

Zusammenfassung

Hintergrund: Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung allergen-spezifischer Immunglobuline (Ig) der Klassen IgA und IgG im Nasensekret als Ausdruck einer eigenständigen Mukosa-Immunantwort bei der Rhinitis allergica.

Methoden: Nasensekrete von 40 Allergikern wurden auf allergen-spezifisches IgA, IgG und IgE sowie auf ECP und Tryptase untersucht. 43 nicht-atopische Individuen dienten als Kontrolle. Um mögliche Einflüsse der aktuellen Pollenbelastung auf die untersuchten Parameter zu evaluieren, verglichen wir Pollinotiker co- (n = 28) versus extra-saisonal (n = 41). Weiterhin untersuchten wir 5 Patienten nach nasaler Allergenprovokation, um einen möglichen Einfluss des allergen-spezifischen IgA bei der Degranulation von Eosinophilen zu erfassen.

Ergebnisse: Im Vergleich zu den nicht-atopischen Kontrollen fanden wir signifikant erhöhte allergen-spezifische Ig aller untersuchten Klassen und Antigene bei den Allergikern. Co-saisonal fanden wir erhöhte Konzentrationen von allergen-spezifischem IgE, ECP und Tryptase, jedoch niedrigere Konzentrationen von allergen-spezifischem IgA und IgG. Es fand sich keine Assoziation zwischen der Eosinophilie in der allergischen Spätphase nach Provokation und dem allergen-spezifischen IgA.

Diskussion: Den Nachweis von allergen-spezifischem IgA und IgG im Nasensekret von Patienten mit allergischer Rhinitis interpretieren wir als Ausdruck einer eigenständigen, humoralen Mukosa-Immunantwort.

Abstract

Background: Mucosa-immunologic aspects are gaining an increasing awareness in the pathophysiology of type I allergies. Humoral mucosal immune responses are dominated by secretory IgA, but there is evidence for a relevant role of IgG in nasal mucosa-associated lymphoid tissue.

Objective: was to measure allergen-specific immunoglobulins (IgA and IgG) in nasal secretions as an expression of a humoral mucosal immune response in allergic rhinitis. For tissue eosinophilia we studied nasal Eosinophilic Cationic Protein (ECP) and for mast cell activation nasal tryptase.

Methods: Nasal secretions of 40 patients suffering from allergic rhinitis were analyzed for allergen-specific IgA, IgG, and IgE, and for ECP and tryptase. Patients were highly sensitized against the major allergens of house dust mites, timothy, and birch pollen. 43 non-atopic individuals served as controls. In order to study possible effects of the actual pollen season on the studied parameter we secondly compared patients allergic to seasonal allergens co- (n = 28) and extra-seasonally (n = 41). In order to determine a possible influence of allergen-specific IgA in eosinophilic degranulation we additionally studied 5 patients after nasal allergen challenge.

Results: In allergic rhinitis we found significantly increased levels of allergen-specific immunoglobulins of all studied subclasses and allergens in nasal secretions. Comparison of nasal ECP and tryptase showed significantly increased concentrations in allergic individuals as well. Co-seasonally we found elevated allergen-specific IgE, ECP, and tryptase but lower concentrations of

Institutsangaben

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, und Ohrenheilkunde am Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus)

Korrespondenzadresse

Dr. med. Matthias F. Kramer · Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde am Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München · Marchioninistraße 15 · 81377 München · E-mail: Matthias.Kramer@med.uni-muenchen.de

Eingegangen: 22. Juni 2004 · Angenommen: 10. Januar 2005

Bibliografie

Laryngo-Rhino-Otol 2005; 84: 503–510 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York · DOI 10.1055/s-2005-861402 · Online-Publikation: 23.05.2005 · ISSN 0935-8943

Schlüsselwörter

allergische Rhinitis · Mukosa-Immunologie · MALT · allergen-spezifische Immunglobuline · Nasensekret

allergen-specific IgA and IgG. There was no association between late phase eosinophilia and IgA concentrations after local allergen challenge.

Conclusions: The occurrence of allergen-specific immunoglobulins in nasal secretions is interpreted as a local humoral mucosal immune response. The physiologic role of local allergen-specific immunoglobulins is not clear to date. Involvement in degranulation of eosinophils or mast cells, like suggested before, seems unlikely.

Key words

Allergic rhinitis · mucosal immunity · MALT · allergen-specific immunoglobulin · nasal secretions

Einleitung

Mukosa-immunologische Aspekte in der Pathophysiologie von allergischen Reaktionen des Typs I nach Coombs und Gell gewinnen zunehmend an Bedeutung, findet der Erstkontakt des inhalierten Allergens bei der Rhinitis allergica doch mit der Nasenmukosa statt! Die Reduzierung der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis auf eine systemische, eosinophile und IgE-medierte Immunreaktion vom Th2-Typ verlegt den Blick auf relevante mukosa-immunologische Aspekte mit potenzieller therapeutischer Nutzung. So ist es im Mausmodell der allergischen Rhinitis gelungen, die mukosa-immunologische Antwort effektiv zu modulieren: Es ließ sich durch den Einsatz von mukosa-immunologischen Adjuvantien [1] oder unterschiedlichen Antigen-Administrationsrouten [2,3] die allergen-spezifische Typ-I-Immunantwort positiv beeinflussen. Die Autoren schlossen, dass über die mukosale Applikation von Allergenen eine Sensibilisierung gegen diese Allergene verhindert werden kann. Dieses Therapiekonzept entspricht dem Konzept der oralen (oder besser mukosalen) Toleranzerzeugung, das bereits für verschiedene Autoimmunerkrankungen dokumentiert wurde [4,5]. Auch für Toleranz-Modelle von Allergien liegen erfolgreiche tierexperimentelle Ergebnisse vor [6–8].

