der Behandlung mit einem monoklonalen anti-CCR3-Antikörper. Im Gegensatz dazu kam es durch monoklonale anti-RANTES-, anti-MCP-3- und anti-MCP-4-Antikörper nur zu einer minimalen Inhibierung.

Ergebnis der Korrelationsanalyse

Ingesamt konnten alle untersuchten Chemokine simultan im Gewebe der Patientengruppe und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Korrelationsanalyse ergab zusätzlich eine signifikante zweiseitig positive Korrelation zwischen den Proteinkonzentrationen aller Chemokine, mit Ausnahme von RANTES. Der RANTES-Proteingehalt korrelierte mit keinem der anderen Chemokine.

Es gab jedoch quantitative Unterschiede zwischen den Chemokinen mit folgender Rangfolge hinsichtlich des Proteingehaltes: RANTES > Eotaxin-2 > Eotaxin-3 > Eotaxin > MCP-4 > MCP-3. Angesichts der Vielzahl der involvierten Chemokine stellt sich wiederum die Frage der biologischen Relevanz der verschiedenen Chemokine. Unterschiede in der Relevanz könnten sich durch Unterschiede in der Affinität zu CCR3 und der chemotaktischen Wirkung auf Eosinophile ergeben. Dulkys et al. (41) untersuchten die Affinität zu CCR3 innerhalb der Eotaxingruppe und fanden folgende Reihung: Eotaxin > Eotaxin-3 > Eotaxin-2, wobei Eotaxin-3 ca. 10fach schwächer an CCR3 bindet als Eotaxin. Der in genau umgekehrter Reihenfolge gemessene Proteingehalt der eigenen Studie könnte eine Erklärung dafür sein, dass dadurch die schwächere Bindung an den Rezeptor kompensiert werden könnte. Möglicherweise benutzen Eotaxin-2 und Eotaxin-3 aber auch andere, bislang nicht nachgewiesene Rezeptoren.

Hinsichtlich der Effizienz zeigten die Eotaxine in der Arbeit von Dulkys (41) bei gleicher Konzentration die gleiche chemotaktische Wirkung auf Eosinophile, die Wirkung der anderen CC-Chemokine war dagegen schwächer: Eotaxin-3 = Eotaxin = Eotaxin-2 > RANTES >

MCP-4. Zahlreiche Studien haben zudem belegt, dass Chemokine nicht nur chemotaktisch wirken, sondern auch andere Effektorfunktionen eosinophiler Granulozyten aktivieren (41, 45-47). So können die CC-Chemokine Eotaxin, Eotaxin-2 und Eotaxin-3, RANTES, MCP-3 und MCP-4 die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus eosinophilen Granulozyten hervorrufen (45-47) und die Aktinpolymerisation eosinophiler Granulozyten bewirken. Diese ist sowohl Voraussetzung für die Zellmigration als auch für den Transport intrazellulärer Proteine wie beispielsweise der NADPH-Oxidase, das Schlüsselenzym für die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies ist. Auch hier konnten in der Literatur für die einzelnen CC-Chemokine unterschiedliche Aktivierungsprofile in bezug auf die Effektorfunktionen eosinophiler Granulozyten aufgezeigt werden. Während die Eotaxine hinsichtlich dieser Effekte eine ähnliche Potenz aufwiesen, gab es Unterschiede im Vergleich zu den anderen CC-Chemokinen. Für die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus eosinophilen Granulozyten konnte folgende Reihenfolge hinsichtlich der Potenz festgestellt werden: Eotaxin = Eotaxin-2 > Eotaxin-3 = MCP-3 = MCP-4 > RANTES (41, 46). Hinsichtlich der Aktinpolymerisation und der Chemotaxis zeigte sich folgende Reihenfolge in der Potenz: Eotaxin = Eotaxin-2 = Eotaxin-3 = RANTES > MCP-3 = MCP-4 (41,46).

Insgesamt ist das Chemokinsystem ein extrem redundantes System mit multiplen Liganden-Bindungsmustern für verschiedene Rezeptoren. Die erhöhten Proteinlevel fast aller untersuchten Chemokine und die nachgewiesene Korrelation zwischen den Proteinkonzentrationen der einzelnen Chemokine weisen dabei eher auf eine komplexe Kooperation als auf den spezifischen Part eines einzelnen Chemokins bei der Entstehung der Eosinophilie und der Polyposis nasi hin. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang wiederum die im Vergleich zu den anderen Chemokinen sehr ähnlichen Proteinlevel innerhalb der Eotaxinfamilie.

