

3. Patienten und Methoden

In die 3 Studien wurden insgesamt 86 Patienten eingeschlossen, die sich im Zeitraum vom 01.08.1999 bis zum 31.12.2003 zu einer Behandlung in der HNO- Klinik der Charité, Campus Virchow Klinikum vorstellten. Die Studien wurden entsprechend der Deklaration von Helsinki durchgeführt und waren von der Ethik- Kommission der Charité genehmigt.

3.1. Patienten

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

Hierfür wurden Nasenpolypen von 30 Patienten (ØAlter 44,8 Jahre, 19 männlich/ 11 weiblich) mit chronisch hyperplastischer Pansinusitis und Gewebeproben aus der Concha inferior von 10 Patienten einer Kontrollgruppe (ØAlter 46 Jahre, 7 männlich/ 3 weiblich) während endonasaler Operationen entnommen.

Evaluierung der Patienten

Anamnese: chronische Sinusitis (Tab.1.1.)

Fragebogen (Dauer der Erkrankung, Anzahl der Vor- OP's etc., Tab. 3.1.)

HNO- Status mit Nasenendoskopie

NNH-CT

Allergietest (Prick/ RAST)

ASS- Intoleranz: Anamnese, bei fraglicher oder leerer Anamnese nasale/ orale Provokation

Kriterien der Patientenauswahl

Für die Studie wurden folgende Patienten mit chronischer Sinusitis ausgewählt:

Nasenendoskopie: sichtbare Polyposis nasi

NNH-CT: Pansinusitis, Lund-McKay Score >14 (Tab. 3.2.)

Histologie: >100 Eosinophile /HPF

Keine nasalen oder systemischen Steroide bis 2 Wochen präoperativ

Entsprechend den Testergebnissen (PRICK, RAST, nasale/orale ASS-Provokation) erfolgte dann eine Unterteilung in 4 Patientengruppen: Keine Allergie/ASS-Intoleranz n=10; Allergiker n=9; Allergiker und ASS-Intoleranz n=5 ; ASS-Intoleranz n=6.

Kontrollgruppe

Anamnese: keine Sinusitis, Allergie, ASS-Intoleranz, kein Asthma, keine Vor-OP's

Nasenendoskopie: ohne pathologischen NNH- Befund

Allergietest (Prick): negativ, Histologie: keine Eosinophilie

CCR3- bindende Chemokine bei eosinophiler Polyposis nasi

In die Studie wurden insgesamt 32 Patienten eingeschlossen. Untersucht wurden Nasenpolypen von 24 Patienten (ØAlter 44,5 Jahre; 15 männlich/ 9 weiblich) mit chronischer Sinusitis und Gewebeproben aus der Concha inferior von 8 Patienten einer Kontrollgruppe (ØAlter 41,3 Jahre; 5 männlich/ 3 weiblich), die während endonasaler Operationen entnommen worden waren.

Evaluierung der Patienten

Anamnese: chronische Sinusitis (Tab.1.1.)

HNO- Status mit Nasenendoskopie

NNH-CT

Allergietest (Prick/ RAST)

ASS- Intoleranz: Anamnese, bei fraglicher oder leerer Anamnese nasale/ orale Provokation

Kriterien der Patientenauswahl

Für die Studie wurden folgende Patienten mit chronischer Sinusitis ausgewählt:

Nasenendoskopie: Polyposis im Siebbein sichtbar

NNH-CT: Kriterien der chronischen Sinusitis

Histologie: Eosinophilie im Gewebe

Keine nasalen oder systemischen Steroide bis 2 Wochen präoperativ

Entsprechend den Testergebnissen (PRICK, RAST, nasale/orale ASS-Provokation) erfolgte eine Unterteilung in 4 Patientengruppen: Keine Allergie/ASS-Intoleranz n=8; Allergiker n=8; ASS-Intoleranz n=8.