Das Mukosa-Immunsystem gilt als weitgehend autonomer Bestandteil des menschlichen Immunsystems. Erste Überlieferungen systematischer Anwendungen gehen viele hundert Jahre zurück: Die Chinesen nutzten Krusten geheilter Pockennarben zur intranasalen Inhalation – der ersten überlieferten Form der nasalen Immunisierung. Ein lokales und vom systemischen Immunsystem unabhängiges Abwehrsystem wurde bereits 1919 von dem russischen Pathologen Alexandre Besredka (1870–1940) vorgeschlagen. Er beobachtete an Kaninchen nach oraler Immunisierung mit getöteten Shigellen eine Immunität gegen Dysenterie ohne nachweisbare Serum Antikörper. Systematische morphologische Beschreibungen von Lymphdrüsen des Darmes erfolgten erstmals durch Johannes Konrad Peyer (1653–1712). Bis zur Entdeckung eines zusammenhängenden Mukosa-Abwehrsystems sollten jedoch mehrere Jahrhunderte vergehen. In den 60er-Jahren des letzten Jahrhunderts wurde das Interesse an der Schleimhaut-Abwehr durch die Entdeckung des Immunglobulin A (IgA) als dominierendes Immunglobulin (Ig) in externen Körperflüssigkeiten wieder erweckt. Der Begriff des Mukosa-assoziierten lym-

phatischen Gewebes (MALT) mit seinen Bestandteilen und deren Interaktionen bildeten mit der Beschreibung durch Bienenstock 1973 den Grundstein für die systematische Erforschung dieses Teils des Immunsystems. Vereinfacht resultiert als mukosa-immunologische Antwort Abwehr oder Toleranz.

Als mukosa-immunologische Induktionsstellen im oberen Aero-Digestivtrakt gelten die Tonsillen des Waldeyer'schen Rachenrings. In eigenen Untersuchungen konnten wir M-Zellen, als histologisches Charakteristikum von MALT-Induktionsstellen, im Kryptenepithel der menschlichen Tonsillen immunhistochemisch beschreiben [9,10].

Bei Ratten konnte bilateral an der septalen Öffnung zum Pharynx ein nasales Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (NALT) in Form von bilateralen Lymphozytenaggregaten an der Öffnung zum Nasopharynx nachgewiesen werden [11]. Diese Daten sind jedoch nicht unkritisch auf den Menschen übertragbar, da diese Nager weder Adenoide noch Tonsillen besitzen. In Übereinstimmung mit anderen Autoren [12,13] konnten auch wir in der menschlichen nasalen Mukosa keine eigenständigen mukosa-immunologischen Induktionsstellen finden. Somit scheint das Priming und die Versorgung der nasalen Mukosa des Menschen mit immunkompetenten Effektorzellen durch die Bestandteile des Waldeyer'schen Rachenrings zu erfolgen.

Die humorale Mukosa-Immunantwort wird durch IgA dominiert. Dieses liegt – im Gegensatz zum Serum – als polymeres IgA vor und wird nach Kopplung mit der Sekretorischen Komponente als sekretorisches IgA aktiv ins Lumen sezerniert. Als physiologische Aufgaben des sekretorischen IgA gelten unter anderem Adhärenzinhibition [14]; Neutralisation von Viren, Toxinen oder Enzymen [14,15]; Verhinderung der Antigen-Penetration [16] und Verstärkung anti-mikrobieller Faktoren im Mukus [17]. Über die Rolle von allergen-spezifischem IgA in lokalen Sekreten bei Atopikern liegen nur vereinzelte und zum Teil widersprüchliche Daten vor. Einerseits sollen „protektive“ Funktionen durch Allergen-Exclusion vermittelt werden [18]. Hierbei soll das Allergen durch die Bindung mit dem spezifischen IgA im Mukus „gefangen“ werden und somit der Immunantwort entgehen. Andererseits wurde allergen-spezifisches IgA mit der Degranulation von Eosinophilen in Verbindung gebracht [19–21], wobei auch hierfür gegensätzliche Daten existieren [22].

Neben IgA kommt dem IgG im MALT des oberen Aero-Digestivtrakts eine relevante Rolle zu: So ist in der menschlichen Nasenschleimhaut der relative Anteil von IgG-produzierenden Immunozyten mit 17% deutlich erhöht bzw. von IgA-produzierenden Immunozyten mit 69% deutlich vermindert (Vergleichswerte Peyer'sche Plaques: 5% IgG, 84% IgA) [23]. Im Serum von Atopikern sind wiederholt erhöhte Konzentrationen von allergen-spezifischem IgG beschrieben worden, im Wesentlichen durch die IgG4-Subklasse bedingt [24]. Eben diesem IgG4 werden ebenfalls protektive Eigenschaften im Sinne „blockierender Antikörper“ zugeschrieben [25–27]. Interessanterweise tauchen erste Arbeiten auf, die eine unabhängige Regulation von allergen-spezifischem IgE und IgG4 nachweisen [24].

Über Konzentrationen von IgA und IgG in lokalen Sekreten von Atopikern liegen nur vereinzelt Berichte vor. So beschreiben Peebles und Mitarbeiter erhöhte IgA-Konzentrationen in der Bronchiallavage bei Patienten mit allergischer Rhinitis und allergischem Asthma [28]. In der Tränenflüssigkeit von Pollinotikern fand sich in einer anderen Arbeit jedoch kein spezifisches IgA [29].

Untersuchungen am Nasensekret sind weithin etabliert. Im Gegensatz zu Biopsien ist die Gewinnung von Nasensekret einfach, schnell, nicht-invasiv und reproduzierbar. Die Verhältnisse im Nasensekret repräsentieren die lokalen, pathophysiologischen Prozesse sehr viel besser als systemische Mediatoren [30]. Mehrere Methoden zur Gewinnung von Nasensekret sind beschrieben [31,32]. Wir bevorzugen die Absorptionsmethode mit Nasenwatte, da sie neben der oben genannten Argumente für verschiedenste Mediatoren etabliert ist [30–36] und man keine schwer zu kalkulierenden Verdünnungseffekte wie bei der nasalen Lavage berücksichtigen muss [32].

Fragestellung

Ziel der Studie war es, allergen-spezifisches Ig der Klassen IgA und IgG als Ausdruck einer mukosa-immunologischen Immunantwort im Nasensekret allergischer Patienten nachzuweisen. Hierzu verglichen wir Patienten mit allergischer Rhinitis mit einer nicht atopischen, gesunden Kontrollgruppe. Zur weiteren Charakterisierung der Patienten wurden ebenfalls das allergen-spezifische IgE im Serum und Nasensekret, die Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Differenzialblutbild, das Eosinophile Cationische Protein (ECP) als Hauptbestandteil der basischen Proteine in den Granula von eosinophilen Granulozyten und damit als Marker für die Gewebseosinophilie [31] und Tryptase als Marker für die Mastzellaktivierung im Nasensekret bestimmt.

Um potenzielle Einflüsse der aktuellen Pollenbelastung auf die allergen-spezifische Ig-Konzentrationen zu beurteilen, verglichen wir Pollinotiker co- versus extra-saisonal.