Chemokinmuster- Abhängigkeit von der Ätiologie und/ oder der Eosinophilie

Es sollen nun Zusammenhänge zwischen der Proteinkonzentration der einzelnen Chemokine im Gewebe, möglicherweise zugrundeliegenden Ätiologien der Polyposis nasi und der Anzahl der Eosinophilen im Gewebe diskutiert werden. Hierzu wurde zunächst in 3 verschiedenen Patientengruppen die Proteinkonzentration der einzelnen Chemokine verglichen: in der Gruppe ohne Allergie und ASS- Intoleranz, der Gruppe der Allergiker und der der ASS- Intoleranten. Im Gegensatz zu der mRNA- Studie galt die Zugehörigkeit zu den einzelnen Gruppen als Auswahlkriterium für die Studie.

Dabei war im Polypengewebe der ASS- Intoleranten im Vergleich zu den nicht Allergikern eine signifikant höhere Proteinkonzentration für Eotaxin, Eotaxin-2 und Eotaxin-3 messbar.

Für Eotaxin-2 war dieser Unterschied auch im Vergleich zu allen anderen Patienten und für Eotaxin-3 sogar zu den Allergikern und allen anderen Patienten signifikant. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von Pods et al. (130) überein, die eine erhöhte Expression und Proteinsynthese in eosinophilen Nasenpolypen von Patienten mit ASS- Intoleranz und Asthma für Eotaxin und Eotaxin-2 im Vergleich zu Patienten ohne diese Begleitkrankheiten nachweisen konnten. Andere Autoren beschrieben einen erhöhten Proteingehalt in Nasenpolypen von Allergikern im Vergleich zu Patienten ohne Allergie für RANTES, MCP-4 und Eotaxin- dagegen nicht für MCP-3 (13, 101). Allen et al. (2) hingegen fanden einen solchen Unterschied im RANTES-Proteingehalt zwischen Patienten mit und ohne Allergie nicht, sondern nur in Nasenpolypen von Patienten mit Asthma bronchiale .

Während es in der vorliegenden Studie hinsichtlich der RANTES-Proteinkonzentration keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gab, zeigten sich wiederum zwischen den ASS- Intoleranten und den nicht allergischen Patienten für MCP-3 und für MCP-4 sogar zwischen den ASS- Intoleranten im Vergleich zu den nicht allergischen Patienten und den Allergikern signifikante Unterschiede in der Proteinkonzentration der untersuchten Nasenpolypen.

Um diese Unterschiede weiter zu analysieren, wurde zunächst die Anzahl der Eosinophilen in den Gewebeproben innerhalb der einzelnen Gruppen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass es zwischen allen untersuchten Gruppen hochsignifikante Unterschiede bezüglich der Anzahl der Eosinophilen im Gewebe gab. Die Reihenfolge in bezug auf die Anzahl der Eosinophilen im Gewebe war: Patienten mit ASS- Intoleranz > allergische Patienten > nicht allergische Patienten.

Da offenbar die signifikant erhöhte Zahl an Eosinophilen im Zusammenhang mit dem Ergebnis der Chemokin- Proteinbestimmung gesehen werden muss- die Gruppe mit der höchsten Eosinophile – die ASS- Intoleranten wies auch die höchsten Proteinwerte für die meisten Chemokine auf, wurde nun dieser Zusammenhang weiter untersucht:

Für die Chemokine Eotaxin, Eotaxin-2 und Eotaxin-3 sowie MCP-4 war die Korrelation mit der Anzahl der Eosinophilen auf dem 0,01- Niveau zweiseitig signifikant, für MCP-3 immerhin noch auf dem 0,05- Niveau. Im Gegensatz dazu zeigte sich für RANTES keine Korrelation zur Anzahl der Eosinophilen im Gewebe. Shin et al. (156) berichteten über eine solche Korrelation der Eosinophilen zur Eotaxin mRNA-Expression. Wright et al. (193) fanden heraus, dass das Expressionslevel von MCP-3 und MCP-4 in Nasenpolypen ebenfalls mit der Anzahl der Eosinophilen und zusätzlich mit CD4⁺ T-Zellen korrelierte.