Kontrollgruppe

Anamnese: keine Sinusitis, Allergie, ASS-Intoleranz, kein Asthma, keine Vor-OP's

Nasenendoskopie: ohne pathologischen NNH- Befund

Allergietest (Prick): negativ

Histologie: keine Eosinophilie

Patientendaten →					Datum: der Anamnese	
					OP-Datum:	
Symptome	chron. NAB <input type="checkbox"/>	retronasaler Sekretfluss <input type="checkbox"/>	Juckreiz <input type="checkbox"/>	frontale Cephalgien <input type="checkbox"/>	Niesreiz <input type="checkbox"/>	Fließ- schnupfen <input type="checkbox"/>
Krankheitsdauer			Jahre:		Monate:	
Vor-OPs im Bereich der Nase		Conchotomie <input type="checkbox"/> Jahr:	SPL <input type="checkbox"/> Jahr:	FESS <input type="checkbox"/> Jahr:	andere: Jahr:	
Medikamente	Antihistaminika		Steroide		nasale Medikation	andere:
innerhalb der letzten 2 Monate	nasal <input type="checkbox"/>	systemisch <input type="checkbox"/>	Nasal <input type="checkbox"/>	systemisch <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
bis 2 Wochen vor OP	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
welche:						
bekannte Allergien und Intoleranzen:						
Allergische Erkrankungen	Rhino- konjunktivitis <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja	Asthma br. <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja	Neurodermitis <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja	Aktuell allerg. Beschwerden <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja	Heuschnupfen <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja	
Pricktest						
Histamin			Roggen			
Kontrolle			Beifuß			
Hasel			Dermato. pter.			
Erle			Dermato. far.			
Birke			Hund			
Gräser			Katze			
CT-Befund:						
Nasenendoskopie:						
OP-Befund:						
Histologie:						

Tab. 3.1. Fragebogen zur Patientenevaluierung

LUND- MACKAY CT STAGING SYSTEM

Patientendaten:		Normalbefund	partielle Verschattung	Totalverschattung
Ant. Ethmoid	R	0	1	2
	L	0	1	2
Post. Ethmoid	R	0	1	2
	L	0	1	2
S. maxillaris	R	0	1	2
	L	0	1	2
S. frontalis	R	0	1	2
	L	0	1	2
S. sphenoidalis	R	0	1	2
	L	0	1	2
			keine Obstruktion	Obstruktion
Ostiomeataler	R		0	2
Komplex	L		0	2
Gesamt Score:				

Tab. 3.2. Lund-MacKay- CT Staging- System (93)

Die allergische Immunantwort und ihr Einfluss auf die Zusammensetzung der Sekundärfollikel und die Immunglobulinsynthese in humanen Gaumensillien

In die Studie wurden insgesamt 14 Patienten eingeschlossen, die sich zur Tonsillektomie in der HNO- Klinik der Charité, Campus Virchow Klinikum vorstellten.

Anamnestisch waren rezidivierende antibiotikpflichtige Tonsillitiden (mind. 4x/ Jahr) über einen Zeitraum von 2 bis 10 Jahren zu eruieren. Die Patienten waren ansonsten gesund, insbesondere lagen keine autoimmunologischen Erkrankungen vor. Keiner der Patienten nahm regelmäßig Medikamente.

Entsprechend den Ergebnissen im PRICK- und RAST- Test wurden die Patienten in eine Betv1 (*Betula verrucosa 1*)-positive allergische Gruppe (n=7, ØAlter 35 Jahre, 4 männlich/ 3 weiblich) und eine nicht allergische Patientengruppe (n=7, ØAlter 33,8 Jahre, 2 männlich/ 5 weiblich) eingeteilt. Die beiden gesunden Tonsillen wurden von Herrn Dr. Jecker (HNO- Klinik der Universitätsklinik in Mainz) zur Verfügung gestellt.

3. 2. Methoden

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

Präparation der Gewebeproben

Ein Teil der Probe wurde für die spätere histologische Beurteilung der Eosinophilie in Formalin fixiert, der andere wurde in flüssigem NO₂ schockgefroren und bis zur RNA-Extraktion bei -70°C gelagert.

Histologische Untersuchung

Nach Formalinfixierung der Gewebeproben wurden Paraffinschnitte hergestellt und in Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Der Grad der Eosinophilie wurde semiquantitativ bestimmt, indem die Zahl eosinophiler Granulozyten (Eos) bei 400facher Vergrößerung in mindestens 5 HPF- (high power field) Gesichtsfeldern analysiert wurde. Für die Studie wurden nur Gewebeproben mit hoher Eosinophilie ausgewählt. Als eosinophiler Polyp wurde ein Polyp mit >100Eos/HPF definiert (13).

RNA Isolation/ Real-Time TaqManPCR

Die Gesamt- RNA wurde nach der modifizierten Methode von Chomczynski und Sacci (33) isoliert, spektrophotometrisch quantifiziert und auf ihre Reinheit überprüft. Jeweils 1µg gesamt-RNA wurde mit dem cDNA-Synthese Kit (Roche) nach angegebenem Protokoll in cDNA umgeschrieben. Die amplifizierte cDNA wurde dann für die relative quantitative Evaluierung der CCR3, Eotaxin, RANTES, IL-4, IL-5, IL-10 und IFN-γ Genexpression eingesetzt, die mit der Real Time-TaqMan PCR- Technologie erfolgte (68, 88).