Um einen möglichen Einfluss von allergen-spezifischem IgA auf die Degranulation von Eosinophilen zu untersuchen, bestimmten wir dieses zusammen mit ECP bis zu 8 h nach intranasaler Allergenprovokation.

Material und Methoden

Die Studie wurde an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität am Klinikum Großhadern durchgeführt. Es wurden Patienten mit allergischer Rhinitis und eine nicht-atopische, gesunde Kontrollgruppe verglichen. Von allen Patienten wurde Nasensekret und Serum gewonnen.

Serum

Seren von allen Patienten wurden mit dem ausführlich beschriebenen und weit etablierten In-vitro-Allergie-Suchtest SX1 (Phadiatop) [37–41] (UniCAP, Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Deutschland) untersucht. Im Falle einer vermuteten allergischen Rhinitis (SX1 positiv und/oder über den Normwert von 100 U/ml erhöhtes totales IgE und/oder sehr typische Anamnese) schlossen sich weitere In-vitro- und In-vivo-Tests zur Allergiediagnostik an: allergen-spezifisches IgE [CAP Klasse] (UniCAP, Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Deutschland), Prick-Test und intranasale Allergenprovokation.

Allergen-spezifische Ig der Klassen IgA, IgG und IgE (alle UniCAP, Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Deutschland) wurden im Serum der Patienten bestimmt. Die systemische Eosinophilie wurde durch die Anzahl von eosinophilen Granulozyten im Differenzialblutbild bestimmt.

Nasensekret

Wir gewannen Nasensekret nach der schon anderswo ausführlich beschriebenen [31,36] Absorptionsmethode mit Nasenwatte: kleine, konisch geformte Wattestücke (absorbierende Watte, Hartmann Inc., Heidenheim/Brenz, Deutschland) mit einer Länge von ca. 4 cm und einem Durchmesser von ca. 6 mm wurden unter rhinoskopischer Sicht atraumatisch in den mittleren Nasengang platziert und dort für 10 Minuten belassen. Nach Zentrifugation der Watte bei 2000 g für 10 Minuten wurde das Nasensekret bei –20 °C gelagert und unmittelbar vor der Messung 1:5 verdünnt.

Im Nasensekret bestimmten wir allergen-spezifische Ig der Klassen IgA, IgG und IgE (alle UniCAP, Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Deutschland) sowie ECP und Tryptase als Marker der Gewebseosinophilie bzw. Mastzellaktivierung (UniCAP, Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Deutschland).

Patienten

A) Allergische Rhinitis versus Kontrolle

40 Allergiker (25 Männer, 15 Frauen, mittleres Alter 27,42 Jahre ± 11,8) mit Sensibilisierungen gegen die Majorallergene der Hausstaubmilbe *Dermatophagoides pteronyssinus* (D. p1) (mittlere CAP Klasse 3,33 ± 1,4), Lieschgras (mittlere CAP Klasse 3,67 ± 1,4) und Birkenpollen (mittlere CAP Klasse 3,45 ± 1,1) wurden mit 43 gesunden und nicht atopischen Individuen (18 Männer, 25 Frauen, mittleres Alter 36,26 Jahre ± 15,7) verglichen (negative Allergianamnese, negativer SX1, gesamt IgE im Normbereich und nicht nachweisbares allergen-spezifisches IgE im Serum gegen D. p1, Lieschgras und Birkenpollen).

B) Pollinotiker co- versus extra-saisonal

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses des aktuellen Pollenfluges auf die untersuchten Parameter studierten wir an einer zweiten Patientenkohorte 28 Pollinotiker (18 Männer, 10 Frauen, mittleres Alter $35,26 \pm 15,8$) mit isolierten Sensibilisierungen gegen Lieschgras (mittlere CAP Klasse $3,25 \pm 1,1$) und/oder Birkenpollen (mittlere CAP Klasse $2,90 \pm 1,0$) co-saisonal und 41 Pollinotiker (25 Männer, 16 Frauen, mittleres Alter $38,70 \pm 13,8$) mit Sensibilisierungen gegen Lieschgras (mittlere CAP Klasse $2,76 \pm 1,3$) und/oder Birkenpollen (mittlere CAP Klasse $1,90 \pm 1,4$) extra-saisonal.

C) Spezifisches IgA nach Allergenprovokation

Um einen möglichen Einfluss des allergen-spezifischen IgA auf die Degranulation von Eosinophilen zu evaluieren provozierten wir weitere 5 Patienten (3 Männer, 2 Frauen, mittleres Alter $30,01 \text{ Jahre} \pm 8,0$), die an einer isolierten Pollinosis gegen Lieschgras ($n=3$, mittlere CAP-Klasse $2,67 \pm 0,6$) oder Birkenpollen ($n=2$, mittlere CAP-Klasse $3,00 \pm 0,0$) litten, außerhalb der Pollensaison intranasal mit ihrem spezifischem Allergen, wie anderswo ausführlich beschrieben [34]. Nasensekret wurde über 8 h gewonnen und auf allergen-spezifisches IgA und ECP, als Marker der Eosinophilendegranulation, untersucht.

Statistik

SPSS 11.5 Software wurde zur statistischen Evaluation benutzt. Signifikanz zwischen Allergikern und Kontrollen wurde mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test; zwischen co-versus extra-saisonal bzw. t0 versus tx mittels des nicht-parametrischen Chi-Quadrat-Test bestimmt. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung wurde als graphische Repräsentation der Ergebnisse gewählt.

Ergebnisse

A) Allergische Rhinitis versus Kontrolle

Im Vergleich Allergiker versus nicht-atopische Kontrollen fanden wir für die untersuchten allergen-spezifischen Ig der Klassen IgA, IgG und IgE signifikant erhöhte Konzentrationen bei allen drei untersuchten Allergenen (D. p1, Lieschgras und Birke) im Nasensekret (Abb. 1–3). Ebenfalls war ECP und Tryptase im Nasensekret bei den Allergikern signifikant erhöht (Abb. 4).

Untersuchungen im Serum zeigten bis auf das allergen-spezifische IgE keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt): Allergen-spezifisches IgE war bei den Kontrollen nicht nachweisbar, bei den Allergikern naturgemäß signifikant erhöht. Beim allergenspezifischen IgA fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Serum zwischen Allergikern und Kontrollen. Die Konzentrationen waren niedriger (durchschnittlich Faktor 1,4; $P < 0,05$ für Lieschgras und Birke) als im Nasensekret. Auch beim allergen-spezifischen IgG konnten wir im Serum keine signifikanten Unterschiede zwischen Allergikern und Kontrollen herausarbeiten. Hier waren die Serumkonzentrationen jedoch höher (durchschnittlich Faktor 4,7; $P < 0,05$ für Lieschgras, $P < 0,01$ für D. p1 und Birke) als die im Nasensekret. Bei der Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Differenzialblutbild fanden wir erhöhte Werte bei den Allergikern (Abb. 4). Dieser Unterschied erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau.