Die eigenen Ergebnisse weisen auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Anzahl der Eosinophilen und der Konzentration einzelner Chemokine im Gewebe hin. Für die Eotaxin-familie ist dies wahrscheinlich eine Folge der ausschließlichen Interaktion mit dem Chemokin-rezeptor CCR3 und der relativ selektiven Expression dieses Rezeptors auf eosinophilen Granulozyten. Die Korrelation zwischen der Anzahl der Eosinophilen und der Proteinkonzentration der Chemokine sowie der signifikante Unterschied in bezug auf die Eosinophilie zwischen den Gruppen lassen folgende Schlussfolgerung zu:

Offenbar gibt es einen wechselseitigen engen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Eosinophilen und der Proteinkonzentration der einzelnen Chemokine im Gewebe. Patienten mit ASS- Intoleranz haben dabei die höchste Eosinophilie und demzufolge gegenüber den anderen Gruppen auch höhere Proteinkonzentrationen der entsprechenden Chemokine. Einerseits migrieren bei höherer Konzentration dieser Chemokine mehr Eosinophile ins Gewebe. Zusätzlich ist jedoch auch bekannt, dass eosinophile Granulozyten selbst in der Lage sind, unter bestimmten Umständen Chemokine wie Eotaxin, MIP-1 α , RANTES und IL-8 zu produzieren (117, 197). Für Eotaxin-2 und Eotaxin-3 gibt es dazu bislang keine Untersuchungen – jedoch sind auch sie mögliche Kandidaten. Damit könnten eosinophile Granulozyten auch ihren eigenen Nachschub rekrutieren und zusätzlich andere Zellen wie T Lymphozyten, Monozyten, neutrophile und basophile Granulozyten anlocken.

Zusammenfassung

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass vor allem den CC- Chemokinen Eotaxin, Eotaxin-2 und Eotaxin -3 sowie MCP-4 eine spezifische Rolle in der Pathogenese der Polyposis nasi zukommt. An der Entstehung der Eosinophilie ist offenbar auch MCP-3 beteiligt, da die Proteinkonzentration mit der Anzahl der Eosinophilen korrelierte, jedoch war MCP-3 in der Kontrollgruppe in vergleichbarem Ausmaß nachweisbar. Obwohl die RANTES-Proteinkonzentration unter allen untersuchten CC- Chemokinen am höchsten war und RANTES vergleichbare Effekte auf Eosinophile hat wie die Eotaxine, scheint dieses Chemokin zumindest in der Genese der Polyposis nasi eine eher unspezifische Rolle für Eosinophile zu spielen.

Die Ergebnisse weisen weiter auf einen wechselseitigen engen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Eosinophilen und der Konzentration der einzelnen Chemokine im Gewebe hin. Der simultane Nachweis aller untersuchten Chemokine in den einzelnen Gewebeproben spricht gegen die Vermutung, dass einzelne dieser Chemokine in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Die simultane Expression verschiedener Chemokine oder das Erreichen einer bestimmten Konzentrationsschwelle ist möglicherweise eine Voraussetzung für den

starken Eosinophileneinstrom. Es ist anzunehmen, dass hier nicht einzelnen Chemokinen bestimmte Aufgaben zukommen, sondern es vielmehr nur in der Komplexität des Zusammenspiels der verschiedenen Chemokine, Chemokinrezeptoren und Zellen zur Ausprägung der Gewebeseosinophilie kommt. Ab einer bestimmten Konzentrationsschwelle der Chemokine und oder einem gewissen Grad der Gewebeseosinophilie trägt sich das System dann über autokrine Regulationsmechanismen. Der initiale Mechanismus, der zur andauernden Akkumulation von Eosinophilen und Entzündungsmediatoren und schließlich zur andauernden Propagation der Erkrankung führt, ist nach wie vor nicht bekannt. Die Untersuchung einzelner Mediatoren ist jedoch wichtig für das Verständnis wichtiger Schritte in der Pathogenese. Die Untersuchung einzelner Komponenten des Systems ist zudem für die Formulierung neuer therapeutischer Ziele unabdingbar.

Therapeutische Konsequenzen

Die therapeutische Strategie für alle Erkrankungen, die mit einer Gewebeeosinophilie einhergehen, ist die Suche nach einer spezifischen selektiven Behandlungsmöglichkeit, die zu einer verminderten Invasion eosinophiler Granulozyten und konsekutiv zu einer Vermeidung der Gewebsschädigung sowie der Propagation der Entzündungsreaktion führt. Da Chemokine und Chemokinrezeptoren bei der Rekrutierung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten eine besondere Rolle spielen, könnten Substanzen, die diese antagonisieren oder blockieren, von besonderem Interesse hinsichtlich eines neuen Therapiekonzeptes bei Erkrankungen mit Hypereosinophilie sein. Sie wären wesentlich zielgerichteter einzusetzen als andere Pharmaka, wie beispielsweise Antihistaminika oder Steroide.