TaqMan PCR

Die PCR-Analyse erfolgte nach dem Pre-developed TaqMan® Assay reagents Gene Expression Quantification Protocol (P/N 4310255; Applied Biosystems, Foster City, CA) unter Verwendung eines GeneAmp® 5700 Sequence Detection Systems (PE Applied Biosystems®). Alle Primer und Sonden der Zielsequenzen (PE Applied Biosystems) waren entsprechend optimiert, die Sonden waren an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff FAM (6-carboxy-fluoreszin) markiert und an ihrem 3'-Ende mit einem Quencher Farbstoff TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamin).

Ziel-Gen-Expression

Es wurden jeweils 25µl PCR- Mixtur eingesetzt. Diese enthielt für die jeweils zu untersuchenden Zielsequenzen jeweils 10,25 µl Rnase freies H₂O, 12,5 µl TaqMan®

Universal Master Mix, 1,25 µl Target Primer and Probe und 1 µl cDNA-Probe oder Rnase freies H₂O (NTC), alle Reagenzien: Pre-developed TaqMan® Assay Reagents Kits, PE Applied Biosystems.

Housekeeping –Gen-Expression

Der HPRT-PCR-Mix enthielt jeweils 4,5 µl Rnase freies H₂O, 12,5 µl TaqMan® Universal Master Mix, 6 µl Primer-Mix (0,75 µl HPRT FW, 0,75 µl HPRT Rev , 4,5 µl Rnase freies H₂O), 1 µl Sonde und 1 µl cDNA-Probe oder Rnase freies H₂O (NTC). Die Primer Sequenzen waren: HPRT FW: 5'-AGT CTG GCT TAT ATC CAA CAC TTC G-3'; HPRT Rev: 5'-GAC TTT GCT TTC CTT GGT CAG G-3' (metabion) und für die Sonde HPRT 5'-TTT-CAC-CAG-CAA-GCT-TGC-GAC-CTT-GA-3' (Eurogentec). Die Amplifikation erfolgte für alle Proben nach dem gleichen Protokoll: 2 min bei 50°C, 10 min bei 95°C, 40 Zyklen Denaturierung (15s bei 95°C) und Annealing (1min bei 60°C).

Datenanalyse - Relative Quantifizierung durch die vergleichende C_T Methode

In dieser Studie wurde der Gehalt des exprimierten Zielparameters mit der vergleichenden C_T Methode bestimmt (68, 88). Der Parameter C_T (threshold cycle) ist definiert als Anzahl der Zyklen, bei der entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt die Veränderung der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe eine festgelegte Schwelle überschreitet. Die jeweilige Zielsequenz lässt sich dann normalisiert mit einer endogenen Referenz (HPRT) und relativ zu einem Kontrollgewebe (Concha inferior) wie folgt berechnen:

$$X_{N,C} = 2^{-\Delta \Delta C_T}, \text{ wobei } \Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,S} - \Delta C_{T,C};$$

$\Delta C_{T,S}$ Mittelwert der Proben der Patienten normalisiert mit der endogenen Referenz; ($C_{T,S} - C_{T,HPRT}$),

$\Delta C_{T,C}$ Mittelwert der Proben der Kontrollgruppe normalisiert mit der endogenen Referenz ($C_{T,C} - C_{T,HPRT}$).

Der Wert $2^{-\Delta \Delta C_T}$ gibt den n-fachen- Unterschied der Expression des Zielparameters relativ zur Kontrollgruppe an.

Für die statistische Auswertung wurde zur Festlegung der Rangfolge hinsichtlich der Expression jeder einzelnen Probe (Kontroll- und Patientengruppe) jeweils der ΔC_T Wert ($C_{T,S} - C_{T,HPRT}$ bzw. $C_{T,C} - C_{T,HPRT}$) gebildet. Die Expression korreliert mit dem $-(\Delta C_T)$ - Wert. Die Darstellung dieser Werte aller Proben (Kontroll- und Patientengruppe) erfolgte in Box-Plots.

CCR3- bindende Chemokine bei eosinophiler Polyposis nasi

Präparation der Gewebeproben

Eine Hälfte der Probe wurde für die histologische Beurteilung der Eosinophilie in Formalin fixiert, die andere wurde in flüssigem NO₂ schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Histologische Untersuchung, Zählen der Eosinophilen

Nach Formalinfixierung der Gewebeproben wurden Paraffinschnitte hergestellt und in Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Die eosinophile Entzündungsreaktion wurde semiquantitativ analysiert indem bei einer 400-fachen Vergrößerung von 2 unabhängigen Untersuchern in jeweils 5 high power-fields (5 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung) die eosinophilen Granulozyten ausgezählt wurden (71).