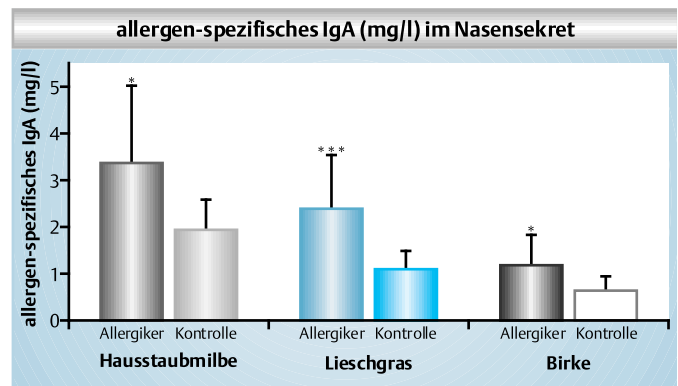


Abb. 1 Allergenspezifisches IgA [mg/l]. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der untersuchten allergen-spezifischen Immunglobuline im Nasensekret im Vergleich Allergiker ($n=40$) versus nicht-atopische Kontrollen ($n=43$) sind dargestellt. Es wurden die Majorallergene der Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus* = D. p1), Lieschgras und Birkenpollen untersucht. * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test).

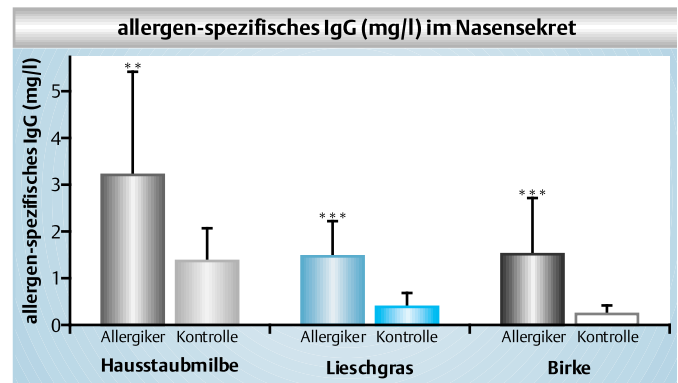


Abb. 2 Allergenspezifisches IgG [mg/l]. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der untersuchten allergen-spezifischen Immunglobuline im Nasensekret im Vergleich Allergiker ($n=40$) versus nicht-atopische Kontrollen ($n=43$) sind dargestellt. Es wurden die Majorallergene der Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus* = D. p1), Lieschgras und Birkenpollen untersucht. * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test).

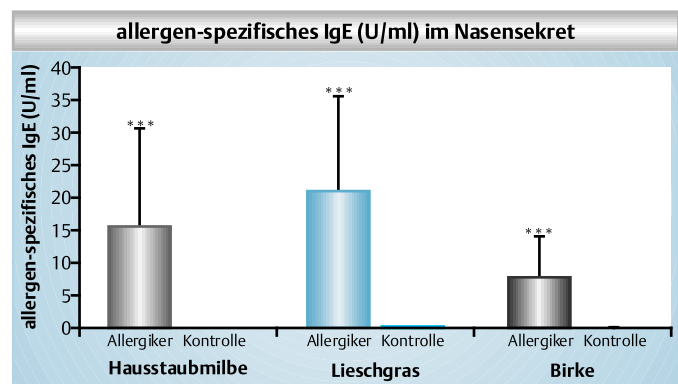


Abb. 3 Allergenspezifisches IgE [U/ml]. Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der untersuchten allergen-spezifischen Immunglobuline im Nasensekret im Vergleich Allergiker ($n=40$) versus nicht-atopische Kontrollen ($n=43$) sind dargestellt. Es wurden die Majorallergene der Hausstaubmilbe (*Dermatophagoides pteronyssinus* = D. p1), Lieschgras und Birkenpollen untersucht. * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test).

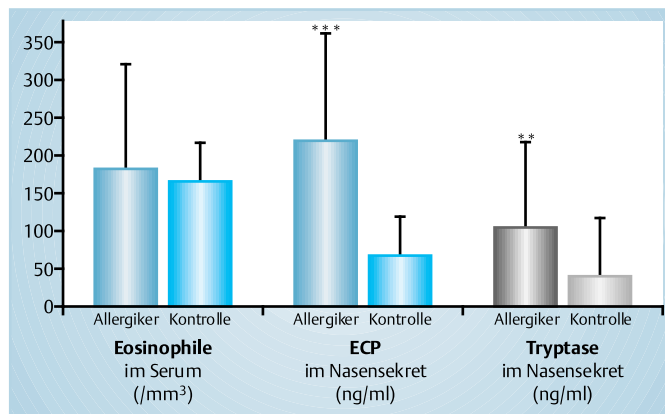


Abb. 4 Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Differenzialblutbild [mm³] (**links**), der Konzentration des Eosinophilen Cationischen Proteins (ECP) [ng/ml] im Nasensekret, als Marker für die Gewebseosinophilie (**Mitte**) und der Konzentration von Tryptase [ng/ml] im Nasensekret, als Marker der Mastzelldegranulation (**rechts**) sind im Vergleich Allergiker (n = 40) versus nicht-atopische Kontrollen (n = 43) dargestellt. * = P < 0,05, ** = P < 0,01, *** P < 0,001 (Mann-Whitney-U-Test).

B) Pollinotiker co- versus extra-saisonal

Für die mukosa-immunologisch relevanten Ig der Klassen IgA und IgG fanden wir im Nasensekret co-saisonal niedrigere Konzentrationen als extra-saisonal (Tab. 1). Die Konzentrationen im Serum zeigten kein einheitliches Bild. Auch hier waren die Konzentrationen für das IgA im Serum niedriger bzw. für das IgG höher als im Nasensekret (Daten nicht gezeigt).

Beim allergen-spezifischen IgE fanden sich co-saisonal erhöhte Werte im Nasensekret (Birke) und Serum (Tab. 1). Selbiges traf für die Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Differenzialblutbild und ECP bzw. Tryptase im Nasensekret zu (Tab. 1).

Alle gefundenen Unterschiede verfehlten das Signifikanzniveau.