Als herausragendes therapeutisches Ziel zur Behandlung der Polyposis nasi bietet sich hier, auch in Auswertung der eigenen Ergebnisse die Inhibierung/ Antagonisierung des CCR3-Rezeptors an.

Die Erforschung der Chemokinrezeptor-Antagonisten wurde zunächst aufgrund der enormen Bedeutung der Chemokine und Chemokinrezeptoren für die HIV-Infektion vorangetrieben (65, 190). So wurden verschiedene Chemokinrezeptor-Antagonisten wie Met-RANTES, AOP-RANTES und zahlreiche andere durch die Modifikation im aminoterminalen Ende konstruiert. (173, 186, 189). Diese Region des Chemokins ist für die Bindung am Rezeptor und die Entfaltung der biologischen Aktivität entscheidend (186, 189). Met-RANTES bindet an CCR1 und CCR3 und konnte in entsprechenden Studien die natürlichen Liganden kompetitiv hemmen. Nach Stimulation mit den CC-Chemokinen RANTES, MCP-3 und Eotaxin inhibierte Met-RANTES spezifisch die Chemotaxis, Aktinpolymerisation und Freisetzung intrazellulären Kalziums sowie toxischer reaktiver Sauerstoffspezies (48). Damit stellt Met-RANTES einen potenten, effektiven und spezifischen CC-Chemokinrezeptorantagonisten dar, der die Einwanderung und das toxische Potential eosinophiler Granulozyten blockiert. Darüber hinaus konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass Met-RANTES die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in die Haut nach Injektion mit murinem Eotaxin blockiert (173). Nachteilig ist jedoch, dass sich Peptide schlecht für eine orale oder topische Therapie eignen. Auch der gegen den CC-Chemokinrezeptor CCR3 gerichtete monoklonale Antikörper 7B11 stellt eine interessante Therapiemöglichkeit dar. In ersten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieser Antikörper ein spezifisches Epitop des CCR3 erkennt (131), dass auch die Bindungsstelle für die physiologischen Liganden wie Eotaxin, RANTES, und MCP-4 zu sein scheint. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der 7B11 -Antikörper auch das toxische Potential eosinophiler Granulozyten wie die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies

nach Stimulation mit Eotaxin und Eotaxin-2 inhibiert (46, 47). Auch hier scheint jedoch eine therapeutische Anwendung schwierig.

Eine neue Form der Chemokinrezeptor-Antagonisten ist deshalb Gegenstand aktueller Forschungsvorhaben zahlreicher Pharmaunternehmen. Hierbei handelt es sich um sogenannte kleinmolekulige Chemokinrezeptor-Antagonisten, die keine Peptide darstellen (17, 65). Besonderes Interesse besteht auch hier in der Suche nach Chemokinrezeptor-Antagonisten gegen den CC-Chemokinrezeptor CCR3. Verschiedene Firmen haben hier potentielle CCR3-Antagonisten in Aussicht, die sich von den Piperidinen, Piperazinen oder Pyrrolidinen ableiten (17). Der Vorteil dieser kleinmolekuligen Chemokinrezeptor-Antagonisten besteht darin, dass sie sich wesentlich besser für eine orale oder topische Applikation eignen, da es sich nicht um Peptide, sondern um hydrophobe und damit gut resorbierbare Komponenten handelt. Ob sich daraus eine Therapie für eosinophilen-dominierte Erkrankungen ableiten lassen könnte, bleibt abzuwarten. Jedoch besteht hier ein hohes Potential für die weitere Forschung. Gerade die topische Anwendung eines CCR3-Chemokinrezeptorantagonisten könnte für eine Behandlung der Polyposis nasi von großem Interesse sein.

5.3. Die allergische Immunantwort und ihr Einfluss auf die Zusammensetzung der Sekundärfollikel und die Immunglobulinsynthese in humanen Gaumentonsillen

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob sich die Tonsillen Betv1-allergischer Patienten hinsichtlich der Zusammensetzung der Sekundärfollikel und der Immunglobulinsynthese von Tonsillen nicht allergischer Patienten unterscheiden. Da es sich bei beiden Gruppen um Patienten mit chronisch rezidivierender Tonsillitis handelte, wurden die Ergebnisse zusätzlich mit Tonsillenschnitten gesunder Kontrollpersonen verglichen.