Aus dem anderen Material erfolgte mittels ELISA die Bestimmung der Proteinkonzentration (7,139):

Homogenisierung

Die Proben wurden zunächst gewogen und zerkleinert und dann in einem Glas-Teflon Homogenisator (Janke und Kunkel, IKA Labortechnik) in eiskaltem 0,1 molaren PBS-Puffer unter Zusatz eines Protease Inhibitor Cocktails (Complete, Roche Mannheim) homogenisiert. Bei 4°C wurden die Proben zentrifugiert (3000 rpm, 10 Minuten) und die aliquotierten Überstände (250 µl) bei -70°C eingefroren.

ELISA-Untersuchung (enzyme-linked immunosorbent assay):

Die Untersuchung der spezifischen Proteinkonzentration für Eotaxin, Eotaxin-2, Eotaxin-3, RANTES, MCP-3 und MCP-4 erfolgte mittels eines Sandwich ELISA-Tests (ELISA kits, R&D, Minneapolis) entsprechend dem Protokoll.

Messung der totalen Proteinkonzentration:

Die Bestimmung der totalen Proteinkonzentration erfolgte mittels Protein Assay Reagent Kit (Pierce). Standards und die zu messenden Proben wurden nach entsprechender Verdünnung (50 µl) in die wells mit Puffer pipettiert (200 µl). Nach einer Inkubation bei 37° wurde die Farbintensität gemessen und daraus der Wert in µg/ml bestimmt.

Berechnung des Proteingehaltes

Das Ergebnis wird angegeben als Proteinkonzentration in pg/µg (Menge des zu bestimmenden Proteins in pg/µg Gesamtprotein).

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

Histologie

Nach der Tonsillektomie wurde die Tonsille jeweils geteilt- für die histologische Untersuchung wurde ein Teil in 10% Formalin fixiert und in Hämatoxylin gefärbt.

Immunhistochemie

Der andere Teil wurde in kleine Stücke von ca. 300 mm³ geteilt und in Tissue-Tek[®] Cryomold[®] eingebettet. Sieben µm Kryoschnitte wurden angefertigt (Microm, HM 500 OM) und in Azeton fixiert. Vor der spezifischen AK-Färbung und der Signalverstärkung mittels APAAP Technologie wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit PBS/2% BSA für 20 min bei Raumtemperatur blockiert. Die Schnitte wurden mit monoklonalem Maus-anti-Human CD38 Antikörper (AK) (DAKO), Maus-anti-Human CD20 (DAKO) und Maus-anti-Human CD4 (DAKO) AK gefärbt. Nach dem Waschen wurden die Schnitte mit dem sekundären AK Kaninchen-anti-Maus Ig (DAKO) inkubiert. Die proliferierenden Zellen wurden mit Kaninchen-anti-Human Ki67 (DAKO) gefärbt. Biotinilierter Esel-anti-Kaninchen AK (Dianova) wurden als sekundäre AK genutzt. Für die Signalverstärkung wurde APAAP (DAKO) angewandt. APAAP besteht aus den löslichen Komplexen der intestinalen alkalischen Phosphatase (Kalb) und monoklonalen anti-Alkalische Phosphatase AK (Maus). Die Färbungen wurden mit Neufuchsin entwickelt und die Zellkerne mit Hämatoxylin gegengefärbt. Anti-human IgA AK (Cymbus) wurden benutzt und so IgA-enthaltende Zellen mit Plasmazell- Morphologie mittels intrazellulärer zytoplasmatischer AK –Färbung detektiert. Die Bilder wurden durch 3 unabhängige Untersucher ausgewertet.

3.3. Statistik

Die Daten der Studie 1 und der Studie 2 sind jeweils in Box-Plots zusammengefasst. Dargestellt wird der Median (2. Quartil), das 1. Quartil (25%) und das 3. Quartil (75%). Die horizontalen Markierungen über bzw. unter der Box stellen den größten bzw. kleinsten Wert der Verteilung dar. Ausreißer ("o") sind als Werte definiert, deren Abstand vom 1. Quartil nach unten bzw. vom 3. Quartil nach oben zwischen dem 1,5fachen und dem 3fachen der Boxhöhe liegen. Extremwerte ("x") liegen höher oder niedriger als das 3fache der Boxhöhe.

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit SPSS für Windows (Version 11.5.1, Copyright[®]SPSS Inc. 1989-2002). Unterschiede zwischen zwei Gruppen und/ oder

Parametern wurden mit nichtparametrischen Tests auf Signifikanz untersucht (Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben, Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben). Die Untersuchungen von Beziehungen zwischen den Parametern wurden mit dem Spearman-Test (bivariate Korrelation) durchgeführt. Die Signifikanz wird angegeben mit $P < 0,05$, exakt, 2-seitig.