C) Spezifisches IgA nach Allergenprovokation

Nach intranasaler Allergenprovokation fanden sich keine signifikanten Veränderungen in den allergen-spezifischen IgA-Konzentrationen. Nach einem verdünnungsbedingten, temporären Abfall der Konzentrationen unmittelbar nach Provokation wurden

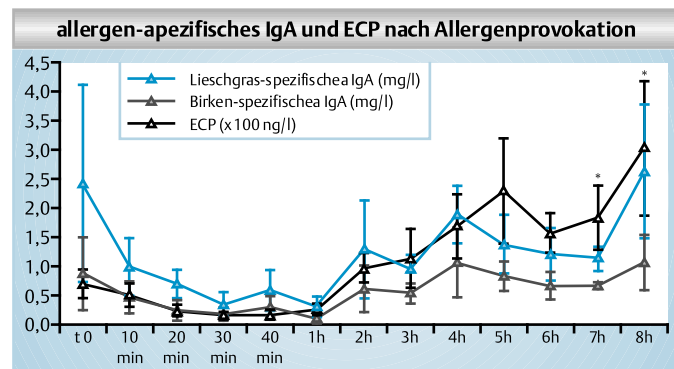


Abb. 5 Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von allergen-spezifischem IgA [mg/l] und Eosinophilen Cationischen Proteins (ECP) [ng/ml] im Nasensekret sind über den Zeitraum von 8 h nach intranasaler Allergenprovokation von 5 Pollinotikern, provoziert außerhalb der Allergensaison, dargestellt. Für die allergen-spezifischen IgA fanden sich 8 h nach Provokation, nach einem verdünnungsbedingten, initialen und temporären Abfall der Konzentrationen, annähernd gleiche Werte wie vor Provokation, wohingegen ECP eine typische Spätphasenkinetik mit einem signifikanten Maximum zwischen 7 und 8 h aufwies. * = P < 0,05 (Chi-Quadrat-Test).

8 h später wieder annähernd gleiche Werte wie vor Provokation gemessen (Abb. 5).

ECP hingegen zeigte die typische Spätphasen-Kinetik nach Allergenprovokation mit einem signifikanten Maximum zwischen 7 und 8 h nach Provokation (Abb. 5).

Diskussion

Wir bestimmten mukosa-immunologisch relevante allergen-spezifische Ig der Klassen IgA und IgG im Nasensekret, um Hinweise auf eine humorale Mukosa-Immunantwort bei der Rhinitis allergica zu finden. Im Vergleich zu einer gesunden, nicht-atopischen Kontrollkohorte wurden bei Patienten mit allergischer Rhinitis signifikant erhöhte allergen-spezifische Ig aller untersuchten Klassen gefunden. Weiterhin untersuchten wir bei Patienten mit einer isolierten Pollinosis Effekte durch die aktuelle Pollenbelastung auf die allergen-spezifischen Ig-Konzentrationen. Co-saisonal wurden für die mukosa-immunologisch rele-

Tab. 1 Pollinotiker co- versus extra-saisonal

	IgA	[mg/l]	IgG	[mg/l]	IgE	[U/ml]	IgE	[U/ml]	Eosinophile	ECP	Tryptase
	im Nasensekret		im Nasensekret		im Nasensekret		im Serum		im Serum	im Nasen- sekret	im Nasen- sekret
Allergen	Gras	Birke	Gras	Birke	Gras	Birke	Gras	Birke			
co-saisonal (n = 28)	2,15	1,34	1,24	0,71	7,52	5,70	22,26	9,86	231,0	272,5	48,8
± SD	1,8	0,6	0,9	0,5	17,5	8,5	27,9	7,4	319,1	290,9	76,6
extra-saisonal (n = 41)	2,76	1,50	2,14	1,02	11,16	2,42	14,00	6,0	183,3	212,5	36,0
± SD	2,4	1,4	2,5	1,2	23,4	5,6	20,1	8,2	144,3	307,3	68,7

Vergleich Pollinotiker co-saisonal (n = 28) mit Sensibilisierungen gegen Lieschgras und/oder Birkenpollen versus Pollinotiker (n = 41) extra-saisonal mit Sensibilisierungen gegen Lieschgras und/oder Birkenpollen.

vanten Ig-Klassen IgA und IgG niedrigere Werte als extra-saisonal gemessen. Das nasale ECP und die Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Differenzialblutbild, als lokale und systemische Marker der Gewebs eosinophilie, sowie Tryptase, als Marker für die Mastzellaktivierung, zeigten ein inverses Bild. Um einen möglichen Einfluss von allergen-spezifischem IgA auf die Eosinophilendegranulation zu erfassen, provozierten wir 5 weitere Pollinotiker außerhalb der Pollensaison intranasal mit ihrem spezifischen Allergen. Hierbei fanden sich für die allergen-spezifischen IgA keine signifikanten Veränderungen in dem Beobachtungszeitraum von 8 h, wohingegen ECP die typische Spätphasenkinetik mit einer signifikanten Erhöhung zwischen 7 und 8 h zeigte.

Wir interpretieren den Nachweis von allergen-spezifischen Ig der Klassen IgA und IgG als Ausdruck einer eigenständigen, humoralen Mukosa-Immunantwort. Als Ursprungszellen für diese Ig-produzierenden Immunocyten kommen in die nasale Mukosa migrierte und bereits anderswo geprimte B-Zellen in Frage [13]. Im oberen Aero-Digestivtrakt gelten die Bestandteile des Waldeyer'schen Rachenrings als mukosa-immunologische Induktionsstellen, hier insbesondere das Kryptenepithel der verschiedenen Tonsillen [9,10,42,43]. Im Gegensatz zum Nager fanden auch wir in Voruntersuchungen keine Hinweise auf ein eigenständiges NALT und bestätigten damit andere Autoren [12,13]. Somit stellen vor allem die Adenoide den wahrscheinlichsten Ursprungsort für immunkompetente Vorläuferzellen dar, von denen die im Nasensekret gefundenen mukosa-immunologisch relevanten Ig produziert werden. Die nasale Clearance via Flimmerepithelschlag in Richtung Nasopharynx unterstützt diese postulierte mukosa-immunologische „Wächterfunktion“ der Adenoide. Unterstützt wird die These weiterhin durch Vorarbeiten von Bachert und Möller [13], die in der Nasenmukosa nur differenzierte Plasmazellen, jedoch keine B-Zell-Reifungsstadien fanden. Auch sie schlossen daraus, dass diese Plasmazellen in den Tonsillen des Waldeyer'schen Rachenrings geprimt werden. Weiterhin war nach ihren Untersuchungen der größte Anteil dieser Plasmazellen IgA-produzierend und ein kleinerer Anteil IgG-produzierend. Dies ist in Übereinstimmung mit unseren Nasensekret-Daten, wo wir ebenfalls höhere Konzentrationen von allergen-spezifischem IgA im Gegensatz zu IgG fanden.