Durch ihre exponierte Lage am Eingang zum Respirations- und Gastrointestinaltrakt mit Kontakt zu zahlreichen exogenen Antigenen (Bakterien, Allergene Nahrungsbestandteile u.a.) kommt den Tonsillen als sekundäres lymphatisches Organ eine Schlüsselrolle bei der Generierung der Immunantwort zu (20, 21, 23, 24, 118, 129, 136, 182). Die Tonsillen gehören, wie der gesamte Waldeyer'sche Rachenring zum mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT)(122, 125-127). Während die IgE-vermittelte Freisetzung von Mediatoren als immunopathologische Grundlage für die Typ I Reaktion beim Allergiker gilt, ist über die Rolle Allergen-spezifischer Antworten anderer Immunglobulin Isotypen wie beispielsweise IgA aus immunhistochemischen Untersuchungen bislang nur wenig bekannt.

Die histologische Auswertung der Tonsillenschnitte der Betv1 allergischen und der nicht allergischen Patientengruppe hat gezeigt, dass beide Gruppen hinsichtlich der morphologischen Strukturen und der Anzahl und Größe der Sekundärfollikel absolut vergleichbar waren. In allen Tonsillenschnitten der Patientengruppe konnte, als Zeichen einer chronischen Entzündung, eine stärkere Zerklüftung der Tonsillenoberfläche mit herdförmigen Epitheldefekten nachgewiesen werden. Die Tonsillenschnitte der gesunden Kontrollpersonen wiesen dagegen fissurähnliche Krypten mit intaktem Epithel und im Vergleich zur Patientengruppe eine geringere Anzahl an Sekundärfollikeln kleinerer Größe auf.

Die charakteristische mikroanatomische Architektur und die typische B- und T-Zellverteilung in den verschiedenen Kompartimenten der Tonsille war bei allen untersuchten Tonsillenschnitten vergleichbar. Für die einzelnen Mikrokompimente (23, 118), d.h. das Kryptenepithel, die extrafollikuläre Region und die Sekundärfollikel mit Mantelzone und Keimzentrum werden nun die Ergebnisse diskutiert:

In der Region der Krypten und des Epithels waren CD20⁺, CD38⁺ und CD4⁺ Zellen in allen untersuchten Tonsillenschnitten ohne Unterschiede in der Färbung nachweisbar. Hier erfolgt der Erstkontakt mit den exogenen Antigenen, die die

Mundhöhle passieren und die Immunantwort wird eingeleitet (21, 54, 118). In der extrafollikulären Region konnten in allen Tonsillenschnitten vor allem CD4⁺ Zellen angefärbt werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Allergie und /oder rezidivierende Entzündungen keinen Einfluss auf Anzahl und typische Verteilung CD20⁺, CD38⁺ und CD4⁺ Zellen im Kryptenepithel und der extrafollikulären Region haben. Auch in gesunden Tonsillen kommt es durch die permanente Antigenexposition zu einer kontinuierlichen Stimulation der B- und T- Zellen (14, 129, 169). Die Ergebnisse sind Ausdruck der permanenten Aktivierung der Tonsillen bei allen Patienten und den gesunden Kontrollpersonen.

In das lymphatische Grundgewebe der Tonsille sind subepithelial, umgeben von den extrafollikulären T-Zellregionen zahlreiche Sekundärfollikel eingestreut. Diese runden oder auch elliptischen Sekundärfollikel sind Orte intensiver B Zell Reifung und ihrer Differenzierung zu Effektorzellen (20, 24, 97, 128, 129). Die Sekundärfollikel enthalten die Keimzentren und setzen sich aus einer dunklen Zone mit einer großen Anzahl proliferierender B-Zellen (Blasten), aus einer hellen Zone, die vor allem Zentrozyten enthält und der Mantelzone mit naiven B-Zellen zusammen. Als Gemeinsamkeit konnte festgestellt werden, dass die Follikel aller Tonsillenschnitte CD20⁺, CD38⁺ und CD4⁺ Zellen enthielten.