Unsere Ergebnisse unterstützen Überlegungen anderer Autoren zu relevanten mukosa-immunologischen Aspekten in der Pathophysiologie der Rhinitis allergica. Tierexperimentell konnten nicht nur Mukosa-Immunantworten bei Typ-I-Allergien beschrieben werden, sondern diese durch Einsatz verschiedener Adjuvantien [1] oder unterschiedlicher Antigen-Administrationsrouten [2,3] günstig beeinflusst werden. Dies gipfelte in der Beobachtung, dass über die mukosale Applikation von Allergenen eine Sensibilisierung gegen diese Allergene verhindert werden kann [2,3]. Aus diesen tierexperimentellen Daten könnten therapeutische Optionen auch für den Menschen hervorgehen. Letztlich kann man die Wirksamkeit der sublingualen Immuntherapie (SLIT) als mukosale Toleranzinduktion deuten. Die Wirksamkeit der SLIT ist inzwischen als gesichert anzusehen [44,45]. Allerdings fehlt im Gegensatz zur subkutanen Immuntherapie (SIT) der Nachweis eines überzeugenden Wirkmechanismus [46,47]. Der bei der SIT als ursächlich angesehen Th2-Th1-isotyp switch ist bei der SLIT bisher nicht überzeugend

nachgewiesen worden [46,47]. Ferner konnte durch radioaktiv markiertes Allergen bei der SLIT nachgewiesen werden, dass die Allergene bis zu 18–20 h unterhalb der Zunge persistieren [48]. All dies impliziert ein mukosa-immunologisches Szenario zur Erklärung der nachgewiesenen Wirksamkeit. Könnten die Allergene von spezialisierten Epithelzellen aufgenommen werden und somit eine Mukosa-Antwort im Sinne von mukosaler Toleranz induziert werden? Als spezialisierte Epithelzellen kämen unter anderem M-Zellen sublingual oder M-Zellen an den Ausführungsgängen der kleinen Speicheldrüsen in Frage, die dort münden. In Letztere wurde eine retrograde Antigenaufnahme durch Partikel aus dem Speichel bereits an Affen gezeigt [49]. Hypothetisch könnte der Wirkmechanismus der SLIT somit auf mukosaler Toleranzinduktion beruhen. Groß angelegte Studien mit hohen Patientenzahlen und langer Beobachtungsdauer sind zur Beantwortung dieser Fragen von Nöten und geplant. Weiterhin sollte auch der Prozess der Dosis-Wirkungs-Findung oder des Einsatzes von mukosalen Adjuvantien bei der SLIT von mukosa-immunologischen Überlegungen begleitet werden.

Über die (patho-)physiologische Funktion des allergen-spezifischen IgA und IgG lässt sich derzeit nur spekulieren. Protektive Effekte im Sinne der Allergen-Exklusion sind für das antiphlogistische IgA [14] und IgG4 [25–27] mehrfach beschrieben worden. Hierbei könnten die Allergene im Mukus „gefangen“ werden und so der Induktion einer Immunantwort entgehen [50]. Die von uns beobachteten niedrigeren Werte allergen-spezifischer Ig der Klassen IgA und IgG im Nasensekret innerhalb der Saison könnten durch den erhöhten Verbrauch co-saisonal erklärt werden. Unsere Daten sprechen allerdings gegen einen relevanten Einfluss des allergen-spezifischen IgA bei der Degranulation von Eosinophilen. Im Vergleich co- versus extra-saisonal fanden sich inverse Verhältnisse zwischen IgA und ECP bzw. Eosinophilenzahl, und nach intranasaler Allergenprovokation zeigten sich keine Änderungen des IgA über 8 h, wohingegen ECP in der Spätphase der allergischen Reaktion mehr als 4-fach gesteigert war. Somit unterstützen wir die Autoren [22], die diese „negativen“ Effekte des IgA in Frage stellen.

Weiterhin sprechen unsere Ergebnisse gegen einen relevanten Zusammenhang zwischen allergen-spezifischem IgA und der Mastzelldegranulation, da analog zum ECP inverse Verhältnisse zwischen IgA und Tryptase im Vergleich co- versus extra-saisonal gefunden wurden.

Die Ergebnisse nach Allergenprovokation konnten inzwischen an einer größeren Patientengruppe in Zusammenarbeit mit unserem Kooperationspartner reproduziert werden. Auch hier fanden sich keine signifikanten Änderungen der allergen-spezifischen Ig nach Provokation und kein Zusammenhang zur bekannten Eosinophilie in der allergischen Spätphase oder zur Mastzellaktivierung in der allergischen Frühphase [51].

Bei der Interpretation der Ergebnisse des Vergleichs co- versus extra-saisonal muss berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Individuen (co-saisonal n=28 versus extra-saisonal n=41) verglichen wurden. Zu den intra-individuellen Schwankungen addieren sich inter-individuelle, was durch die hohen Standardabweichungen und fehlenden Signifikanzniveaus repräsentiert wird. Nur ein longitudinaler Studienansatz, in dem dieselben Pa-

tienten co- und extra-saisonal untersucht werden, kann letztlich signifikante Ergebnisse erbringen. Wir halten die gefundenen Daten, insbesondere im Hinblick auf die fehlende Assoziation zwischen IgA und der Eosinophilie bzw. Mastzelldegranulation, jedoch für berichtenswert und entschlossen uns diese hier zu präsentieren.

Wir interpretieren den Nachweis von allergen-spezifischen IgA und IgG als Ausdruck einer eigenständigen Mukosa-Immunantwort. Die höchsten Konzentrationen allergen-spezifischer Antikörper im Nasensekret fanden wir jedoch beim allergen-spezifischen IgE der Allergiker. Dieses stammt sicherlich zum größten Teil aus der systemischen Zirkulation, wo erhöhte IgE-Werte bei Allergikern als pathognomisch gelten und mehrfach beschrieben wurden [33]. Im Gegensatz zu älteren Arbeiten, in denen keine IgE-produzierenden Plasmazellen in der Nasenmukosa gefunden wurden [13], gibt es immer mehr Hinweise auch auf eine lokale IgE-Produktion bei der Rhinitis allergica [52–54]. Über den Anteil von lokal gebildetem versus systemischem IgE im Nasensekret können wir nur spekulieren. Ähnliches trifft auch für das IgG zu. Auch hier fanden sich höhere Konzentrationen im Serum im Vergleich zum Nasensekret, so dass ein Teil des im Nasensekret gefundenen IgG aus der systemischen Zirkulation stammen dürfte. Allerdings deuten die bereits durch andere beschriebenen IgG-produzierenden Plasmazellen in der Nasenmukosa [13, 53] auf eine relevante mukosale Produktion. Anders das Bild für das allergen-spezifische IgA: Hier waren die Serumkonzentrationen deutlich niedriger als die im Nasensekret. Der weitest große Anteil des im Nasensekret gefundenen allergen-spezifischen IgA dürfte somit mukosalen Ursprungs sein, was ebenfalls durch histologische Ergebnisse bestätigt wird [13].

Insgesamt spiegeln die Verhältnisse im Serum die Pathologie in der Nase nur unzureichend wider, was in Übereinstimmung zu vorangegangenen Studien ist [30, 33, 36].

Zusammenfassung

Mukosa-immunologische Aspekte in der Pathophysiologie von allergischen Reaktionen des Typs I nach Coombs und Gell gewinnen eine zunehmende Beachtung. Findet der Erstkontakt des inhalierten Allergens bei der Rhinitis allergica doch mit der Nasenmukosa statt! Die Reduzierung der Pathophysiologie der allergischen Rhinitis auf eine systemische, eosinophile und IgE-medierte Immunreaktion vom Th2-Typ verlegt den Blick auf relevante mukosa-immunologische Aspekte mit potenzieller therapeutischer Nutzung.

Wir fanden im Nasensekret allergen-spezifische Ig der Klassen IgA und IgG bei Patienten mit allergischer Rhinitis und interpretieren dies als Ausdruck einer eigenständigen, humoralen Mukosa-Immunantwort. Ihre Bedeutung bleibt derzeit noch spekulativ. Eine Involvierung von IgA bei der Eosinophilen- oder Mastzelldegranulation erscheint nach unseren Ergebnissen unwahrscheinlich.

Danksagung

Diese Studie wurde vom „Programm zur Förderung von Forschung und Lehre“ der Ludwig-Maximilians-Universität München und Fördermitteln von ALK-Scherax, Hamburg, Deutschland und Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Deutschland unterstützt.

Literatur

- Wiedermann U, Jahn SB, Fritsch R et al. Effects of adjuvants on the immune response to allergens in a murine model of allergen inhalation: cholera toxin induces a Th1-like response to Bet v 1, the major birch pollen allergen. *Clin Exp Immunol* 1998; 111: 144–151
- Wiedermann U, Jahn SB, Repa A, Kraft D, Ebner C. Modulation of an allergic immune response via the mucosal route in a murine model of inhalative type-I allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 129–132
- Wiedermann U, Jahn SB, Bohle B et al. Suppression of antigen-specific T- and B-cell responses by intranasal or oral administration of recombinant Bet v1, the major birch pollen antigen, in a murine model of type I allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 1202–1210
- Weiner HL. Oral tolerance: Immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today* 1997; 18: 335–342
- Xiao BG, Link H. Mucosal tolerance: a two edged sword to prevent and treat autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 85: 119–128
- Holt BJ, Batty JE, Turner KG. Inhibition of specific IgE responses in mice by pre-exposure to inhaled antigen. *Immunology* 1981; 42: 409–417
- McMenamin C, Pimm C, McKersy M, Holt P. Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific gd T cells. *Science* 1994; 265: 1869–1871
- Hoyne G, Askonas BA, Hetzel C, Thomas WR, Lamb JR. Regulation of house dust mite responses by intranasally administered peptide: transient activation of CD4+ T cell responses precedes the development of tolerance in vivo. *Int Immunol* 1996; 7: 335–342
- Gebert A, Werner K, Fassbender S, Kramer MF. Immunohistochemischer Nachweis von M-Zellen in der Tonsilla palatina des Menschen – Charakterisierung eines besonderen intraepithelialen Kompartiments. *Ann Anat* 2000; 182: 130 (Abstrakt)
- Gebert A, Fassbender S, Kramer MF. M-Zellen der Tonsilla palatina des Menschen besitzen die notwendigen Moleküle zur Initiierung von Immunantworten zur Antigenpräsentation. *Ann Anat* 2001; 183: 63–64 (Abstrakt)
- Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH et al. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today* 1992; 13: 219–224
- Bernstein JM. Mucosal immunology of the upper respiratory tract. *Respiration* 1992; 59: 3–13
- Bachert C, Möller P. Die Tonsille als MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) der Nasenschleimhaut. *Laryngo-Rhino-Otol* 1990; 69: 515–520
- Russell MW, Kilian M, Lamm ME. Biological activities of IgA. In: Ogra PL, Lamm ME, Bienenstock J, Mestecky J, Strober W, McGhee JR (Hrsg). *Mucosal Immunology*. San Diego, London, Boston: Academic Press, 1999: 225–240
- Childers NK, Bruce MG, McGhee JR. Molecular mechanisms of immunoglobulin A defense. *Ann Rev Microbiol* 1989; 43: 503–536
- Stokes CR, Soothill JF, Turner MW. Immune exclusion is a function of IgA. *Nature* 1975; 255: 745–746
- Funakoshi S, Dot T, Nakajima T, Suyama T, Tokuda M. Antimicrobial effect of human serum IgA. *Microbiol Immunol* 1982; 26: 227–239
- Sun LK, Fung MS, Sun WN, Sun CR, Chang WI, Chang TW. Human IgA monoclonal antibodies specific for a major ragweed pollen antigen. *Biotechnology N Y* 1995; 13: 779–786
- Nahm DH, Kim HY, Park HS. Elevation of specific immunoglobulin A antibodies to both allergen and bacterial antigen in induced sputum from asthmatics. *Eur Respir J* 1998; 12: 540–545
- Peebles-RS J, Liu MC, Adkinson-NF J, Lichtenstein LM, Hamilton RG. Ragweed-specific antibodies in bronchoalveolar lavage fluids and serum before and after segmental lung challenge: IgE and IgA associated