Die Größe der Sekundärfollikel in den Tonsillenschnitten der Betv1 allergischen und nicht allergischen Patienten war in dieser Studie vergleichbar. Im Gegensatz zu den gesunden Kontrollen waren Größe und Anzahl der Sekundärfollikel bei beiden Patientengruppen, offenbar durch die chronische exogene Antigenstimulation deutlich erhöht. Die Kontrollpersonen hingegen zeigten kleinere Sekundärfollikel in geringerer Anzahl.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen konnte durch die Ki67 Färbung sichtbar gemacht werden (25). Bei den Betv1 allergischen und den nicht allergischen Patienten waren Ki67⁺ Zellen besonders in der dunklen Zone konzentriert. Im Gegensatz dazu konnte in den Tonsillenschnitten der Kontrollpersonen nur eine sehr geringe Anzahl Ki67⁺ Zellen in den Follikeln angefärbt werden. Die hohe Anzahl proliferierender Zellen in den Keimzentren der Tonsillenschnitte der Patienten widerspiegelt die durch die gesteigerte Antigenexposition induzierte andauernde Reaktion und folgende Proliferation.

Die Formierung der Keimzentren in den Tonsillen reflektiert die durch exogene Antigene induzierte Aktivierung (21, 22, 83, 129). Somit könnte die erhöhte Anzahl und Größe der Follikel bei beiden Patientengruppen gegenüber den Tonsillen der gesunden Kontrollen als Folge der chronischen exogenen Antigenstimulation bewertet werden. Dabei scheint es keine

Rolle zu spielen, ob ein Patient mit chronisch rezidivierender Tonsillitiden zusätzlich Betv1-allergisch ist.

Ein weiteres wichtiges Ziel der Studie war die Untersuchung des Einflusses der Betv1-spezifischen Immunantwort auf die Expression und Verteilung IgA enthaltener Plasmazellen in der Tonsille. Die Plasmazellen der Tonsille sind in der Lage zur Bekämpfung und zur Abwehr von Antigenen Antikörper aller 5 Immunglobulin-Klassen (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) zu produzieren (22, 82). IgA verhindert die Adhärenz von Bakterien und Viren an das Epithel und kann zusätzlich Viren intrazellulär neutralisieren und die Pathogene und ihre Produkte zurück ins Lumen transportieren (23). Die Induktion von spezifischem sekretorischem IgA nach Antigenexposition der Tonsille konnte im Tierversuch bei Ratten nachgewiesen werden (67). Die ähnliche Verteilung von IgA1 und IgD Lymphozyten in der Tonsille und der Nasenschleimhaut stützt zudem die Annahme, dass in den Keimzentren der Tonsille generierte Plasmazellen in die Nasenschleimhaut wandern (16, 20, 22). In den Tonsillenschnitten der nicht allergischen Patienten und der Kontrollpersonen ließ sich eine vergleichbare Anzahl IgA-positiver Zellen mit typischer Plasmazellmorphologie detektieren. Die IgA-positiven Plasmazellen waren vor allem in der extrafollikulären Region und im Bereich der Krypten anfärbbar, wobei ihre Anzahl in den Tonsillenschnitten der Betv1 allergischen Patienten gegenüber den nicht-Allergikern und den gesunden Kontrollpersonen deutlich reduziert erschien. Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Reduktion IgA-positiver Plasmazellen in der Tonsille die Fähigkeit des Organismus zum Aufbau einer Immunabwehr gegen Allergene beeinträchtigt.

Zusammenfassend zeigten die Tonsillen Betv1 allergischer und nicht allergischer Patienten vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Anzahl der Sekundärfollikel, der Zellkomposition der Follikel und der anderen Kompartimente sowie der Anzahl proliferierender Zellen in den Follikeln. Die erhöhte Anzahl der Follikel und der höhere Anteil an proliferierenden Zellen in den Keimzentren der Tonsille gegenüber den Kontrollpersonen reflektiert möglicherweise die andauernde Keimzentren-Reaktion, die durch eine erhöhte Antigen-Stimulation induziert wird. Die Tonsillenschnitte der Kontrollpersonen und beider Patientengruppen waren jedoch absolut vergleichbar hinsichtlich der typischen morphologischen Strukturen und der B- und T Zell Verteilung in den verschiedenen Mikrokompartmenten. Die verminderte Expression und Verteilung von IgA-positiven Plasmazellen in den Tonsillenschnitten der Betv1 allergischen Patienten weist auf einen möglichen Einfluss der Tonsille im

Rahmen der Immunantwort auf Allergene hin. Die Reduktion IgA-positiver Plasmazellen bei den Betv1 allergischen Patienten könnte zu einer reduzierten Immunantwort gegen Allergene führen.