- with eosinophil degranulation. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 265–273
- 21 Abu-Ghazaleh RI, Fujisawa T, Mestecky J, Kyle RA, Gleich GJ. IgA-induced eosinophil degranulation. *J Immunol* 1989; 142: 2393–2400
 - 22 Schwarze J, Cieslewicz G, Joetham A et al. Antigen-specific immunoglobulin-A prevents increased airway responsiveness and lung eosinophilia after airway challenge in sensitized mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 519–525
 - 23 Brandtzaeg P. Humoral Immune response patterns of human mucosae: induction and relation to bacterial respiratory tract infection. *JID* 1992; 165: S167–S176
 - 24 Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol* 1998; 160: 3555–3561
 - 25 Devey ME, Wilson DV, Wheeler AW. The IgG subclass of antibodies to grass pollen allergens produced in hay fever patients during hyposensibilisation. *Clin Allergy* 1976; 6: 227–236
 - 26 Van der Giessen M, Homann WL, Van Kernebeek G, Aalberse RC, Dieges PH. Subclass typing of IgG antibodies formed by grass pollen-allergic patients during immunotherapy. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1976; 50: 625–640
 - 27 Ohashi Y, Nakai Y, Kihara S, Nakagawa T, Miyamoto T. House dust mite-specific IgE, IgG1, and IgG4 antibodies in patients with perennial allergic rhinitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1987; 96: 434–437
 - 28 Peebles-RS J, Liu MC, Lichtenstein LM, Hamilton RG. IgA, IgG and IgM quantification in bronchoalveolar lavage fluids from allergic rhinitis, allergic asthma, and normal subjects by monoclonal antibody-based immunoenzymetric assays. *J Immunol Meth* 1995; 179: 77–86
 - 29 Aghayan UR, Ball T, Vrtala S, Schweiger C, Kraft D, Valenta R. Dissociation of allergen-specific IgE and IgA responses in sera and tears of pollen-allergic patients: a study performed with purified recombinant pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 803–813
 - 30 Klimek L, Riechelmann H, Amedee R. Eosinophilic cationic protein in nasal secretions and blood serum in grass-pollen allergic rhinitis. *Am J Rhinol* 1996; 10: 319–323
 - 31 Klimek L, Rasp G. Norm values for eosinophil cationic protein in nasal secretions: influence of specimen collection. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 367–374
 - 32 Riechelmann H, Deutsche T, Friemel E, Gross H-J, Bachem M. Biological markers in nasal secretions. *Eur Respir J* 2003; 21: 600–605
 - 33 Kramer MF, Ostertag P, Pfrogner E, Rasp G. Nasal Interleukin-5, Immunoglobulin E, Eosinophilic Cationic Protein, and soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 in chronic sinusitis, allergic rhinitis, and nasal polyposis. *Laryngoscope* 2000; 110: 1056–1062
 - 34 Kramer MF, Pfrogner E, Ostertag P, Rasp G. Nasal IL-16 and MIP-1 alpha in late phase allergic response. *Allergy Asthma Proc* 2001; 22: 127–132
 - 35 Patriarca G, di Renzo V, Schiavino D et al. Nasal secretion specific IgE in rhinitis patients. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1990; 18: 1–4
 - 36 Kramer MF, Burow G, Pfrogner E, Rasp G. In-vitro diagnosis of chronic nasal inflammation. *Clin Exp Allergy* 2004; in press
 - 37 Matricardi PM, Nisini R, Biselli R, D'Amelio R. Evaluation of the overall degree of sensitization to airborne allergens by a single serologic test: implications for epidemiologic studies of allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93: 68–79
 - 38 Matricardi PM, Nisini R, Pizzolo JG, D'Amelio R. The use of Phadiatop in mass-screening programmes of inhalant allergies: advantages and limitations. *Clin Exp Allergy* 1990; 20: 151–155
 - 39 Wever AM, Wever-Hess J, van Schayck CP, van Weel C. Evaluation of the Phadiatop test in an epidemiological study. *Allergy* 1990; 45: 92–97
 - 40 Salkie ML. The Phadiatop test allows adequate screening for atopy with a marked reduction in cost. *J Clin Lab Anal* 1991; 5: 226–227
 - 41 Kohl C, Debelic M. In vitro screening for inhalant allergy with multi SX 1 RAST (Phadiatop). *Allergy* 1991; 46: 245–250
 - 42 Perry M, Whyte A. Immunology of the tonsils. *Immunol Today* 1998; 19: 414–421
 - 43 Gebert A, Pabst R. M cells at locations outside the gut. *Sem Immunology* 1999; 11: 165–170
 - 44 Bousquet J, Lockey RF, Malling HJ. WHO position paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998; 53: 1–42
 - 45 Bousquet J, van-Cauwenberge P, Khaltaev N, Aria Workshop Group, World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J Allerg Clin Immunol* 2001; 108: S147–S334
 - 46 Ippoliti F, De Santis W, Volterrani A et al. Immunomodulation during sublingual therapy in allergic children. *Pediatr Allergy Immunol* 2003; 14: 216–221
 - 47 Pajno GB, Morabito L, Barberio G, Parmiani S. Clinical and immunologic effects of long-term sublingual immunotherapy in asthmatic children sensitized to mites: a double-blind, placebo-controlled study. *Allergy* 2000; 55: 842–849
 - 48 Bagnasco M, Mariani G, Passalacqua G et al. Absorption and distribution kinetics of the major *Parietaria judaica* allergen (Par j 1) administered by noninjectable routes in healthy human beings. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 122–129
 - 49 Nair PNR, Schroeder HE. Retrograde access of antigens to the minor salivary glands in the monkey *Macaca fascicularis*. *Arch Oral Biol* 1983; 28: 145–152
 - 50 McGhee JR, Czerkinsky C, Mestecky J. Mucosal vaccines: an overview. In: Ogra PL, Lamm ME, Bienenstock J, Mestecky J, Strober W, McGhee JR (Hrsg). *Mucosal Immunology*. San Diego, London, Boston: Academic Press, 1999: 741–758
 - 51 Powe DG, Mason MT, Chester M et al. Secretory IgA (sIgA) production is not increased in nasal mucosa after allergen challenge. *Clin Exp Allergy*, submitted 2004
 - 52 Durham SR, Gould HJ, Hamid QA. Local IgE production in nasal allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113: 128–130
 - 53 Smurthwaite L, Durham SR. Local IgG synthesis in allergic rhinitis and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002; 2: 231–238
 - 54 Kleinjan A, Vinke JG, Severijnen LW, Fokkens WJ. Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients. *Eur Respir J* 2000; 15: 491–497